

Universidade de São Paulo

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia)

ANDRÉ LUIZ DE ARAÚJO SILVA

**Caracterização de um novo grupo de efetores pertencente a superfamília NlpC/P60
secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

São Paulo

2022

André Luiz de Araújo Silva

**Caracterização de um novo grupo de efetores pertencente a superfamília NlpC/P60
secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de Concentração: Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Dra. Ethel Bayer Santos

Coorientador: Prof. Dr. Robson Francisco de Souza

Versão Corrigida

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Luiz de Araújo Silva, André
Caracterização de um novo grupo de efetores
pertencente a superfamília NlpC/P60 secretados pelo
T6SS de Salmonella spp. / André Luiz de Araújo
Silva; orientadora Ethel Bayer Santos; coorientador
Robson Francisco de Souza. -- São Paulo, 2022.
52 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia. 2. Salmonella. 3. Sistema de
Secreção do Tipo 6. 4. Efetores. 5. Bioinformática.
I. Bayer Santos, Ethel, orientador. II. Francisco
de Souza, Robson, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Luiz de Araújo Silva

Título da Dissertação/Tese: Caracterização de um novo grupo de efetores pertencente a superfamília NlpC/P60 secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp.

Orientador: Dra. Ethel Bayer Santos

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1126/2020** referente ao projeto intitulado: **“Identificação de novos efetores secretados pelo T6SS de Salmonella utilizando abordagens *in silico* e caracterização funcional de um candidato”**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **André Luiz de Araújo Silva**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Ethel Bayer Santos**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 05 de outubro de 2020.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
CoordenadoraCEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
CoordenadoraCEPSH ICB/USP

Para minha mãe, Dona Ivaneide e meu pai, Seu Luiz. As pessoas mais fortes que conheço.

Agradecimentos

À minha família, meus pais e meus irmãos que me apoiaram durante este projeto, e em especial à minha tia Vandy que me ajudou imensamente na minha estadia em São Paulo.

À minha orientadora Dra. Ethel Bayer Santos (ICB - USP) e ao meu coorientador Prof. Dr. Robson Francisco de Souza (ICB - USP), sem os quais este trabalho não teria sido concluído.

À Prof. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho (ICB – USP), por ceder espaço no seu laboratório para alguns dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira (Unesp – Campus Araraquara), por gentilmente ceder a cepa utilizada nas etapas de clonagem e estudos desenvolvidos neste trabalho.

A todos os membros e alunos do Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas (LEEP) do Instituto de Ciências Biomédicas, por toda a ajuda na execução dos experimentos e desenvolvimento do projeto. Em especial ao Dr. Gianluca Gonçalves Nicastro.

Aos membros da minha banca de qualificação, Profa. Ana Márcia de Sá Guimarães, Prof. João Marcelo Pereira Alves e Prof. Rogério Ferreiro Lourenço por todos os comentários construtivos sobre este trabalho.

Aos colegas do EBSlab, Daniel Limache, Stephanie Sabinelli, Julia Takuno, Lior Karman e Luize Nóbrega pelos apontamentos e ajuda durante os trabalhos, e em especial ao Gustavo Chagas Santos que contribuiu de modo ímpar para este projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi financiado pelo processo n.2021/02536-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ad Maiorem Dei Gloriam.

RESUMO

DE ARAÚJO-SILVA, A. L. **Caracterização de um novo grupo de efetores pertencente a superfamília NlpC/P60 secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp.** 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Bactérias vivem em comunidades polimicrobianas e competem constantemente por recursos. Espécies Gram-negativas como *Salmonella* spp. codificam um sistema de secreção de proteínas do tipo VI (T6SS) que constitui um aparato contrátil formado por 13 proteínas capazes de injetar proteínas tóxicas (efetores) dentro de bactérias competidoras. O gênero *Salmonella* codifica cinco T6SSs filogeneticamente distintos em diferentes ilhas de patogenicidade: *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium codifica um T6SS na SPI-6 (*Salmonella Pathogenicity Island-6*); *S. enterica* sorotipo Gallinarum codifica um T6SS na SPI-19; *S. arizonae* codifica dois T6SS nas ilhas SPI-20 e SPI-21; e *S. bongori* codifica um T6SS na SPI-22. Estudos anteriores demonstraram a importância do T6SS de SPI-6 em *S. Typhimurium* e SPI-19 em *S. Gallinarum* para infecção de hospedeiros vertebrados; no entanto, até o momento foram descritos apenas quatro efetores secretados pelos T6SSs de *Salmonella* spp. A identificação de novos efetores secretados via T6SSs e a caracterização de seus mecanismos de ação permitirão entender a contribuição desses sistemas para a patogenicidade de *Salmonella*, a dinâmica das comunidades microbianas e manutenção de reservatórios ambientais deste patógeno, além de contribuir para descoberta de novos mecanismos antimicrobianos. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo caracterizar um novo grupo de efetores do T6SS de *Salmonella* spp. que pertence à superfamília NlpC/P60 identificado utilizando abordagens computacionais durante análise de 10 mil genomas de *Salmonella* (10KSG). Tox241 é um membro representativo desse grupo, e apresenta toxicidade quando expressa no periplasma de *Escherichia coli*. Predições estruturais e *docking* molecular sugerem que Tox241 é uma fosfolipase. Esse trabalho contribui para o aumento do conhecimento sobre as armas utilizadas por bactérias em conflitos biológicos.

Palavras-chave: *Salmonella*; sistema de secreção do tipo 6; competição bacteriana, efetores, toxinas.

ABSTRACT

DE ARAÚJO-SILVA, A. L. **Caracterização de um novo grupo de efetores pertencente a superfamília NlpC/P60 secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp.** 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Bacteria live in polymicrobial communities and constantly compete for resources. Gram-negative species such as *Salmonella* spp. encode a type VI protein secretion system (T6SS), which is a contractile apparatus formed by 13 proteins capable of injecting toxic proteins (effectors) into competing bacteria. The genus *Salmonella* encodes five phylogenetically distinct T6SSs in different pathogenicity islands: *Salmonella* enterica serotype Typhimurium encodes a T6SS in SPI-6 (*Salmonella* Pathogenicity Island-6); *S. enterica* serotype Gallinarum encodes a T6SS in SPI-19; *S. arizonae* encodes two T6SS on islands SPI-20 and SPI-21; and *S. bongori* encodes a T6SS in SPI-22. Previous studies have demonstrated the importance of the SPI-6 T6SS for *S. Typhimurium* and SPI-19 T6SS for *S. Gallinarum* during infection of vertebrate hosts; however, only four effectors secreted by the T6SSs of *Salmonella* spp. have been identified so far. The identification of new effectors secreted via T6SSs and the characterization of their mechanisms of action will allow us to understand the contribution of these systems to the pathogenicity of *Salmonella*, the dynamics of microbial communities and the maintenance of environmental reservoirs of this pathogen, in addition to contributing to the discovery of new antimicrobial mechanisms. Hence, this work aims to characterize a new group of T6SS effectors from *Salmonella* spp. belonging to the NlpC/P60 superfamily, which was identified using computational approaches during the analysis of 10K genomes of *Salmonella* (10KSG). Tox241 is a representative member of this group and is toxic when expressed in the periplasm of *Escherichia coli*. Structural predictions and molecular docking suggest Tox241 is a phospholipase. This work contributes with knowledge about the biochemical weapons used by bacteria in biological conflicts.

Keywords: *Salmonella*; type 6 secretion system; bacterial competition; effectors; toxins.

Índice

1. Introdução.....	10
1.1 Competição bacteriana.....	10
1.2 Sistema de secreção do tipo 6.....	13
1.3 Superfamília NlpC/P60.....	15
2. Objetivo.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Cepas e cultivo.....	19
3.2 Clonagens.....	19
3.3 Ensaio de toxicidade em <i>Escherichia coli</i>	20
3.4 Expressão de proteínas e <i>western blotting</i>	21
3.5 <i>Splicing by overlap extension</i>	22
3.5 Análises bioinformáticas.....	22
3.5.1. Coleta de homólogos de NlpC/P60 permutadas.....	22
3.5.2. Construção da árvore filogenética.....	23
3.5.3. Predição de estrutura terciária.....	23
3.5.4. <i>Docking</i> molecular.....	24
4. Resultados e Discussão.....	24
4.1. Estudo de um novo efector do T6SS de <i>Salmonella</i>	24
4.2. Predição e análise da estrutura tridimensional de Tox241.....	32
8. Conclusões.....	40
9. Referências Bibliográficas.....	41
10. Anexos.....	49
10.1 Publicações científicas.....	49
10.1 Figuras suplementares.....	50

1. Introdução

1.1 Competição bacteriana

Muitos dos nichos ecológicos da biosfera contêm uma grande diversidade de bactérias e outros microrganismos que vivem em constante competição por recursos. Bactérias que habitam ambientes altamente populosos, como o intestino de mamíferos, precisam utilizar mecanismos para garantir a sobrevivência da sua população e atacar adversários (KENNEDY; CHANG, 2020). Muitos desses mecanismos de antagonismo utilizados por bactérias culminam na secreção de antimicrobianos, durante episódios de conflito biológico (Figura 1), com o objetivo de atacar e inviabilizar os seus competidores. Alguns destes mecanismos de antagonismo são dependentes e outros são independentes de contato entre as células (Figura 1).

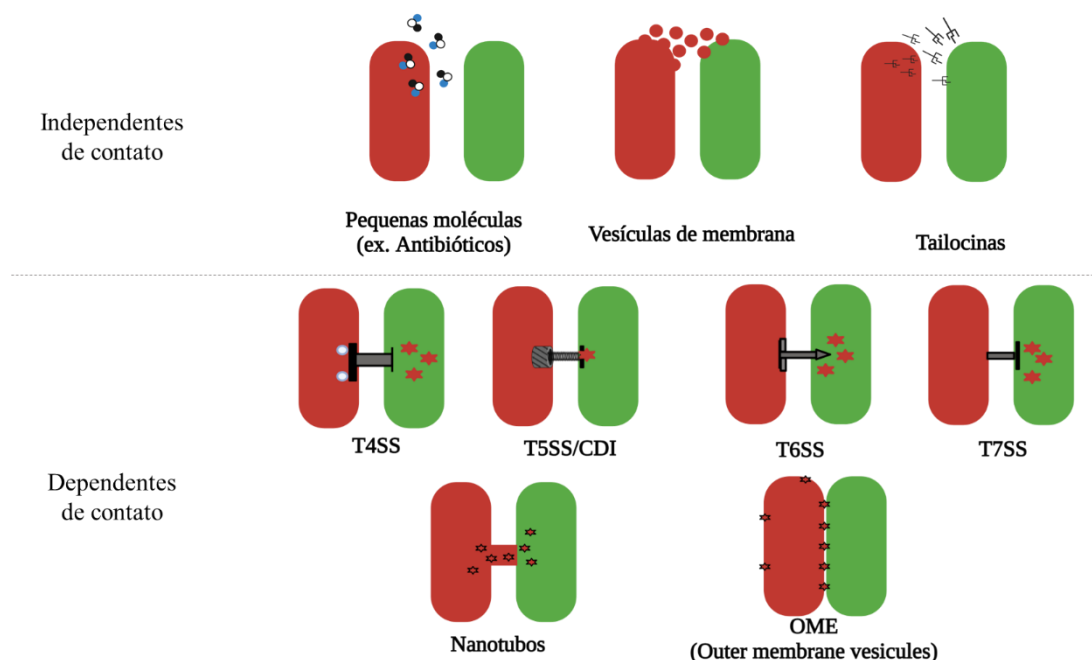


Figura 1. Exemplos de mecanismos utilizados por bactérias durante conflitos biológicos. Bactérias utilizam diferentes armas durante competição com outras bactérias. Algumas destas são independentes de contato (antibióticos, vesículas de membranas e tailocinas) e outras precisam de contato entre as células (T4SS, T5SS, T6SS, T7SS, nanotubos e OME). Bactéria atacante (vermelho) e bactéria alvo (verde).

Como exemplo de mecanismos independentes de contato, podemos citar a produção e secreção de metabólitos secundários (antibióticos) (WALSH, 2003), e de bacteriocinas, as quais podem ser divididas em microcinas (<10kDa) e colicinas (>10kDa) de acordo com o tamanho das moléculas (CASCALES *et al.*, 2007; RILEY; WERTZ, 2002). Mecanismos menos frequentes de antagonismo independente de contato utilizam vesículas de membrana liberadas no meio extracelular, e que após fusão com

células alvo entregam toxinas (KADURUGAMUWA *et al.*, 1998). Outro mecanismo de antagonismo é promovido pelas tailocinas, que são liberadas no meio extracelular e atacam a membrana da célula alvo causando sua despolarização e morte (SCHOLL, 2017).

Como exemplos de mecanismos dependentes de contato entre as células, podemos citar o sistema de secreção do tipo IV (T4SS), que é evolutivamente relacionado à maquinaria de conjugação da célula, e é capaz de translocar toxinas para células Gram-negativas (SOUZA *et al.*, 2015). O sistema de secreção do tipo V (T5SS) também conhecido como *contact-dependent growth inhibition system* (CDI) (HAYES; AOKI; LOW, 2010) é formado de uma proteína filamentosa (CdiA) que contém um domínio tóxico na porção C-terminal, e uma segunda proteína que ancora a primeira na membrana e auxilia na sua translocação para célula alvo (AOKI *et al.*, 2010; RUHE; LOW; HAYES, 2013). O sistema de secreção do tipo VI (T6SS) é evolutivamente relacionado ao aparato contrátil dos bacteriófagos, e entrega toxinas após contato com a célula alvo (LEIMAN *et al.*, 2009a; NGUYEN *et al.*, 2018). O sistema de secreção do tipo VII (T7SS) é um sistema presente em bactérias Gram-positivas (CAO *et al.*, 2016; WHITNEY *et al.*, 2017). Outros mecanismos de antagonismo dependentes de contato compreendem os nanotubos, que formam uma ponte entre o citoplasma de células vizinhas permitindo o transporte direto de toxinas (STEMPLER *et al.*, 2017), e um mecanismo denominado *outer membrane exchange* (OME), no qual toxinas localizadas na membrana externa da bactéria atacante são transferidas para células alvo após contato (VASSALLO *et al.*, 2017).

Uma revisão recente do nosso grupo apontou a importância da competição bacteriana para o estabelecimento de uma infecção intestinal por *Salmonella* (SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2021) (Anexo 01). Um dos principais desafios que *Salmonella* encontra durante a infecção é a resistência a colonização imposta pelos membros da microbiota intestinal (LAWLEY; WALKER, 2013). O sucesso da infecção por *Salmonella* é dependente da sua invasão no epitélio intestinal e translocação de efetores via os sistemas de secreção do tipo 3 (T3SS) codificados nas ilhas de patogenicidade SPI-1 e SPI-2 de *Salmonella* (GALÁN; ZHOU, 2000; HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001; HENSEL, 2004). Através da ação desses efetores, *Salmonella* induz modificações no ambiente intestinal que levam à inflamação do tecido, o que promove o surgimento de novos aceptores de elétrons e fontes de carbono que não

podem ser metabolizados pelos membros da microbiota, mas favorecem o crescimento do patógeno em detrimento da microbiota endógena (SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2021).

As condições ideais para a expressão de SPI-1 T3SS são encontradas na porção distal do íleo (CARTER; COLLINS, 1974) (Figura 2). A homeostase intestinal é mantida devido a hipóxia induzida pela ação de bactérias da microbiota, residentes no intestino que degradam carboidratos complexos produzindo acetato, butirato e propionato. Esses ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) estimulam os colonócitos a consumir oxigênio dos vasos sanguíneos adjacentes, impedindo que esse seja difundido para o lúmen intestinal (LITVAK; BYNDLOSS; BÄUMLER, 2018; ZHENG; KELLY; COLGAN, 2015) (Figura 2).

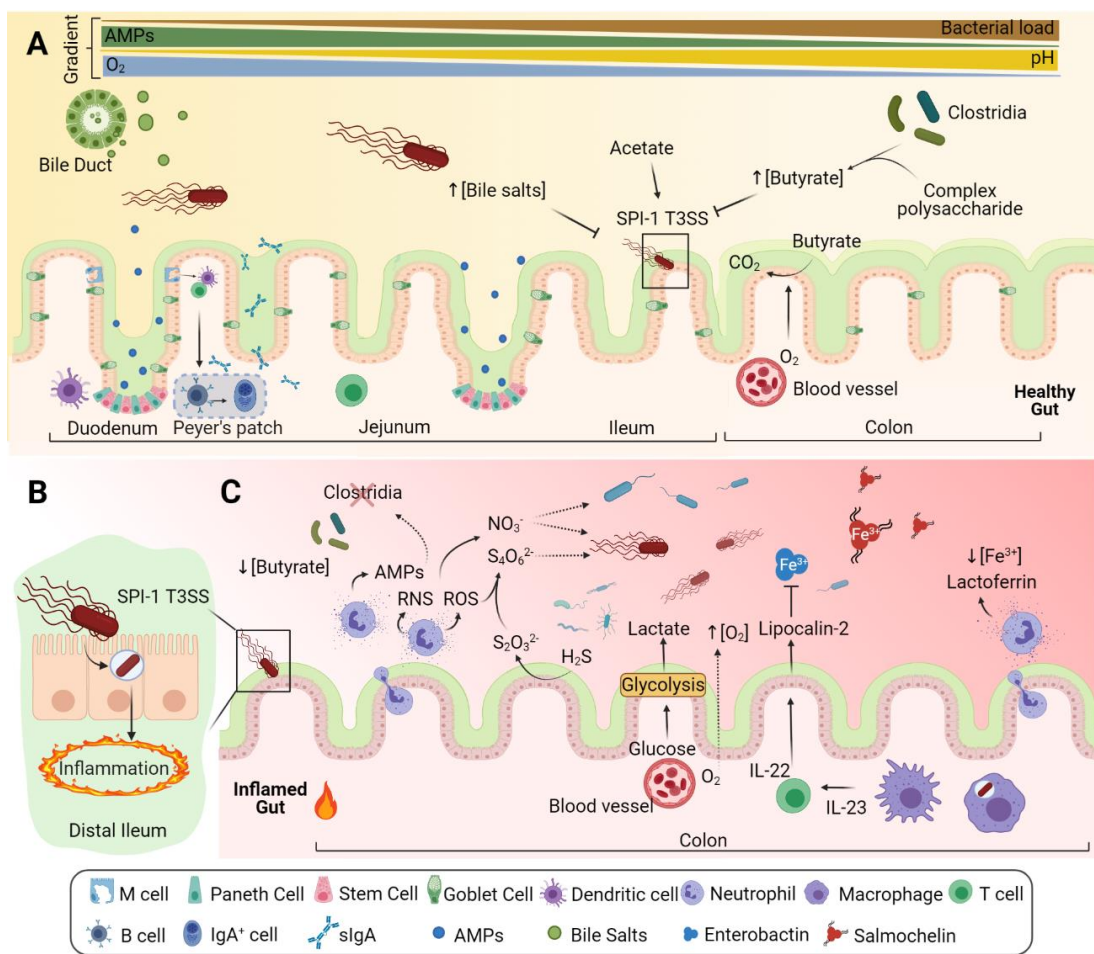


Figura 2. Homeostase e mudanças induzidas no ambiente pela invasão de *Salmonella*. Em **A**, momento de equilíbrio do ambiente intestinal antes da indução de inflamação por *Salmonella* (vermelho escuro), ainda são demonstrados os principais gradientes entre a região proximal-distal do intestino. Em **B** é denotado o momento da invasão e consequente indução da inflamação no íleo distal. Em **C** é apresentado o ambiente intestinal modificado após a inflamação, favorecendo a competição por *Salmonella*. Imagem retirada de SIBINELLI-SOUSA *et al.* (2021).

Durante a corrida para indução da inflamação, *Salmonella* precisa competir com membros da microbiota antes de alcançar o epitélio intestinal no íleo distal. Para tanto, o

patógeno enfrenta os mecanismos de antagonismo bacteriano utilizados por membros da microbiota em diferentes situações de conflito (Figura 3). Apesar do menor número de bactérias no intestino delgado em relação ao intestino grosso (KENNEDY; CHANG, 2020), esta porção da microbiota representa a primeira barreira de antagonistas a *Salmonella*, o que pode impactar no resultado da sua infecção. Caso o patógeno não consiga se sobrepor a esta microbiota intestinal e consiga chegar ao íleo distal, sua invasão epitelial e inflamação devem ser severamente prejudicadas (CARTER; COLLINS, 1974; SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2021). Desse modo, é interessante notar que o T6SS de *Salmonella* é ativado na presença de sais biliares, que são abundantes na porção inicial do duodeno (SANA *et al.*, 2016). Conseqüentemente, é provável que o T6SS de *Salmonella* seja utilizado desde as porções proximais do intestino para um conflito inicial com a microbiota (SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2021).

Por outro lado, membros da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* (KENNEDY; CHANG, 2020), possuem mecanismos para antagonizar *Salmonella* (colicinas, microcinas, T6SS, etc.), além da presença de bactérias Gram-positivas, que também produzem moléculas antimicrobianas que são capazes de atuar contra *Salmonella* (CASEY PAT *et al.*, 2007; PETROVA *et al.*, 2016).

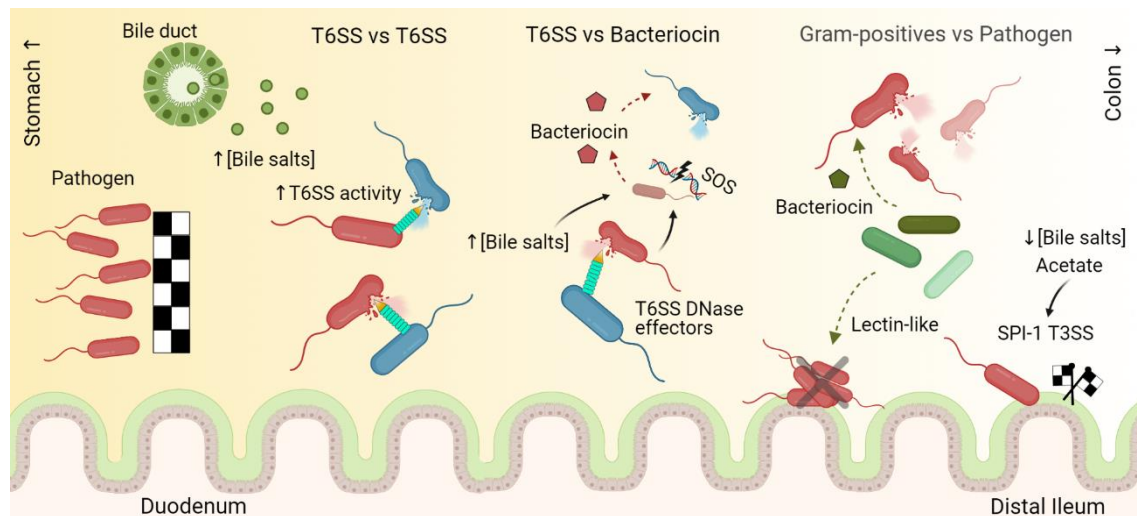


Figura 3. Estratégias de antagonismo entre *Salmonella* e a microbiota durante a corrida até o patógeno induzir inflamação. Após sua chegada no intestino, *Salmonella* enfrenta vários microrganismos comensais em diversas situações de conflito biológicos (T6SS, bacteriocinas e lectinas). O patógeno precisa chegar até o íleo distal para invadir o epitélio e secretar efetores, induzindo inflamação e modulando o ambiente a seu favor durante o curso da infecção. Imagem retirada de SIBINELLI-SOUSA *et al.* (2021).

1.2 Sistema de secreção do tipo 6

Espécies Gram-negativas como *Salmonella* spp. utilizam o T6SS para competir com outras células no seu ambiente (HERNANDEZ; GALLEGOS-MONTERROSA;

COULTHURST, 2020; MULDER *et al.*, 2012; SANA *et al.*, 2016). O T6SS é uma nanomáquina contrátil, relacionada evolutivamente à cauda contrátil do bacteriófago T4 (LEIMAN *et al.*, 2009b). O T6SS é composto por 13 proteínas, e atua de modo dependente de contato, secretando proteínas anti-eucarióticas e/ou antibacterianas - denominadas de efetores - dentro de células-alvo com as quais entra em contato (HACHANI; WOOD; FILLOUX, 2016; JANA; SALOMON, 2019). Os efetores do T6SS são secretados via interação com componentes estruturais do sistema, como Hcp (*hemolysin co-regulated protein*), VgrG (*valine-glycine repeat protein*) ou PAAR (*proline-alanine-alanine-arginine*), que formam o tubo ejetado em direção à célula-alvo (JANA; SALOMON, 2019). Adicionalmente, alguns efetores apresentam-se como domínios fusionados à região C-terminal dessas mesmas proteínas estruturais (COULTHURST, 2019; JANA; SALOMON, 2019).

Os mecanismos de ação dos efetores T6SS são bastante diversos, e atuam sobre componentes de processos vitais para as células alvo, tais como: 1) amidases e glicohidrolases, que atuam sobre a parede celular (MA *et al.*, 2018; RUSSELL *et al.*, 2012; SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2020; WHITNEY *et al.*, 2013); 2) lipases que atacam na membrana interna (RUSSELL *et al.*, 2013; SCHWARZ *et al.*, 2014); 3) DNases e RNases que atuam sobre os ácidos nucleicos (BURKINSHAW *et al.*, 2018; FITZSIMONS *et al.*, 2018; JANA *et al.*, 2019; KOSKINIEMI *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2014; PISSARIDOU *et al.*, 2018; WANG, S. *et al.*, 2021; YADAV *et al.*, 2021); 4) proteínas formadoras de poros que desestabilizam o equilíbrio iônico da membrana citoplasmática (MARIANO *et al.*, 2019); 5) NADases, que desequilibram energeticamente a célula ao degradar NAD⁺ e NADP⁺ (TANG *et al.*, 2018; WHITNEY *et al.*, 2015); 6) ADP-ribosil transferases (JURÉNAS *et al.*, 2021; SUAREZ *et al.*, 2010) que causam modificações pós-traducionais que interferem em uma gama de processos distintos, como a organização do citoesqueleto (MA; MEKALANOS, 2010; PUKATZKI *et al.*, 2007; RAY *et al.*, 2017; SHIMIZU *et al.*, 2019). Além disso, efetores do T6SS podem atuar como ligantes de metais que auxiliam na captação de micronutrientes (Zn²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺ e Cu²⁺) (DESHAZER, 2019; HAN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2017; SI; WANG; *et al.*, 2017; SI; ZHAO; *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Nos sistemas envolvidos em competição entre bactérias, o efector antibacteriano é codificado ao lado de uma proteína de imunidade, que confere proteção contra autointoxicação (HERSCH; MANERA; DONG, 2020).

Em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium (*S.* Typhimurium), foram identificados somente dois efetores até o momento. Tae4 (*type VI amidase effector 4*) é uma toxina com atividade antibacteriana que hidrolisa o peptidoglicano através de uma atividade de D,L-endopeptidase (BENZ; REINSTEIN; MEINHART, 2013; RUSSELL *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013); e Tlde1 (*type VI L,D-transpeptidase effector 1*), que possui atividade de L,D-carboxipeptidase e L,D-transpeptidase de troca de D-aminoácidos (SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo identificou dois efetores contendo o domínio VRR-Nuc (*virus-type replication-repair nuclease*) secretados por SPI-22 T6SS de *S. bongori*, que causam danos no DNA (HESPANHOL *et al.*, 2021).

Recentemente, um consórcio internacional de pesquisadores completou o sequenciamento de 10 mil genomas de *Salmonella* (10KSG) (PEREZ-SEPULVEDA *et al.*, 2021). Ao final deste projeto, 6117 genomas que passaram os critérios de qualidade para sequenciamento e montagem foram disponibilizados (PEREZ-SEPULVEDA *et al.*, 2021). Esses genomas foram gentilmente compartilhados pelo Prof. Jay Hinton (*University of Liverpool*) com nosso grupo. O Prof. Robson Francisco de Souza iniciou uma análise para identificar o repertório de efetores T6SS codificados nestes 10K genomas (dados não publicados descritos na seção de materiais e métodos).

A identificação do repertório de efetores secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp. é essencial para entender a contribuição desse sistema para a biologia desse grupo de bactérias. Assim, este trabalho de mestrado teve como objetivo selecionar um candidato identificado nas análises descritas acima para caracterização, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*. O candidato escolhido contém um domínio característico da superfamília NlpC/P60 (*New lipoprotein C from Escherichia coli and 60 kDa extracellular protein of Listeria monocytogenes*) (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Esse candidato foi temporariamente denominado Tox241, e sua respectiva proteína de imunidade foi denominada Imm241.

1.3 Superfamília NlpC/P60

A superfamília NlpC/P60 possui representantes em todos os domínios, de proteínas bacterianas a representantes eucarióticos, vírus e algumas arqueias (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Esta superfamília é amplamente distribuída e compreende proteínas com dobramento α/β , similar ao das peptidases *papain-like* (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Seu domínio catalítico é caracterizado pela

presença de uma tríade composta por uma cisteína, uma histidina e um aminoácido polar (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Esses resíduos catalíticos característicos das NlpC/P60, descritos no mesmo trabalho que introduziu sua classificação em 2003 (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003), são preservados nas diferentes enzimas da superfamília, incluindo enzimas com atividades tão distintas como fosfolipases, peptidases e acetiltransferases (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003; GAO *et al.*, 2006; SENKEVICH *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2011). O aminoácido polar da tríade catalítica auxilia a histidina a direcionar o substrato dentro do sítio catalítico, posicionando-o adequadamente para que a cisteína possa realizar um ataque nucleofílico (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003; CSTORER; MÉNARD, 1994).

A diversidade observada na superfamília NlpC/P60 inclui variações na localização, na sequência primária da proteína, dos resíduos da tríade catalítica (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Essa variação permitiu definir dois grandes grupos de proteínas, conhecidos como NlpC/P60 canônicas e permutadas, considerando a posição dos resíduos catalíticos (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003; XU *et al.*, 2011). As NlpC/P60 canônicas são aquelas que possuem a cisteína na região N-terminal da proteína, enquanto o resíduo de histidina encontra-se na região C-terminal, mantendo um resíduo de glicina, quase sempre vizinho de um resíduo de ácido aspártico, entre a cisteína e a histidina (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003) (Figura 4). Por outro lado, as NlpC/P60 permutadas são caracterizadas pela inversão da sequência primária, que posiciona a histidina para a região N-terminal enquanto a cisteína passa à porção C-terminal, e o resíduo de glicina conservado, antes central, passa a se posicionar na porção mais amino-terminal da região catalítica da proteína (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003) (Figura 4). Essa inversão altera a ordem dos elementos de estrutura secundária conservados, mas preserva a estrutura tridimensional da superfamília. Nas proteínas canônicas, o domínio catalítico das NlpC/P60 inicia-se aproximadamente 25-30 resíduos antes da cisteína, e termina entre 40-55 resíduos após a histidina (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003).

Dentro da superfamília NlpC/P60, existem quatro famílias: *P60-like*, *AcmB/LytN-like*, *LRAT-like* e *YiiX/YaeF/Poxvirus G6R-like* (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). As famílias *P60-like* e *AcmB/LytN-like* formam o grupo das NlpC/P60 canônicas, enquanto *LRAT-like* e *YiiX/YaeF/Poxvirus G6R-like* formam o grupo das NlpC/P60 permutadas (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Algumas

proteínas pertencentes à família YiiX/YaeF/Poxvirus G6R-like, do grupo de NlpC/P60 permutadas, já foram identificadas como efetores do T6SS, são: Tse1 (HOOD *et al.*, 2010; ZHANG, H. *et al.*, 2012), Tse3 (DONG *et al.*, 2013), Tae4 (BENZ; REINSTEIN; MEINHART, 2013) e TseH (ALTINDIS *et al.*, 2015; HERSCH *et al.*, 2020). No entanto, nenhuma proteína identificada como LRAT-like foi descrita como uma toxina utilizada em conflitos (micro)biológicos. Nesse contexto, Tox241 se destacou na análise bioinformática por ser um possível novo efetor da superfamília NlpC/P60, secretado pelo T6SS de *Salmonella*, e cuja relação com os outros membros da superfamília era, até então, obscura.

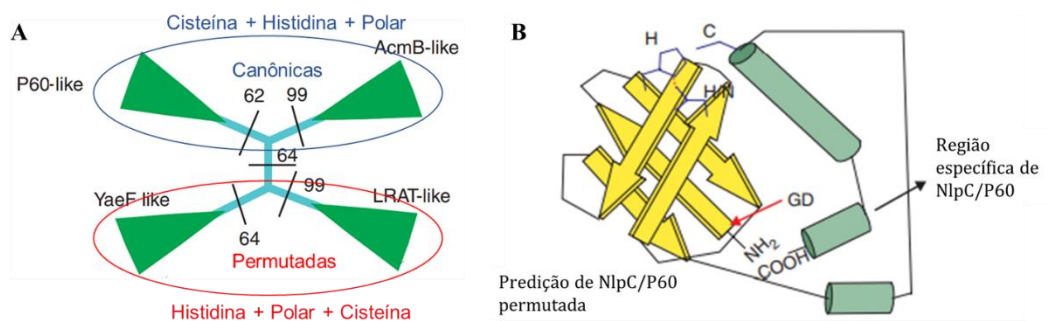


Figura 4. Características de membros da superfamília NlpC/P60. **A.** Divisão da superfamília NlpC/P60 entre permutadas (círculo vermelho) e canônicas (círculo azul), números marcam os valores de *bootstrap* dos ramos da árvore. **B.** Estrutura em dobramento $\alpha+\beta$ das NlpC/P60 permutadas. GD é a marcação de onde se encontra a díade de glicina e aspartato. Imagens adaptadas de ANANTHARAMAN e ARAVIND (2003).

2. Objetivo

Caracterização de um novo efetor pertencente à superfamília NlpC/P60 secretado pelo T6SS de *Salmonella* spp.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Avaliar se Tox241 é tóxica quando expressa em *Escherichia coli*;
- 2) Entender a relação evolutiva de Tox241 com outras proteínas da superfamília NlpC/P60;
- 3) Analisar a diversidade funcional dos homólogos de Tox241 utilizando métodos de contexto genômico;
- 4) Estudar o mecanismo de ação de Tox241 utilizando predição de estruturas terciárias e *docking* molecular.

3. Material e Métodos

3.1 Cepas e cultivo

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorotipo Oranienburg (*S. Oranienburg*), e células de *E. coli* DH5 α , BL21(DE3) e SHuffle foram cultivadas a 37°C em meio LB (*Lysogeny Broth*) contendo 1% NaCl, 1% triptona e 0,5% extrato de levedura, sob agitação a 200 rpm (rotações por minuto), exceto quando indicadas outras condições. Culturas foram suplementadas com antibióticos quando necessário: 50 μ g/mL canamicina e 50 μ g/mL estreptomicina.

3.2 Clonagens

Iniciadores para cada gene de interesse foram desenhados para conter regiões de reconhecimento para enzimas de restrição (Tabela 1), e utilizados para amplificar o gene de interesse a partir de DNA genômico utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase). As seguintes condições foram utilizadas: 10 mM de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados); 10 μ M de cada iniciador; 1 U da enzima polimerase Phusion™ (ThermoFisher #F-530L) e seu respectivo tampão de reação. As seguintes condições de ciclagem foram utilizadas: 98 °C por 3 min para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 98 °C por 30 s para desnaturação; temperatura e tempo de anelamento específicos para cada iniciador calculados utilizando a ferramenta *Tm Calculator* (ThermoFisher *Scientific Web Tools*) (Tabela 1); extensão a 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 5 min. Após a PCR, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados utilizando GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher #K0702). Foi utilizado o plasmídeo pBRA (SOUZA *et al.*, 2015) e pBRA contendo peptídeo sinal *pelB* (BAYER-SANTOS *et al.*, 2019) para clonagem e expressão de *tox241*, e o plasmídeo pEXT22 (DYKXHOORN; ST. PIERRE; LINN, 1996) para clonagem de *imm241* para os ensaios de toxicidade em *E. coli*. Para expressão das proteínas recombinantes foram utilizados os plasmídeos pET28a (Novagen #69864-3) e pRSFDuet (Novagen #71341-3). O gene de interesse e os plasmídeos correspondentes foram digeridos com enzimas de restrição por 3 h, purificados e submetidos à ligação com enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™ #100004917) por 16 h a 16 °C em concentrações molares 1:1 e 1:3 (vetor:inserto) (*LIGATION CALCULATOR* – AG Molecular Biophotonics). O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 α cálcio competentes, e a seleção dos clones recombinantes foi realizada após extração dos plasmídeos por lise alcalina e digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na etapa de clonagem. Os clones escolhidos

foram posteriormente sequenciados pelo método de Sanger (SANGER; COULSON, 1975).

Tabela 1 - Lista de iniciadores utilizados neste trabalho.			
Primers	Sequência* (5' -3')	Propósito	Temp. Anelamento
EBS 464-F (NcoI)	AATTCATGGGTGTGAAAGACTTATGGCAGAC	Clonar <i>tox241</i> em pBRA e pBRA pelB	59 °C
EBS 465-R (SalI)	TATAGTCGACTTATTGTTCATTGTATGAACTCC	Clonar <i>tox241</i> em pBRA e pBRA pelB	58 °C
EBS 466-F (BamHI)	AATAGGATCCAGGAGGAATTCACCATGACAAAT AAATTCTGGATACG	Clonar <i>imm241</i> em pEXT22	58 °C
EBS 467-R (HindIII)	ATATAAGCTTTTATCTTATTTTTTTGAAAGCCAG	Clonar <i>imm241</i> em pEXT22	57 °C
EBS 514-F (XhoI)	TATACTCGAGTTTGTTCATTGTATGAACTCCC	Clonar <i>tox241</i> em pET28a com His-tag C-terminal	59 °C
EBS 515-F (NheI)	AATTGCTAGCGTGAAAGACTTATGGCAGAC	Clonar <i>tox241</i> em pET28a com His-tag N-terminal	59 °C
EBS 516-R (BamHI)	TATAGGATCCTTATTGTTCATTGTATGAACTCC	Clonar <i>tox241</i> em pET28a com His-tag N-terminal	58 °C
EBS 517-F	GGTTGAAACCACAGGTGCGGGTGC GGCTTTTGT CTCTGTACATATGG	Mutação pontual em <i>tox241</i> por SOE	78 °C
EBS 518-R	CCATATGTACAGAGACAAAAGCCGCACCCGCAC CTGTGGTTTCAACC	Mutação pontual em <i>tox241</i> por SOE	78 °C
EBS 519-F	GATGTAACCGGAAATAATGCGACGACACTCC GTTGAG	Mutação pontual em <i>tox241</i> por SOE	75 °C
EBS 520-R	CTCAACGGAGTGTGTCGTCGCATTATTTCCGGTT ACATC	Mutação pontual em <i>tox241</i> por SOE	75 °C
EBS 559-F (BamHI)	AATGGATCCAGTGAAAGACTTATGGCAGAC	Clonar <i>tox241</i> no MCS1 da construção 01 em pRSFDuet	58 °C
EBS 560-R (HindIII)	TATAAAGCTTTTATTGTTCATTGTATGAACTCC	Clonar <i>tox241</i> no MCS1 da construção 01 em pRSFDuet	58 °C
EBS 561-F (NdeI)	GGATCCCATATGATGACAAATAAATTCTGGATACG	Clonar <i>imm241</i> no MCS2 da construção 01 em pRSFDuet	58 °C
EBS 562-R (XhoI)	ATTCTCGAGTTATCTTATTTTTTTGAAAGCCAG	Clonar <i>imm241</i> no MCS2 da construção 01 em pRSFDuet	58 °C
EBS 563-F (NdeI)	GGATCCCATATGAACTACTCGGAAACGATGAG	Clonar <i>imm241</i> ₃₃₋₆₂ no MCS2 da construção 02 em pRSFDuet	60 °C
EBS 564-R (XhoI)	TAACCTCGAGTTAATAATTATGATCCGATAAGAG TTGTC	Clonar <i>imm241</i> ₃₃₋₆₂ no MCS2 da construção 02 em pRSFDuet	60 °C
EBS 565-R (XhoI)	TAACCTCGAGTTAGTGGTGATGATGGTGATGTCTT ATTTTTTTGAAAGCC	Clonar <i>imm241</i> no MCS2 da construção 04 em pRSFDuet	57 °C
EBS 566-R (XhoI)	TAACCTCGAGTTAGTGGTGATGATGGTGATGATA ATTATGATCCGATAAG	Clonar <i>imm241</i> ₃₃₋₆₂ no MCS2 da construção 05 em pRSFDuet	55 °C
EBS 567-R (XhoI)	AAACTCGAGTTAGTGGTGATGATGGTGATGATA ATTATGATCCGATAAG	Clonar <i>imm241</i> ₃₃₋₈₂ no MCS2 da construção 05 em pRSFDuet	57 °C
EBS 588-R (BamHI)	TATAAAGCTTTTATCTTATTTTTTTGAAAGCCAG	Clonar <i>imm241</i> e <i>tox241</i> no MCS1 da construção 07 em pRSFDuet	58 °C

*Enzimas de restrição estão sublinhadas e os nucleotídeos adicionais para constituir a fase de leitura correta estão em negrito.

3.3 Ensaio de toxicidade em *Escherichia coli*

O ensaio de toxicidade em *E. coli* foi realizado pelo estudante de iniciação científica Gustavo Chagas Santos (Projeto FAPESP #2020/15389-4) de acordo com o protocolo descrito por BAYER-SANTOS *et al.* (2019). Resumidamente, linhagens de *E. coli* DH5 α carregando o plasmídeo pBRA (SOUZA *et al.*, 2015) contendo o gene do efector *tox241* sob controle do promotor P_{BAD} (indução por L-arabinose e repressão por D-glicose), e o plasmídeo pEXT22 (DYKXHOORN; ST. PIERRE; LINN, 1996) contendo o gene da proteína de imunidade cognata (*imm241*) sob controle do promotor P_{TAC} (indução por IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e repressão por D-glicose) foram crescidas em meio LB a 37°C por 16 h, e a densidade ótica de cada amostra foi medida a 600nm (OD_{600nm}) e ajustada para 1.0. Em seguida, cada amostra foi diluída em série (1:4). Em seguida, 5 μ L de cada diluição foram depositados em placas com LB-ágar

acrescidos de 0,2% D-glicose ou 0,2% L-arabinose e 200 mM IPTG. As placas foram incubadas a 37°C por 16-24 h e fotografadas.

3.4 Expressão de proteínas e *western blotting*

Inicialmente, 6 mL de cultura de *E. coli* SHuffle ou BL21(DE3) carregando o plasmídeo pET28a ou pRSFDuet contendo os genes *tox241* e/ou *imm241* foram crescidas em meio LB até OD_{600nm} 0.6. Em seguida, foi coletado 1 mL como fração não induzida, centrifugado a 9400 g por 2 min para precipitar as células, e desprezado o sobrenadante. Foi adicionado tampão de amostra SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% dodecil sulfato de sódio, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol), mantendo uma proporção final de 100 µL de tampão para cada 1 mL de *pellet* de células de cultura em OD_{600nm} 1.0, adicionado de 5 µL de inibidor de protease (Thermo Scientific #A32965). A cultura restante (5 mL) foi acrescida de 200 mM de IPTG, e crescida por adicionais 16 h a 25°C sob agitação (200 rpm). Após a indução, a cultura foi centrifugada (3200 g por 10 min), o sobrenadante descartado e as células suspensas em 750 µL do tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4 e 200 mM NaCl). As células foram lisadas com sonificador (Sonics Vibra-Cell VCX) em gelo em sequências de 20 s com amplitude de onda de 30%, até a amostra apresentar um padrão visual transparente. Após a lise celular, a amostra foi centrifugada a 13500 g por 15 min a 4°C para separação da fração solúvel e insolúvel. Foram coletados 50 µL do sobrenadante e acrescidos 50 µL do tampão de amostra SDS-PAGE. O sobrenadante restante foi descartado, e o precipitado foi eluído em 750 µL do tampão de amostra, compondo a fração insolúvel.

As frações induzidas (solúvel e insolúvel) ou não-induzidas foram desnaturadas a 100°C por 15 min, e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) a 100 V por 60 min. Em seguida, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,2 µm com sistema semi-seco (Bio-Rad TranBlot® SD) utilizando 10 V por 30 min. A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% e Tween20 0,05% em tampão fosfato salina (PBS) por 2 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-histidina conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich #A7058) (diluição 1:10000) por 2 h. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com PBS/0,05% Tween20. A detecção do sinal da membrana foi realizada utilizando o substrato luminol e H₂O₂ (Pierce™ ECL Western Blotting #32106).

3.5 Splicing by overlap extension

Splicing by overlap extension (SOE) PCR é uma técnica simples, que utiliza a amplificação de segmentos de gene sobrepostos por PCR para criar mutações ou quimeras de genes (HECKMAN; PEASE, 2007). Para este fim, utilizamos iniciadores que carregam nucleotídeos modificados para a mutação do resíduo desejado, e iniciadores que flanqueiam o gene (Tabela 1), para gerar produtos de PCR intermediários em uma primeira PCR (Figura 5). Os produtos intermediários são desnaturados e usados como molde na segunda etapa de PCR (Figura 5), quando as fitas simples anelam em suas regiões de sobreposição que contém a região de mutação desejada. A amplificação do produto de PCR nessa etapa é realizada pelos iniciadores externos, gerando o produto final que foi então clonado no vetor pBRA *pelB*.

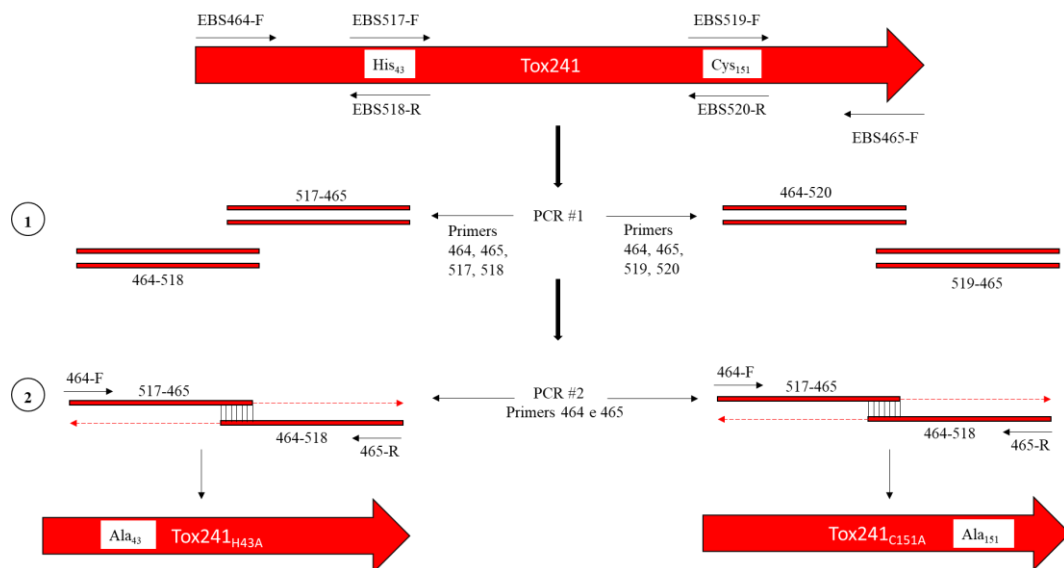


Figura 5. Esquema de produção de mutações pontuais nos resíduos catalíticos de Tox241 utilizando PCR SOE. Técnica de PCR *splicing by overlap extension* utilizada para gerar mutações pontuais em Tox241.

3.5 Análises bioinformáticas

3.5.1. Coleta de homólogos de NlpC/P60 permutadas

Foi realizada coleta iterativa de homólogos com a ferramenta jackhmmer do pacote HMMER (POTTER *et al.*, 2018), e o banco de dados de sequências não redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), inserindo como *queries* a sequência de aminoácidos da região catalítica de Tox241₂₀₋₁₇₀ (FD01848827_04209), do efetor do T6SS TseH (AAF96194.1) que pertence a superfamília NlpC/P60 (ALTINDIS *et al.*, 2015; HERSCH *et al.*, 2020) e representantes das famílias de proteínas NlpC/P60 permutadas descritas por ANANTHARAMAN e

ARAVIND (2003): YaeF (NP_414735.1), YiiX (NP_290574.1), MC062R (NP_044013), CPXV094 (NP_619881), FAM84A (AAH26346), LRAT (NP_004735), HREV107 (PLAT3_HUMAN). Essa busca iterativa foi executada até 5 iterações, resultando na coleta de 342.517 proteínas. Ao aplicar um limite de *e-value* máximo de 10^{-30} , foi obtido um universo de 24.510 proteínas para o estudo. Utilizando o software mmseqs com configurações padrões (HAUSER; STEINEGGER; SÖDING, 2016), foi possível agrupar as sequências com parâmetros de 80% de cobertura e um *e-value* menor ou igual a 10^{-3} , dos quais um membro foi selecionado para as análises subsequentes. Um segundo nível de agrupamento foi aplicado utilizando 70% de identidade e 80% de cobertura para remover a redundância das sequências.

Tabela 2 – Proteínas utilizadas na busca com Jackhmmmer		
Proteína (número de acesso)	Resíduos	Família
Tox241	20-170	Predita como LRAT-like
TseH (AAF96194.1)	40-180	YaeF/YiiX-like
YaeF (NP_414735.1)	70-160	YaeF/YiiX-like
YiiX (NP_290574.1)	15-160	YaeF/YiiX-like
MC062R (NP_044013)	5-170	YaeF/YiiX-like
CPXV094 (NP_619881)	10-155	YaeF/YiiX-like
FAM84A (AAH26346)	110-240	LRAT-like
LRAT (NP_004735)	38-181	LRAT-like
HREV107 (PLAT3_HUMAN)	1-135	LRAT-like

3.5.2. Construção da árvore filogenética

Após a coleta e definição dos grupos de homólogos, foi realizado um alinhamento das sequências de aminoácidos que equivalem à porção catalítica de Tox241 (Tox241₂₀₋₁₇₀) utilizando a ferramenta MAFFT (KATOY *et al.*, 2005). Em seguida, foi realizada a construção de uma árvore filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança com o programa *FastTree* (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2009). Uma seleção manual dos grupos de homólogos para compor a árvore, levando em consideração a quantidade de sequências representadas e os domínios detectados pelo Pfam, permitiu eliminar ramos longos e refinar os valores de suporte dos nós internos (*bootstrap*).

3.5.3. Predição de estrutura terciária

A predição de estrutura tridimensional de Tox241 foi realizada utilizando a ferramenta AlphaFold2 (MIRDITA *et al.*, 2022), solicitando 5 modelos por vez e mantendo aquele com maior *Local Distance Difference Test* (IDDT) (MARIANI *et al.*,

2013). A predição utilizando a sequência completa de aminoácidos de Tox241 não apresentou resultado satisfatório de IDDT em nenhum dos modelos, por isso foi utilizado somente a sequência da porção catalítica (Tox241₂₀₋₁₇₀), que resultou em uma predição mais confiável.

3.5.4. Docking molecular

O *docking* molecular da estrutura predita de Tox241₂₀₋₁₇₀ e a estrutura da fosfatidiletanolamina (PubChem CID 5327011) foram preparados com o auxílio da ferramenta *AutoDockTools* para obter a informação em arquivos PDBQT (*Protein Data Bank* (PDB), *Partial Charge* (Q), & *Atom Type* (T)) gerando um arquivo contendo coordenadas necessárias para o *AutoGrid* e *AutoDock*. As cargas de Kollman e os hidrogênios foram adicionados, e os arquivos foram transferidos para o *AutoDock Vina* (Trott; Olson, 2010), que utilizou a proteína rígida com o ligante flexível com valores padrões de *energy_range* igual a 4 e *exhaustiveness* igual a 8. O centro do *grid box* (0.559, 0.894, 0.618 Å) foi ajustado na região catalítica, com um tamanho de 40 × 40 × 40 Å que cobriu totalmente a região catalítica. O resultado do *AutoDock Vina* gerou 9 posições, e aquela com melhor afinidade foi utilizada para visualização no programa PyMOL (Schrodinger, 2015). A constante de dissociação (Kd) foi calculada utilizando o valor de energia livre (ΔG) na seguinte equação: $\Delta G = RT \ln(Kd)$, onde R é a constante dos gases (1.98 cal/K mol) e T é a temperatura (300 K).

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudo de um novo efector do T6SS de *Salmonella*

Para identificar o repertório de efetores T6SS codificados nestes 10K genomas de *Salmonella* o Prof. Robson Francisco de Souza iniciou uma análise, e localizou *loci* contendo genes do T6SS, efetores e proteínas de imunidade associados com este sistema utilizando pHMMs (*profile Hidden Markov models*) (dados não publicados). As regiões genômicas compreendendo 5 genes a jusante e a montante dos genes estruturais do T6SS foram analisadas em busca de novos efetores do T6SS. As seguintes abordagens foram utilizadas para identificar novos efetores: 1) modelos de componentes do T6SS obtidos do Dr. Eduardo Rocha (ABBY *et al.*, 2016) e do banco de dados Pfam (Mistry *et al.*, 2020) foram usados para identificar os *loci* do sistema nos genomas sob análise; 2) modelos de toxinas obtidos do Pfam foram utilizados para detectar famílias de toxinas

presente nos genomas; 3) modelos de toxinas gentilmente cedidos pelo Dr. Iyer Aravind (*National Institute of Health*) (ZHANG, D. *et al.*, 2012) foram utilizados para identificar genes de toxinas polimórficas localizados preferencialmente na vizinhança do T6SS; e 4) seleção de candidatos a efetores baseada na predição do software BastionX (WANG, J. *et al.*, 2021).

A partir dos resultados dessas análises foram identificadas 3975 proteínas, agrupadas em 220 grupos por similaridade, as quais foram submetidas a buscas por homólogos remotos, utilizando a ferramenta HHpred (HILDEBRAND *et al.*, 2009). Entre as proteínas analisadas que apresentavam similaridade a domínios com potencial para atuarem como efetores tóxicos, foram selecionados arbitrariamente alguns candidatos para caracterização funcional por nosso grupo. Devido à natureza da cooperação internacional do projeto 10KSG, foi dada prioridade para conseguir cepas geograficamente próximas. No Brasil, algumas cepas do projeto 10KSG estavam de posse do Prof. Cristiano Gallina Moreira (Unesp – Campus Araraquara), o qual gentilmente as cedeu para que pudéssemos realizar ensaios funcionais.

Com as cepas de *Salmonella* disponíveis, escolhemos caracterizar um candidato que apresentava o domínio NlpC/P60 permutado, ainda não caracterizado funcionalmente (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). O candidato foi clonado a partir de DNA de *S. Oranienburg*, cepa denominada 241/03-CM no projeto 10KSG. Em função do nome da cepa de origem, a toxina foi provisoriamente renomeada para Tox241 (número de acesso FD01848827_04209 no projeto 10KSG). Tox241 é uma proteína de 279 aminoácidos que apresenta similaridade ao efector do T6SS de *Vibrio cholerae* denominado TseH (ALTINDIS *et al.*, 2015) (Figura 6).

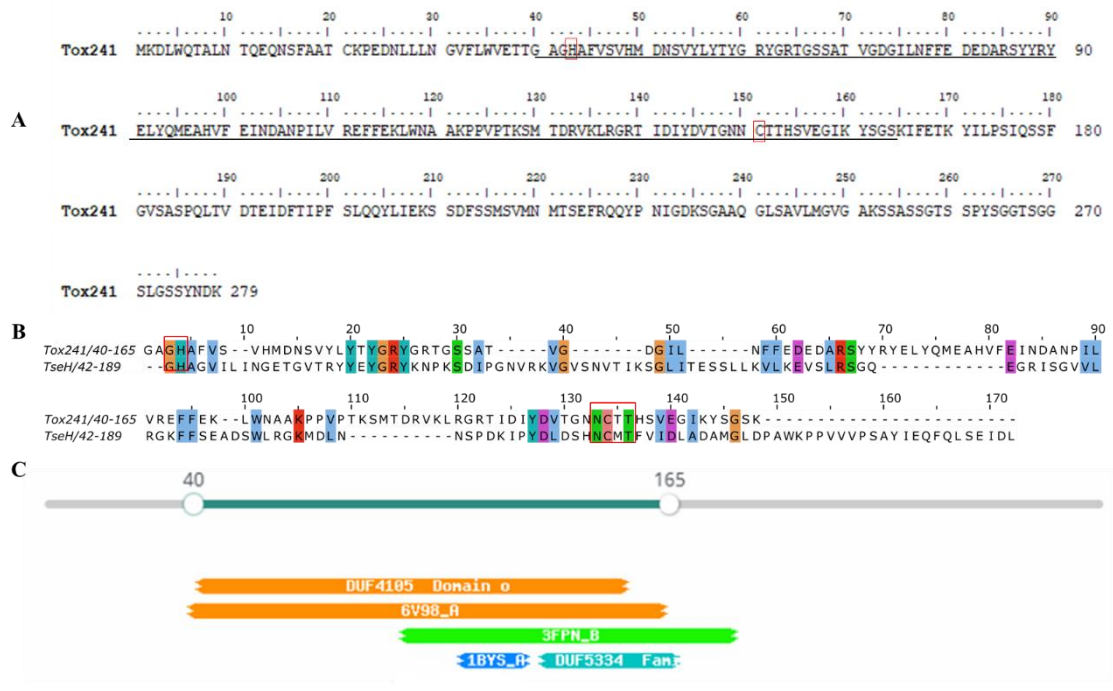


Figura 6. Tox241 possui região homóloga ao efetor TseH de *Vibrio cholerae*. **A.** Sequência de Tox241 com seus resíduos catalíticos de cisteína e histidina destacados em vermelho. A região de homologia com TseH está sublinhada. **B.** Alinhamento da região de homologia entre os resíduos 40 a 165 de Tox241 e os resíduos 42 a 190 de TseH. Resíduos alinhados com 100% de identidade ou com mesma característica estão destacados. **C.** Resultado de HHpred mostrando similaridade (95,3% de probabilidade) entre Tox241 e a estrutura do efetor TseH (PDB:6V98_A) de *V. cholerae*.

Considerando que proteínas de imunidade são tipicamente codificadas adjacentes aos genes das toxinas cognatas (HERSCH; MANERA; DONG, 2020; ZHANG, D. *et al.*, 2012), foi observado que na mesma região genômica de Tox241, é codificada uma pequena proteína de 86 aminoácidos que possui duas regiões transmembrana, sendo que uma das hélices está contida em uma região com alta similaridade com o modelo do Pfam denominado DUF4229, que não possui função conhecida (Figura 7). Considerando a posição desse gene no genoma, hipotetizamos que esta seria a provável proteína de imunidade para Tox241, e a denominamos Imm241 (Figura 7).

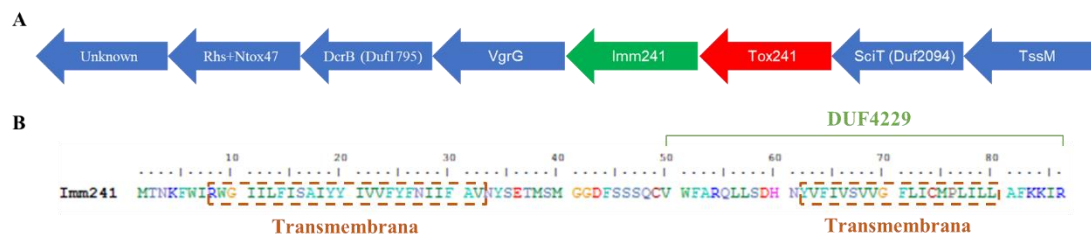


Figura 7. Contexto genômico de Tox241 em *S. Oranienburg*. **A.** Representação gráfica do cluster gênico de Tox241 (vermelho) e sua proteína de imunidade cognata Imm241 (verde) junto com outros genes estruturais de T6SS (VgrG e TssM). **B.** Sequência de aminoácidos de Imm241, com seus domínios transmembrana e DUF4229 destacados. As regiões transmembrana foram identificadas utilizando o programa TMHMM (KROGH *et al.*, 2001).

Para testar se Tox241 tem efeito antibacteriano, clonamos esse efector no plasmídeo pBRA sob regulação do promotor P_{BAD} – indução por arabinose e inibição por glicose. Além disso, clonamos *tox241* no plasmídeo pBRA contendo peptídeo sinal *pelB*, que permite direcionar a proteína ao periplasma. Essa combinação permite analisar os efeitos da expressão da proteína em diferentes compartimentos celulares (citoplasma e periplasma, respectivamente). O ensaio de toxicidade em *E. coli* revelou que a indução de Tox241 no periplasma inibe o crescimento de *E. coli*, e que a co-expressão com Imm241 neutraliza o efeito tóxico (Figura 8). Esses resultados confirmaram que Tox241 é uma toxina e atua no periplasma da célula-alvo, além de demonstrar que Imm241 é sua proteína de imunidade cognata (Figura 8).

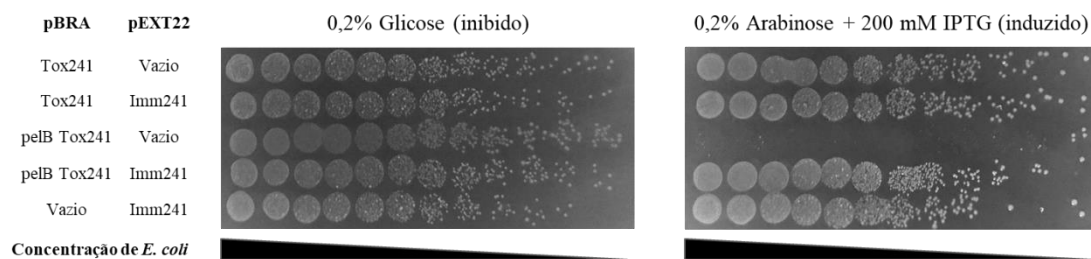


Figura 8. Tox241 possui efeito tóxico no periplasma de *E. coli* e é neutralizado por Imm241. Ensaio de toxicidade realizado em *E. coli* DH5 α mostra que a indução de Tox241 no periplasma (pelB Tox241) apresenta toxicidade, e que essa é neutralizada com a co-expressão de Imm241 (pelB Tox241 e Imm241). Imagem adquirida por Gustavo Chagas Santos.

Após demonstrar que Tox241 possui efeito tóxico no periplasma de *E. coli* e que Imm241 é sua proteína de imunidade, procurou-se mais informações sobre a superfamília NlpC/P60 que poderiam ajudar a compreender o mecanismo de ação de Tox241. A superfamília NlpC/P60 possui uma subdivisão em dois grupos: canônicas (*AcmB-like* e *P60-like*) e permutadas (*LRAT-like* e *YiiX-like*) (Figura 4A e B) (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). As canônicas possuem a cisteína catalítica na porção N-terminal, enquanto a histidina localiza-se na porção C-terminal (Figura 9A e B). Por outro lado, as permutadas possuem uma inversão na sequência em relação à díade catalítica (Cys e His) devido a troca na ordem dos elementos de estrutura secundária, mas a estrutura terciária mantém-se conservada (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003) (Figura 4). Os aminoácidos que compõem a tríade catalítica foram encontrados na sequência da Tox241 pelo estudo do alinhamento e sobreposição desta proteína com outras NlpC/P60 permutadas (ver Figura 11 e 16), nas posições Cys₁₅₁, His₄₃ e o aminoácido polar Thr₅₈, caracterizando Tox241 como uma NlpC/P60 permutada (Figura 9).

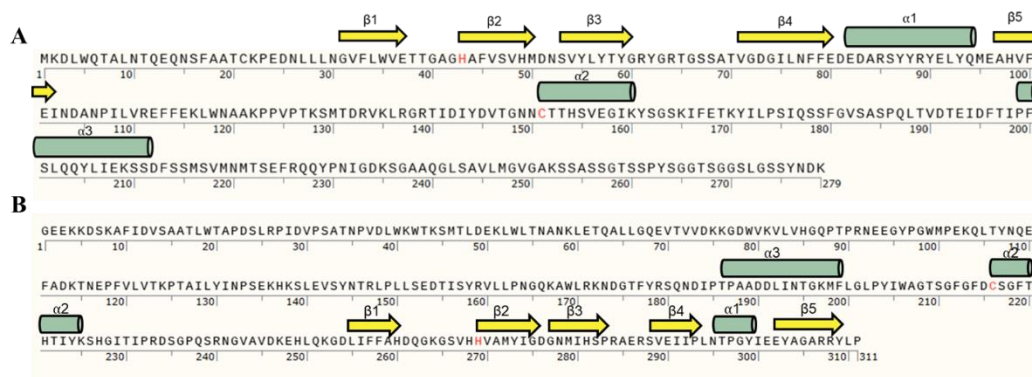


Figura 9. Resíduos catalíticos nas sequências primárias de NlpC/P60. A. Sequência de aminoácidos de Tox241, em vermelho estão demarcados os resíduos catalíticos His₄₃ e Cys₁₅₁. Acima da sequência está um esquema de estrutura secundária predita. **B.** Sequência de aminoácidos de uma NlpC/P60 canônica: Ykfc de *Bacillus cereus* ATCC 10987 (BCE_2878, PDB:3H41).

Como descrito acima, buscas por homólogos remotos de Tox241 realizadas com o software HHpred resultaram em similaridade com TseH (VCA0285), uma proteína de *V. cholerae* que atua como efetor do T6SS (ALTINDIS *et al.*, 2015), e que também pertence à superfamília NlpC/P60 (HERSCH *et al.*, 2020) (Figura 6C). Para entender a relação filogenética de Tox241 com outros membros da superfamília NlpC/P60, foram buscadas proteínas similares de Tox241 utilizando a sequência de algumas proteínas descritas como NlpC/P60 permutadas utilizando Jackhmmer (Tabela 2) (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Essas proteínas foram acomodadas em grupos pelo software MMseqs, resultando em 24.439 grupos de proteínas.

Um segundo nível de agrupamento foi aplicado para remover a redundância, ao retirar aquelas proteínas que fossem pelo menos 70% idênticas e cobrissem 80% da sequência proteica, resultando em 2.651 sequências que foram agrupadas em 33 grupos. Sequências representativas dos grupos mais abundantes foram utilizadas para inferir uma árvore filogenética (Tabela 3, Figura 10), acomodando os grupos em famílias (Figura 10).

Tabela 3 – Grupos de homólogos de Tox241 selecionados para construção da árvore filogenética.					
Grupo	Fam	Pfam (domínios identificados)	Assinaturas	nseqs	rep_seqs
WP_195599607.1	A3	TM+TM+DUF308+TM+TM	GHxD/NCVxL	930	52
EGQ13288.1	A2	Não detectado	GH/NCxT	939	58
OED51035.1	A1	RHS	GH/NCxRFV	942	210
MBT8440052.1	B3	Amidase_3+Peptidase_C92+TM	pH/CxxxV	208	54
NDF64324.1	B2	Peptidase_C92	WSH/[I V]CS	2157	325
WP_173060782.1	B1	Peptidase_C92	H/[I V]C[S T]E	1023	394
XP_027711886.1	C1	LRAT	HwxxY/NCEH	1616	287
MBO6292870.1	C2	LRAT	YxHxG/NNCExF	3470	411

Fam: subdivisões das famílias A, B e C, definidas pela filogenia das NlpC/P60 permutadas (Figura 11). **Assinaturas:** motivos conservados em pelo menos 80% das regiões catalíticas dos membros de cada grupo, os resíduos conservados das regiões da His e Cys estão separados por uma barra (/). **Nseqs:** número de sequências que compõe o grupo. **Rep_seqs:** quantidade de sequências representativas (identidade \leq 70%) em cada grupo.

A árvore revelou que Tox241 e TseH formam duas subfamílias distintas, e que compõem uma nova divisão dentro da superfamília NlpC/P60, separada das famílias LRAT-*like* e YiiX/YaeF-*like* descritas anteriormente (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003), e suportada por valores de *bootstrap* acima de 85% (Figura 10). Na filogenia da Figura 10, os ramos do grupo A contêm os homólogos de Tox241 e TseH; enquanto aqueles do grupo B possuem homólogos da peptidase YiiX e YaeF (Figura S1), e no grupo C encontram-se os homólogos de LRAT e outras fosfolipases.

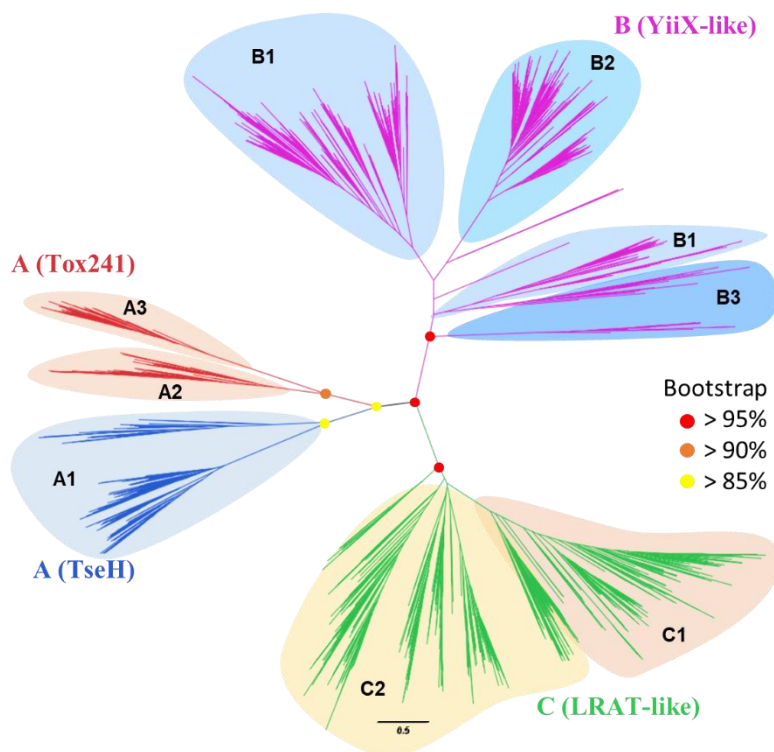


Figura 10. Tox241 e TseH formam uma nova família de NlpC/P60 permutadas. Árvore filogenética das NlpC/P60 permutadas construída utilizando seqüências de homólogos. As famílias já descritas anteriormente (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003) estão dispostas como a família C (LRAT-*like*) em verde, e família B (YiiX-*like*) em magenta. O surgimento de um novo clado inclui os homólogos de Tox241 em vermelho (A2 e A3) e TseH (A1) em azul na subfamília A. A árvore apresentada contém 1791 seqüências.

A região catalítica das NlpC/P60 compreende aproximadamente 25-30 aminoácidos, situados a montante da cisteína, mais 40-55 aminoácidos após a histidina (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003), o que permitiu identificar a região catalítica de cada família para alinhá-las. Combinando o alinhamento dessas regiões com a predição de estrutura secundária de cada uma das famílias, foram identificados elementos conservados importantes para cada uma das famílias (Figura 11).

O núcleo catalítico das NlpC/P60 apresenta cinco fitas- β e três α -hélices, corroborando o observado anteriormente em uma análise estrutural de NlpC/P60 permutadas (XU *et al.*, 2011). Apesar desta semelhança, cada família organiza suas estruturas secundárias e resíduos de um modo diferente (Figura 11). A família A, apesar de manter a fita β_1 , não possui um par de aminoácidos glicina e ácido aspártico (GD) conservados antes dessa fita. Essa extensão de glicina e aspartato é encontrada nas NlpC/P60 canônicas como uma inserção entre o resíduo N-terminal de cisteína e o C-terminal de histidina (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003), o qual no evento de permutação topológica tornaram-se os resíduos mais N-terminais das NlpC/P60 permutadas (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). No entanto, o par de resíduos conservados GD é perdido na nova família A, que não apresenta resíduos altamente conservados na extremidade N-terminal da primeira fita característica das NlpC/P60 permutadas (Figura 11).

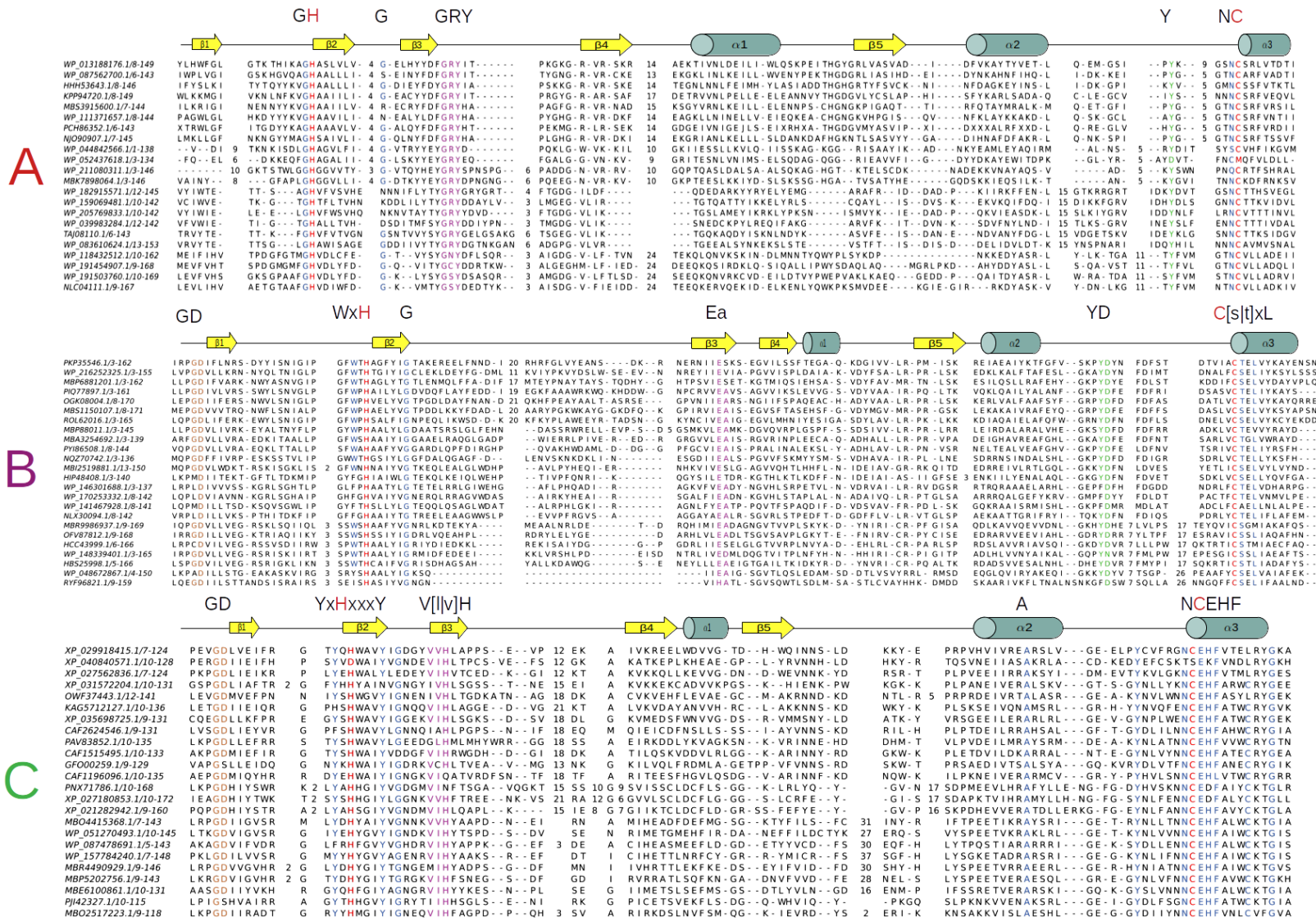


Figura 11. Alinhamentos das regiões catalíticas das 3 famílias de homólogos de Tox241. O alinhamento múltiplo das seqüências de cada uma das famílias (A, B, C) foi construído utilizando MAFFT (KATOH *et al.*, 2005) com alguns representantes de cada uma das famílias. A estrutura secundária representada na parte superior de cada alinhamento foi predita utilizando o software Jpred4 (DROZDETSKIY *et al.*, 2015) e refinada com informação de estruturas homólogas determinadas experimentalmente disponíveis nos bancos de dados (Clado A: PDB 6V98; Clado B: PDB 2IF6; Clado C: PDB 2KYT).

As assinaturas de resíduos conservados nas subfamílias de Tox241 variam, apesar de se manterem nas mesmas posições relativas às estruturas secundárias: a histidina N-terminal no começo da fita β_2 , e a cisteína C-terminal no início da hélice α_3 , que são absolutamente conservadas na porção final da região catalítica das NlpC/P60 permutadas (Figura 11). Notavelmente, os membros da família C apresentam uma segunda cisteína conservada sete resíduos após a cisteína catalítica (Figura 11). Esta segunda cisteína foi demonstrada ser importante para a função catalítica em proteínas NlpC/P60 da família LRAT-like (JAHNG; XUE; RANDO, 2003; MONDAL *et al.*, 2000). Contudo, em uma análise estrutural, esta segunda cisteína não se encontra acessível ao substrato (XU *et al.*, 2014), indicando que a segunda cisteína pode ter importância estrutural.

Entre os resíduos catalíticos (Figura 11, destacados em vermelho), uma região na fita β_3 aparece conservada, mas com resíduos específicos para cada clado. A família A possui um motivo Gly-Arg-Tyr (GRY), enquanto a família B possui um ácido glutâmico frequentemente associado com uma alanina (EA). No clado C existe um motivo de valina e histidina unido por uma leucina ou valina (V[l|v]H). A importância desses resíduos da fita β_3 ainda não está clara; porém, futuras análises poderão esclarecer o papel de cada uma dessas inserções. Ainda, foi possível notar algumas sequências onde a cisteína e histidina possivelmente catalíticas foram substituídas por outros aminoácidos. Nestes casos, é possível que a sua função tenha sido perdida ou modificada.

4.2. Predição e análise da estrutura tridimensional de Tox241

Para entender melhor o mecanismo de toxicidade de Tox241, foi iniciada uma colaboração para tentar resolver sua estrutura cristalográfica. Essa parte do projeto está sendo desenvolvida através de uma colaboração com o Prof. Gerd Prehna (*University of Manitoba*). A sequência de Tox241 foi clonada em vetor de expressão pET28a e confirmada a expressão da proteína recombinante nas cepas BL21(DE3) e SHuffle (Figura 12). Em seguida, os plasmídeos foram enviados para o grupo do Prof. Gerd. Infelizmente, até o momento, apenas uma pequena fração de proteínas foi obtida na fração solúvel, o que inviabilizou testes de cristalização.

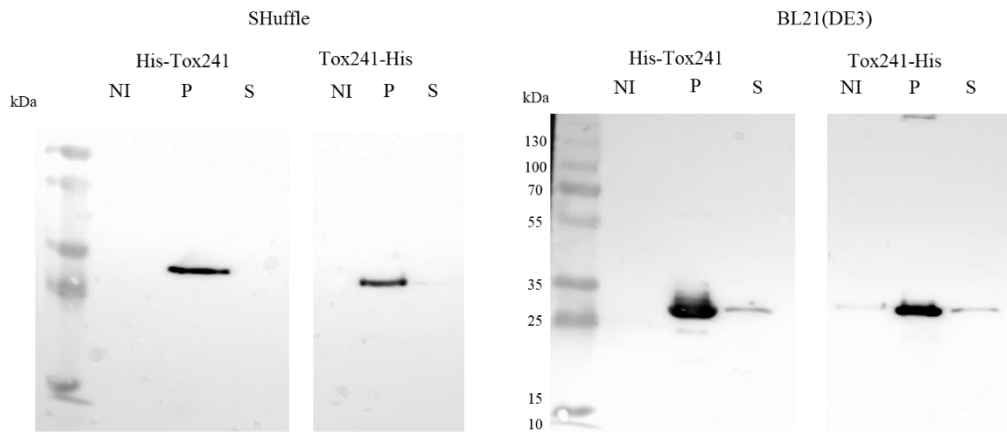


Figura 12. Expressão de Tox241 em *E. coli*. Western blot dos extratos proteicos de *E. coli* SHuffle e BL21(DE3) expressando Tox241 com 6xHis-tag no N-terminal (His-Tox241) ou C-terminal (Tox241-His). Peso molecular aparente de His-Tox241/Tox241-His: 31.4 kDa. NI (não induzido); P (fração insolúvel); S (fração solúvel).

Para tentar aumentar a solubilidade de Tox241, decidiu-se co-expressar essa proteína com sua respectiva proteína de imunidade (Imm241). Para isso, clonamos diferentes versões do par efetor e proteína de imunidade (Tox241:Imm241) em vetor de expressão pRSFDuet (Figura 13), o qual possui dois sítios múltiplos de clonagem (MCS) e promotores independentes. As construções foram desenhadas para permitir a expressão da proteína de imunidade com ou sem seus domínios transmembrana e com 6xHis-tag na porção N- e C-terminal.

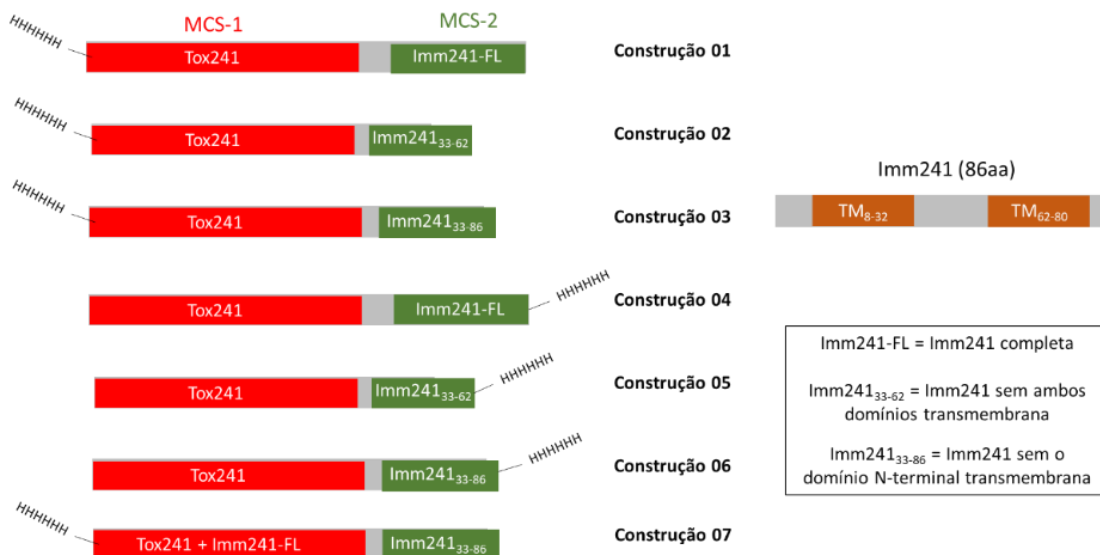


Figura 13. Diferentes construções de Tox241 e Imm241 clonadas em pRSFDuet. Desenho esquemático de sete construções clonadas em plasmídeo pRSFDuet, o qual possui dois sítios múltiplos de clonagem (MCS-1 e MCS-2).

Ensaio preliminares de co-expressão revelaram a presença de His-Tox241 nas construções 1 a 3 (Figura 14). No entanto, não foi possível detectar a expressão de

Imm241-His nas construções 4 a 5. Acredita-se que esse fato ocorre devido à dificuldade de analisar proteínas com domínios transmembrana em ensaios de *western blot* (ABEYRATHNE; LAM, 2007; FUENTES *et al.*, 2000), que está relacionado a natureza hidrofóbica e propensão das hélices transmembranas em formarem agregados (FUENTES *et al.*, 2000; KAUR; BACHHAWAT, 2009).

Da mesma maneira, também foi detectado esse problema quando foi induzida expressão de Imm241 com epítipo FLAG C-terminal (Imm241-FLAG) – em uma tentativa de determinar sua localização celular em ensaios de fracionamento celular (resultado não mostrado). Não foi possível clonar a construção 6, e com a impossibilidade de detecção de sinal de Imm241-His, decidiu-se não prosseguir com essa abordagem. As construções em pRSF foram enviadas para o Prof. Gerd Prehna dar continuidade nas tentativas de purificação e cristalização de Tox241.

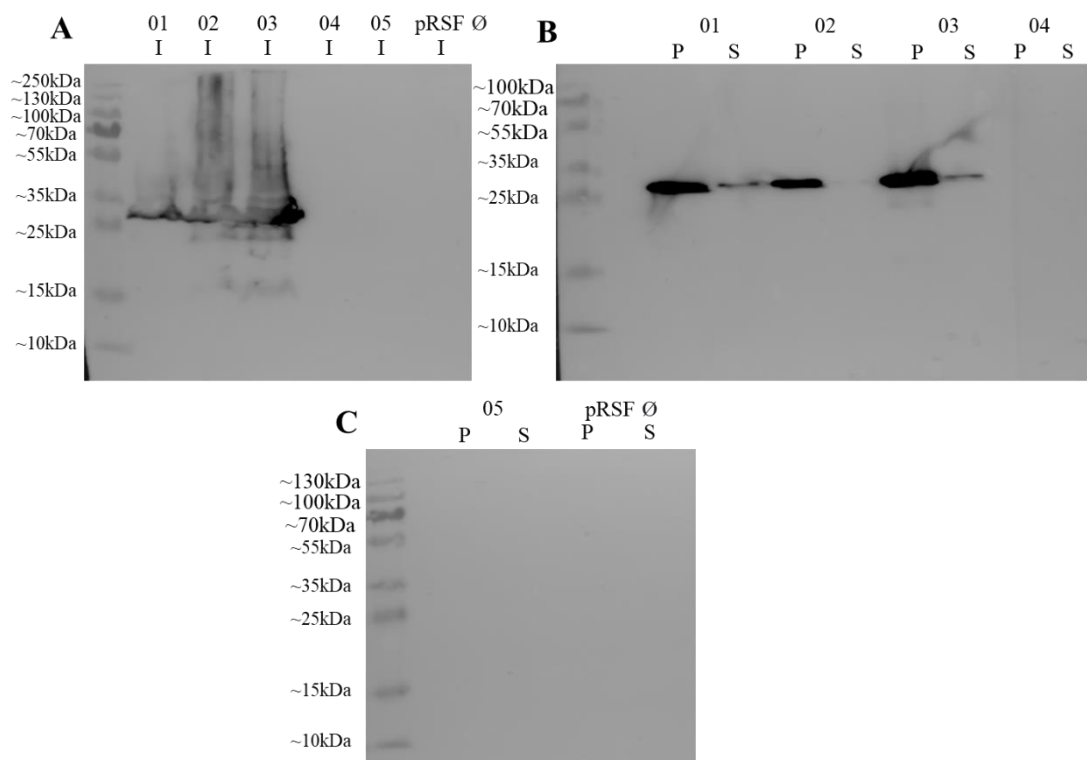


Figura 14. Expressão das construções em pRSFDuet com Tox241 e Imm241. As diferentes construções de pRSFDuet foram induzidas e analisadas por *western blot*. Frações induzidas de proteínas totais (I) das cinco construções em **A**, e frações das proteínas insolúveis (P) e solúveis (S) das construções 01 a 04 em **B** e da construção 05 em **C**. O peso molecular teórico de His-Tox241 é 31.4 kDa e Imm241-His é de 10.9 kDa.

Paralelamente aos ensaios de expressão de Tox241 e Imm241, decidiu-se por prever a estrutura de Tox241 através da ferramenta AlphaFold2 (MIRDITA *et al.*, 2022) (Figura 15). Inicialmente, ao utilizar a sequência completa de Tox241, não conseguimos uma predição satisfatória. Desse modo, foi utilizada somente a sequência da porção

catalítica (Tox241₂₀₋₁₇₀), o que permitiu uma predição com um valor de IDDT maior (Figura 15).

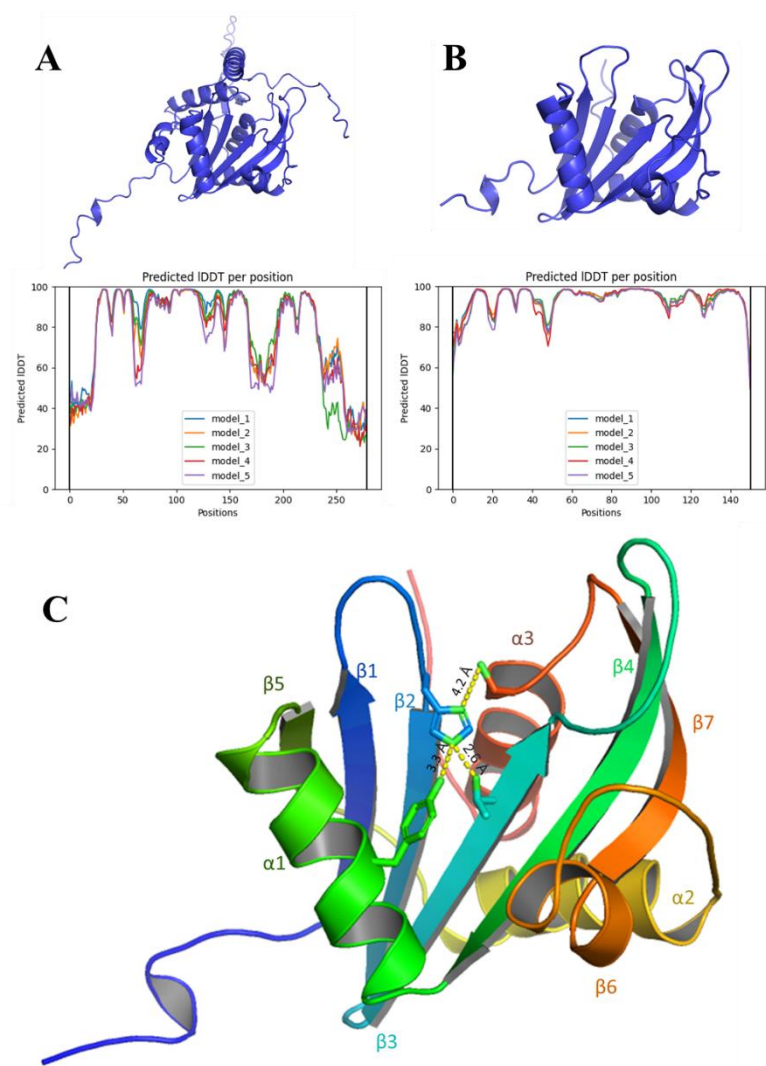


Figura 15. Predição da estrutura terciária de Tox241₂₀₋₁₇₀. A estrutura de Tox241 foi predita com o programa AlphaFold2 utilizando a sequência completa (A), e somente a porção catalítica entre aminoácidos 20-170 (B) com seus respectivos gráficos de IDDT abaixo. (C) Nesta representação, as diferentes estruturas secundárias de Tox241₂₀₋₁₇₀ estão coloridas e nomeadas, junto com os resíduos catalíticos demonstrados com suas cadeias laterais.

Anteriormente, havíamos detectado que Tox241 possui uma porção homóloga a TseH (Figura 6C). Assim, decidiu-se comparar a predição estrutural de Tox241 com a estrutura de TseH (PDB 6V98) (Figura 16). A sobreposição de TseH com Tox241 (RMSD 1.761 Å) revelou semelhança na posição e natureza dos resíduos catalíticos (Cys₁₇₂, His₆₄ e Glu₈₁ em TseH; e Cys₁₅₁, His₄₃ e Thr₅₈ em Tox241). Nessa sobreposição é possível observar que apenas a hélice α_1 de Tox241 encontra-se em uma posição diferente em relação a TseH (Figura 16). O resíduo polar de Tox241 parece ser Thr₅₈ na fita β_3 ; contudo na hélice α_1 existe uma tirosina (Tyr₈₇) que parece apontar para o interior

do sítio catalítico, e que poderia estar auxiliando a posicionar o substrato dentro do sítio catalítico.

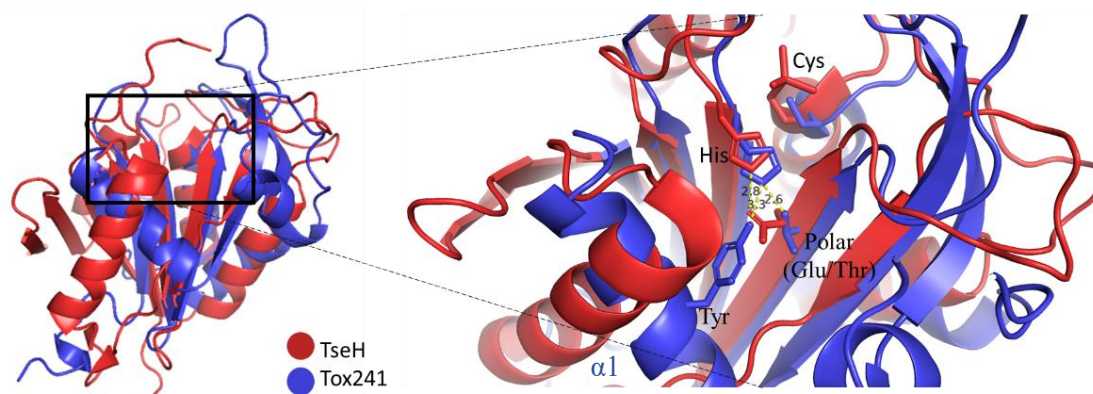


Figura 16. Sobreposição das estruturas terciárias de Tox241₂₀₋₁₇₀ e TseH. Destacada à direita está uma região aumentada com as cadeias laterais e distâncias (angstroms) dos resíduos catalíticos importantes de ambas NlpC/P60 permutadas sobrepostas.

Trabalhos anteriores sugeriram que TseH teria atividade de endopeptidase e atuaria sobre o peptidoglicano; contudo, até o momento, demonstrou-se apenas que essa proteína é tóxica no periplasma de *E. coli*, e nenhum ensaio bioquímico detalhado confirmou essa hipótese (ALTINDIS *et al.*, 2015; HERSCH *et al.*, 2020). Foram realizadas buscas no programa DALI (HOLM, 2020) utilizando a estrutura tridimensional predita de Tox241 para obter mais informações sobre seu provável mecanismo. Esse programa compara estruturas tridimensionais de proteínas, revelando similaridades estruturais não encontradas quando comparamos as sequências de aminoácidos. O resultado mostrou que as estruturas com maior similaridade eram membros da família NlpC/P60 com atividade de fosfolipase (dados não mostrados).

Sabendo que Tox241 é tóxica quando expressa no periplasma de *E. coli* (Figura 8), e considerando que os três principais fosfolípidos de membrana em *E. coli* são fosfatidiletanolamina (75%), fosfatidilglicerol (20%) e cardiolipina (5%) (ROWLETT *et al.*, 2017), decidiu-se realizar um *docking* molecular com a estrutura predita de Tox241 e uma molécula de fosfatidiletanolamina (Figura 17), além dos demais fosfolípidos de membrana e com TseH (Figura S2). O *docking* foi realizado com o programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010), e apresentou um valor de energia livre de -4.9 kcal/mol entre Tox241 e fosfatidiletanolamina. Com isso, conseguimos calcular a constante de dissociação ($K_d = 271,4$ mM), sugerindo que esse substrato pode ter afinidade com o sítio catalítico de Tox241. O programa acomodou o substrato no provável sítio catalítico de

Tox241, o que fortalece a hipótese de que esse efector possa ser uma fosfolipase (Figura 17).

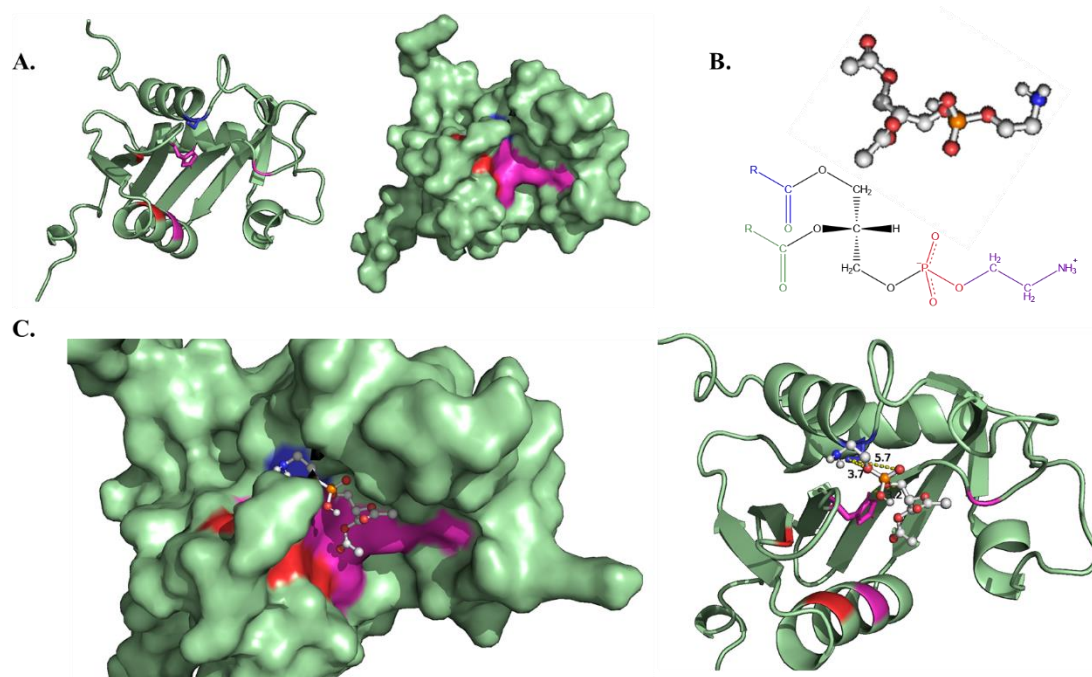


Figura 17. Docking molecular de Tox241₂₀₋₁₇₀ com o substrato fosfatidiletanolamina. A. Representação em cartoon e em superfície de Tox241, que foi utilizado para o *docking* molecular. B. Representação da molécula de fosfatidiletanolamina utilizada como substrato. C. *Docking* molecular representado em superfície (esquerda) e em cartoon (direita). A cisteína catalítica está em azul, tirosinas e histidinas estão marcadas em magenta e um ácido glutâmico em vermelho. Os átomos da fosfatidiletanolamina encontram-se coloridos em branco para carbonos e hidrogênios, em azul para nitrogênios e em vermelho para oxigênios. As linhas tracejadas em amarelo marcam a distância em angstroms entre a cisteína catalítica e os oxigênios próximos que poderiam sofrer uma quebra pela ação de fosfolipase.

Proteínas com conformação do tipo *papain-like* utilizam cisteínas catalíticas em reações de hidrólise de ligações ésteres, tiol e/ou amídica pela ação de um ataque nucleofílico do seu grupo tiol. Junto com a cisteína, uma histidina também está envolvida no processo, que serve para delimitar o espaço do substrato e posicioná-lo próximo da cisteína, formando o par Cys-His (CSTORER; MÉNARD, 1994). Para determinar se os resíduos Cys₁₅₁ e His₄₃ de Tox241 são importantes para atividade tóxica observada em *E. coli* (Figura 8), foram gerados clones contendo mutações pontuais e substituições para alanina nesses resíduos importantes: H₄₃A e C₁₅₁A. Em seguida, foram repetidos os ensaios de toxicidade em *E. coli* utilizando os mutantes (Figura 17). Os resultados confirmaram que as mutações pontuais em H₄₃A e C₁₅₁A eliminam o efeito tóxico de Tox241 em *E. coli* (Figura 18), indicando que a atividade enzimática de Tox241 é essencial para sua toxicidade.

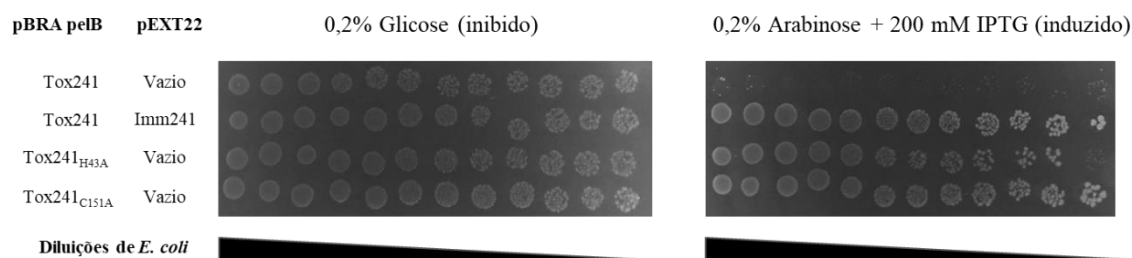


Figura 18. Teste de toxicidade em *E. coli* utilizando mutantes Tox241 H₄₃A e C₁₅₁A. Ensaio de toxicidade em *E. coli* mostra que a toxicidade de Tox241 é abolida quando a Cys₁₅₁ ou His₄₃ são substituídas por alaninas.

Em seguida, foi realizada uma análise da distribuição taxonômica de Tox241 a partir dos homólogos coletados anteriormente por jackhmmmer (Figura 10). A partir dos dados coletados no NCBI, foram recuperadas informações sobre taxonomia, removendo proteínas com mais de 80% de identidade, evitando o viés da quantidade de genomas depositados no NCBI (MUKHERJEE *et al.*, 2020). Desse modo, foi possível identificar 5184 proteínas dispersas em diferentes ramos taxonômicos, majoritariamente do reino Bacteria, que pertencem aos grupos identificados na filogenia (Tabela 4).

A presença de Tox241 em diversos filos é compatível com o observado anteriormente sobre a presença de proteínas NlpC/P60 envolvidas em atividades de homeostase de membrana em bactérias e eucariotos (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). É interessante observar que a subfamília A é encontrada somente em Bacteria, sendo que A1 (TseH) e A2 (Tox241) estão distribuídos majoritariamente entre Proteobacteria e Bacteroidetes. Bactérias pertencentes a estes filos, tais como *V. cholerae* e espécies do gênero *Salmonella*, utilizam o T6SS como um importante fator de competição e virulência, e habitam ou infectam ambientes como o trato gastrointestinal humano (KENNEDY; CHANG, 2020), o que poderia indicar um evento de transferência horizontal entre estas espécies.

Enquanto isso, a subfamília B concentrou a maior quantidade de proteínas, sendo a maioria Proteobacteria (Tabela 4). A subfamília C é aquela que possui homólogos de LRAT e possui representantes em eucariotos, sendo C1 um grupo de exclusivo do reino Eukaryota (Tabela 4), enquanto seu clado irmão C2 é distribuído entre Bacteria e Eukaryota, porém é mais restrito às espécies de plantas (Tabela 4).

Taxonomia		A			B (YiiX)			C (LRAT)		Total	
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2		
		TseH	Tox241								
Bacteria	Proteobacteria	Gamma	58	109		64	282	16		129	658
		Beta	2	2	3	41	118	10		147	323
		Alpha	2			18	227	3		3	253
		Delta	2			79	41	1		16	139
		other	2	2		78	37			1	120
		Epsilon				11				6	17
		Zeta				2					2
		Total	66	113	3	293	705	30		302	1512
	Bacteroidetes	408	38		50	2	2		3	503	
	Firmicutes	2	1	74	5				61	143	
	Planctomycetes	2			95	3	2		5	107	
	Cyanobacteria						1		77	78	
	Verrucomicrobia				64	4				68	
	Acidobacteria	1			11	10	2		1	25	
	Spirochaetes				6				18	24	
	Actinobacteria			2					8	10	
	Lentisphaerae				9	1				10	
	Nitrospirae	1			3	6				10	
	other Bacteria	4		2	69	13	2		30	120	
	Total	484	152	81	605	744	39		505	2610	
Eukaryota	Metazoa	Chordata				1		661	10	672	
		Mollusca						13	44	57	
		Nematoda						3	1	4	
		Cnidaria							3	3	
		Hemichordata							1	1	
		Hexapoda						1		1	
		other Metazoa						8	15	23	
		Total					1		686	74	761
	Fungi					3				3	
	Viridiplantae								298	298	
Total					4		686	372	1062		
Archaea	1			2	4				7		
Poxviridae							28		28		
Não classificado					3				3		
Total	550	265	84	898	1453	69	686	1179	5184		
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	Total		

*Os dados foram gerados removendo as proteínas com mais de 80% de identidade para evitar o viés amostral induzido pela presença de múltiplos genomas da mesma espécie de bactérias.

8. Conclusões

Neste trabalho, após uma análise *in silico* em 10K genomas de *Salmonella*, foi detectado um novo efetor do T6SS de *Salmonella* spp. que pertence à superfamília NlpC/P60. Apesar de outros efetores do T6SS que pertencem à superfamília NlpC/P60 já terem sido descritos (BENZ; REINSTEIN; MEINHART, 2013; HERSCH *et al.*, 2020), este é o primeiro efetor pertencente a um novo grupo de proteínas classificadas como NlpC/P60 permutadas. Notavelmente, esse novo grupo é um clado irmão, divergente, da família que inclui o efetor do T6SS TseH.

Tox241 apresentou toxicidade quando expressa no periplasma de *E. coli*, e resultados com sua predição de estrutura terciária indicam similaridade com diversas fosfolipases, incluindo membros da família LRAT-like (NlpC/p60 permutadas). Desse modo, é possível que Tox241 apresente atividade de fosfolipase ao exercer seu efeito tóxico.

Apesar do apontamento inicial de Tox241 pertencer à subfamília LRAT-like dentro das NlpC/P60 permutadas, a análise filogenética realizada durante este estudo identificou um novo clado, que foi designado como nova subfamília (aqui denominada de subfamília A) que contém Tox241 e seu homólogo TseH de *V. cholerae*. Além disso, foi possível observar a distribuição de Tox241 em diversos filos, o que é compatível com a grande dispersão da superfamília NlpC/P60 entre bactérias e eucariotos. No entanto, o grupo A2 de Tox241 (*Salmonella*) e A1 de seu homólogo TseH (*V. cholerae*) mostraram-se concentrados em Proteobacteria e Bacteroidetes, especialmente em espécies associadas ao habitat intestinal, o que poderia indicar eventos de transferência horizontal desta toxina.

Esses resultados são importantes para desvendar o que parece ser um novo mecanismo de ação desta toxina e seu envolvimento com o T6SS, além de complementar o estudo das NlpC/P60 permutadas, que até então eram atribuídas a atividades relacionadas com metabolismo de membranas celulares, mas não em conflitos biológicos.

9. Referências Bibliográficas

- ABBY, S. S.; CURY, J.; GUGLIELMINI, J.; NÉRON, B. *et al.* Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 23080, 2016/03/16 2016.
- ABEYRATHNE, P. D. A. D.; LAM, J. S. L. S. Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. **Canadian Journal of Microbiology**, 53, n. 4, p. 526-532, 2007.
- ALTINDIS, E.; DONG, T.; CATALANO, C.; MEKALANOS, J. *et al.* Secretome Analysis of *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System Reveals a New Effector-Immunity Pair. **mBio**, 6, n. 2, p. e00075-00015, 2015.
- ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. **Genome Biology**, 4, n. 2, p. R11, 2003/02/03 2003.
- AOKI, S. K.; DINER, E. J.; DE ROODENBEKE, C. T. K.; BURGESS, B. R. *et al.* A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. **Nature**, 468, n. 7322, p. 439-442, 2010/11/01 2010.
- BAYER-SANTOS, E.; CENENS, W.; MATSUYAMA, B. Y.; OKA, G. U. *et al.* The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. **PLOS Pathogens**, 15, n. 9, p. e1007651, 2019.
- BENZ, J.; REINSTEIN, J.; MEINHART, A. Structural Insights into the Effector – Immunity System Tae4/Tai4 from *Salmonella typhimurium*. **PLOS ONE**, 8, n. 6, p. e67362, 2013.
- BURKINSHAW, B. J.; LIANG, X.; WONG, M.; LE, A. N. H. *et al.* A type VI secretion system effector delivery mechanism dependent on PAAR and a chaperone–co-chaperone complex. **Nature Microbiology**, 3, n. 5, p. 632-640, 2018/05/01 2018.
- CAO, Z.; CASABONA, M. G.; KNEUPER, H.; CHALMERS, J. D. *et al.* The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. **Nature Microbiology**, 2, n. 1, p. 16183, 2016/10/10 2016.
- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. THE ROUTE OF ENTERIC INFECTION IN NORMAL MICE. **Journal of Experimental Medicine**, 139, n. 5, p. 1189-1203, 1974.
- CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHÉ, D.; KLEANTHOUS, C. *et al.* Colicin Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 71, n. 1, p. 158-229, 2007.
- CASEY PAT, G.; GARDINER GILLIAN, E.; CASEY, G.; BRADSHAW, B. *et al.* A Five-Strain Probiotic Combination Reduces Pathogen Shedding and Alleviates Disease Signs in Pigs Challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, n. 6, p. 1858-1863, 2007/03/15 2007.
- COULTHURST, S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. **Microbiology**, 165, n. 5, p. 503-515, 2019.

- CSTORER, A.; MÉNARD, R. [33] Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *In: Methods in Enzymology*: Academic Press, 1994. v. 244, p. 486-500.
- DESHAZER, D. A novel contact-independent T6SS that maintains redox homeostasis via Zn²⁺ and Mn²⁺ acquisition is conserved in the *Burkholderia pseudomallei* complex. **Microbiological Research**, 226, p. 48-54, 2019/09/01/ 2019.
- DONG, C.; ZHANG, H.; GAO, Z.-Q.; WANG, W.-J. *et al.* Structural insights into the inhibition of type VI effector Tae3 by its immunity protein Tai3. **Biochemical Journal**, 454, n. 1, p. 59-68, 2013.
- DYKXHOORN, D. M.; ST. PIERRE, R.; LINN, T. A set of compatible tac promoter expression vectors. **Gene**, 177, n. 1, p. 133-136, 1996/01/01/ 1996.
- FITZSIMONS, T. C.; LEWIS, J. M.; WRIGHT, A.; KLEIFELD, O. *et al.* Identification of Novel *Acinetobacter baumannii* Type VI Secretion System Antibacterial Effector and Immunity Pairs. **Infection and Immunity**, 86, n. 8, p. e00297-00218, 2018.
- FUENTES, J. M.; LOMPRÉ, A.-M.; MOLLER, J. V.; FALSON, P. *et al.* Clean Western Blots of Membrane Proteins after Yeast Heterologous Expression Following a Shortened Version of the Method of Perini *et al.* **Analytical Biochemistry**, 285, n. 2, p. 276-278, 2000/10/15/ 2000.
- GALÁN, J. E.; ZHOU, D. Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97, n. 16, p. 8754-8761, 2000.
- GAO, L.-Y.; PAK, M.; KISH, R.; KAJIHARA, K. *et al.* A Mycobacterial Operon Essential for Virulence In Vivo and Invasion and Intracellular Persistence in Macrophages. **Infection and Immunity**, 74, n. 3, p. 1757-1767, 2006.
- HACHANI, A.; WOOD, T. E.; FILLOUX, A. Type VI secretion and anti-host effectors. **Current Opinion in Microbiology**, 29, p. 81-93, 2016/02/01/ 2016.
- HAN, Y.; WANG, T.; CHEN, G.; PU, Q. *et al.* A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. **PLOS Pathogens**, 15, n. 12, p. e1008198, 2019.
- HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, 3, n. 7, p. 549-559, 2001/06/01/ 2001.
- HAUSER, M.; STEINEGGER, M.; SÖDING, J. MMseqs software suite for fast and deep clustering and searching of large protein sequence sets. **Bioinformatics**, 32, n. 9, p. 1323-1330, 2016.
- HAYES, C. S.; AOKI, S. K.; LOW, D. A. Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems. **Annual Review of Genetics**, 44, n. 1, p. 71-90, 2010/12/01 2010.
- HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature Protocols**, 2, n. 4, p. 924-932, 2007/04/01 2007.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, 294, n. 2, p. 95-102, 2004/09/24/ 2004.

- HERNANDEZ, R. E.; GALLEGOS-MONTERROSA, R.; COULTHURST, S. J. Type VI secretion system effector proteins: Effective weapons for bacterial competitiveness. **Cellular Microbiology**, 22, n. 9, p. e13241, 2020/09/01 2020. <https://doi.org/10.1111/cmi.13241>.
- HERSCH, S. J.; MANERA, K.; DONG, T. G. Defending against the Type Six Secretion System: beyond Immunity Genes. **Cell Reports**, 33, n. 2, p. 108259, 2020/10/13/ 2020.
- HERSCH, S. J.; WATANABE, N.; STIETZ, M. S.; MANERA, K. *et al.* Envelope stress responses defend against type six secretion system attacks independently of immunity proteins. **Nature Microbiology**, 5, n. 5, p. 706-714, 2020/05/01 2020.
- HESPANHOL, J. T.; SANCHEZ LIMACHE, D. E.; GONÇALVES NICASTRO, G.; MEAD, L. *et al.* Antibacterial T6SS effectors with a VRR-Nuc domain induce target cell death via DNA Double-Strand Breaks. **bioRxiv**, p. 2021.2012.2026.474169, 2021.
- HILDEBRAND, A.; REMMERT, M.; BIEGERT, A.; SÖDING, J. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 77, n. S9, p. 128-132, 2009/01/01 2009. <https://doi.org/10.1002/prot.22499>.
- HOLM, L. Using Dali for Protein Structure Comparison. *In*: GÁSPÁRI, Z. (Ed.). **Structural Bioinformatics: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 29-42.
- HOOD, R. D.; SINGH, P.; HSU, F.; GÜVENER, T. *et al.* A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. **Cell Host & Microbe**, 7, n. 1, p. 25-37, 2010/01/21/ 2010.
- JAHNG, W. J.; XUE, L.; RANDO, R. R. Lecithin Retinol Acyltransferase Is a Founder Member of a Novel Family of Enzymes. **Biochemistry**, 42, n. 44, p. 12805-12812, 2003/11/01 2003.
- JANA, B.; FRIDMAN, C. M.; BOSIS, E.; SALOMON, D. A modular effector with a DNase domain and a marker for T6SS substrates. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 3595, 2019/08/09 2019.
- JANA, B.; SALOMON, D. Type VI secretion system: a modular toolkit for bacterial dominance. **Future Microbiology**, 14, n. 16, p. 1451-1463, 2019.
- JURÉNAS, D.; PAYELLEVILLE, A.; ROGHANIAN, M.; TURNBULL, K. J. *et al.* *Photobacterium* antibacterial Rhs polymorphic toxin inhibits translation through ADP-ribosylation of 23S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, 49, n. 14, p. 8384-8395, 2021.
- KADURUGAMUWA, J. L.; MAYER, A.; MESSNER, P.; SÁRA, M. *et al.* S-Layered *Aneurinibacillus* and *Bacillus* spp. Are Susceptible to the Lytic Action of *Pseudomonas aeruginosa* Membrane Vesicles. **Journal of Bacteriology**, 180, n. 9, p. 2306-2311, 1998/05/01 1998.
- KATOH, K.; KUMA, K.-I.; TOH, H.; MIYATA, T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, 33, n. 2, p. 511-518, 2005.

- KAUR, J.; BACHHAWAT, A. K. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. **Analytical Biochemistry**, 384, n. 2, p. 348-349, 2009/01/15/ 2009.
- KENNEDY, M. S.; CHANG, E. B. The microbiome: Composition and locations. **Progress in molecular biology and translational science**, 176, p. 1-42, 2020.
- KOSKINIEMI, S.; LAMOUREUX, J. G.; NIKOLAKAKIS, K. C.; KINT DE ROODENBEKE, C. *et al.* Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 17, p. 7032, 2013.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹ Edited by F. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, 305, n. 3, p. 567-580, 2001/01/19/ 2001.
- LAWLEY, T. D.; WALKER, A. W. Intestinal colonization resistance. **Immunology**, 138, n. 1, p. 1-11, 2013.
- LEIMAN, P. G.; BASLER, M.; RAMAGOPAL, U. A.; BONANNO, J. B. *et al.* Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, n. 11, p. 4154-4159, 2009a.
- LEIMAN, P. G.; BASLER, M.; RAMAGOPAL, U. A.; BONANNO, J. B. *et al.* Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, n. 11, p. 4154, 2009b.
- LIN, J.; ZHANG, W.; CHENG, J.; YANG, X. *et al.* A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, 8, n. 1, p. 14888, 2017/03/28 2017.
- LITVAK, Y.; BYNDLOSS, M. X.; BÄUMLER, A. J. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. **Science**, 362, n. 6418, p. eaat9076, 2018.
- MA, A. T.; MEKALANOS, J. J. In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107, n. 9, p. 4365-4370, 2010.
- MA, J.; SUN, M.; PAN, Z.; LU, C. *et al.* Diverse toxic effectors are harbored by vgrG islands for interbacterial antagonism in type VI secretion system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1862, n. 7, p. 1635-1643, 2018/07/01/ 2018.
- MA, L.-S.; HACHANI, A.; LIN, J.-S.; FILLOUX, A. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* Deploys a Superfamily of Type VI Secretion DNase Effectors as Weapons for Interbacterial Competition *In Planta*. **Cell Host & Microbe**, 16, n. 1, p. 94-104, 2014.
- MARIANI, V.; BIASINI, M.; BARBATO, A.; SCHWEDE, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 29, n. 21, p. 2722-2728, 2013.

- MARIANO, G.; TRUNK, K.; WILLIAMS, D. J.; MONLEZUN, L. *et al.* A family of Type VI secretion system effector proteins that form ion-selective pores. **Nature Communications**, 10, n. 1, p. 5484, 2019/12/02 2019.
- MIRDITA, M.; SCHÜTZE, K.; MORIWAKI, Y.; HEO, L. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, 2022/05/30 2022.
- MISTRY, J.; CHUGURANSKY, S.; WILLIAMS, L.; QURESHI, M. *et al.* Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, 49, n. D1, p. D412-D419, 2020.
- MONDAL, M. S.; RUIZ, A.; BOK, D.; RANDO, R. R. Lecithin Retinol Acyltransferase Contains Cysteine Residues Essential for Catalysis. **Biochemistry**, 39, n. 17, p. 5215-5220, 2000/05/01 2000.
- MUKHERJEE, S.; STAMATIS, D.; BERTSCH, J.; OVCHINNIKOVA, G. *et al.* Genomes OnLine Database (GOLD) v.8: overview and updates. **Nucleic Acids Research**, 49, n. D1, p. D723-D733, 2020.
- MULDER, D. T.; COOPER, C. A.; COOMBES, B. K.; BÄUMLER, A. J. Type VI Secretion System-Associated Gene Clusters Contribute to Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, 80, n. 6, p. 1996-2007, 2012.
- NGUYEN, V. S.; DOUZI, B.; DURAND, E.; ROUSSEL, A. *et al.* Towards a complete structural deciphering of Type VI secretion system. **Current Opinion in Structural Biology**, 49, p. 77-84, 2018/04/01/ 2018.
- PEREZ-SEPULVEDA, B. M.; HEAVENS, D.; PULFORD, C. V.; PREDEUS, A. V. *et al.* An accessible, efficient and global approach for the large-scale sequencing of bacterial genomes. **Genome Biology**, 22, n. 1, p. 349, 2021/12/21 2021.
- PETROVA, M. I.; IMHOLZ, N. C. E.; VERHOEVEN, T. L. A.; BALZARINI, J. *et al.* Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. **PLOS ONE**, 11, n. 8, p. e0161337, 2016.
- PISSARIDOU, P.; ALLSOPP LUKE, P.; WETTSTADT, S.; HOWARD SOPHIE, A. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115, n. 49, p. 12519-12524, 2018/12/04 2018.
- POTTER, S. C.; LUCIANI, A.; EDDY, S. R.; PARK, Y. *et al.* HMMER web server: 2018 update. **Nucleic acids research**, 46, n. W1, p. W200-W204, 2018.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, 26, n. 7, p. 1641-1650, 2009.
- PUKATZKI, S.; MA AMY, T.; REVEL ANDREW, T.; STURTEVANT, D. *et al.* Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104, n. 39, p. 15508-15513, 2007/09/25 2007.
- RAY, A.; SCHWARTZ, N.; DE SOUZA SANTOS, M.; ZHANG, J. *et al.* Type VI secretion system MIX-effectors carry both antibacterial and anti-eukaryotic

- activities. **EMBO reports**, 18, n. 11, p. 1978-1990, 2017/11/01 2017. <https://doi.org/10.15252/embr.201744226>.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Review of Microbiology**, 56, n. 1, p. 117-137, 2002.
- ROWLETT, V. W.; MALLAMPALLI, V. K. P. S.; KARLSTAEDT, A.; DOWHAN, W. *et al.* Impact of Membrane Phospholipid Alterations in *Escherichia coli* on Cellular Function and Bacterial Stress Adaptation. **Journal of Bacteriology**, 199, n. 13, p. e00849-00816, 2017.
- RUHE, Z. C.; LOW, D. A.; HAYES, C. S. Bacterial contact-dependent growth inhibition. **Trends in Microbiology**, 21, n. 5, p. 230-237, 2013/05/01/ 2013.
- RUSSELL, A. B.; LEROUX, M.; HATHAZI, K.; AGNELLO, D. M. *et al.* Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. **Nature**, 496, n. 7446, p. 508-512, 2013/04/01 2013.
- RUSSELL, ALISTAIR B.; SINGH, P.; BRITTNACHER, M.; BUI, NHAT K. *et al.* A Widespread Bacterial Type VI Secretion Effector Superfamily Identified Using a Heuristic Approach. **Cell Host & Microbe**, 11, n. 5, p. 538-549, 2012/05/17/ 2012.
- SANA, T. G.; FLAUGNATTI, N.; LUGO, K. A.; LAM, L. H. *et al.* *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113, n. 34, p. E5044-E5051, 2016.
- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, 94, n. 3, p. 441-448, 1975/05/25/ 1975.
- SCHOLL, D. Phage Tail-Like Bacteriocins. **Annual Review of Virology**, 4, n. 1, p. 453-467, 2017.
- SCHRODINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
- SCHWARZ, S.; SINGH, P.; ROBERTSON JOHANNA, D.; LEROUX, M. *et al.* VgrG-5 Is a *Burkholderia* Type VI Secretion System-Exported Protein Required for Multinucleated Giant Cell Formation and Virulence. **Infection and Immunity**, 82, n. 4, p. 1445-1452, 2014/04/01 2014.
- SENKEVICH, T. G.; WYATT, L. S.; WEISBERG, A. S.; KOONIN, E. V. *et al.* A conserved poxvirus NlpC/P60 superfamily protein contributes to vaccinia virus virulence in mice but not to replication in cell culture. **Virology**, 374, n. 2, p. 506-514, 2008/05/10/ 2008.
- SHIMIZU, T.; OTONARI, S.; SUZUKI, J.; UDA, A. *et al.* Expression of *Francisella* pathogenicity island protein intracellular growth locus E (IglE) in mammalian cells is involved in intracellular trafficking, possibly through microtubule organizing center. **MicrobiologyOpen**, 8, n. 4, p. e00684, 2019/04/01 2019. <https://doi.org/10.1002/mbo3.684>.
- SI, M.; WANG, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, C. *et al.* The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition. **Cell Reports**, 20, n. 4, p. 949-959, 2017.

- SI, M.; ZHAO, C.; BURKINSHAW, B.; ZHANG, B. *et al.* Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 114, n. 11, p. E2233-E2242, 2017/03// 2017.
- SIBINELLI-SOUSA, S.; DE ARAÚJO-SILVA, A. L.; HESPANHOL, J. T.; BAYER-SANTOS, E. Revisiting the steps of *Salmonella* gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions. **The FEBS Journal**, n/a, n. n/a, 2021/09/21 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.16211>.
- SIBINELLI-SOUSA, S.; HESPANHOL, J. T.; NICASTRO, G. G.; MATSUYAMA, B. Y. *et al.* A Family of T6SS Antibacterial Effectors Related to l,d-Transpeptidases Targets the Peptidoglycan. **Cell Reports**, 31, n. 12, p. 107813, 2020/06/23/ 2020.
- SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BISSON-FILHO, A. W. *et al.* Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**, 6, n. 1, p. 6453, 2015/03/06 2015.
- STEMPLER, O.; BAIDYA, A. K.; BHATTACHARYA, S.; MALLI MOHAN, G. B. *et al.* Interspecies nutrient extraction and toxin delivery between bacteria. **Nature Communications**, 8, n. 1, p. 315, 2017/08/22 2017.
- SUAREZ, G.; SIERRA, J. C.; EROVA, T. E.; SHA, J. *et al.* A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. **Journal of bacteriology**, 192, n. 1, p. 155-168, 2010.
- TANG, J. Y.; BULLEN, N. P.; AHMAD, S.; WHITNEY, J. C. Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. **Journal of Biological Chemistry**, 293, n. 5, p. 1504-1514, 2018.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 31, n. 2, p. 455-461, 2010/01/30 2010. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- VASSALLO, C. N.; CAO, P.; CONKLIN, A.; FINKELSTEIN, H. *et al.* Infectious polymorphic toxins delivered by outer membrane exchange discriminate kin in myxobacteria. **eLife**, 6, p. e29397, 2017/08/18 2017.
- WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 2003. 1555812546.
- WANG, J.; LI, J.; HOU, Y.; DAI, W. *et al.* BastionHub: a universal platform for integrating and analyzing substrates secreted by Gram-negative bacteria. **Nucleic Acids Research**, 49, n. D1, p. D651-D659, 2021.
- WANG, S.; GENG, Z.; ZHANG, H.; SHE, Z. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* PAAR2 cluster encodes a putative VRR-NUC domain-containing effector. **The FEBS Journal**, 288, n. 19, p. 5755-5767, 2021/10/01 2021. <https://doi.org/10.1111/febs.15870>.
- WANG, T.; SI, M.; SONG, Y.; ZHU, W. *et al.* Type VI Secretion System Transports Zn²⁺ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. **PLOS Pathogens**, 11, n. 7, p. e1005020, 2015.

- WHITNEY, J. C.; CHOU, S.; RUSSELL, A. B.; BIBOY, J. *et al.* Identification, Structure, and Function of a Novel Type VI Secretion Peptidoglycan Glycoside Hydrolase Effector-Immunity Pair. **Journal of Biological Chemistry**, 288, n. 37, p. 26616-26624, 2013.
- WHITNEY, J. C.; PETERSON, S. B.; KIM, J.; PAZOS, M. *et al.* A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. **eLife**, 6, p. e26938, 2017/07/11 2017.
- WHITNEY, JOHN C.; QUENTIN, D.; SAWAI, S.; LEROUX, M. *et al.* An Interbacterial NAD(P)⁺ Glycohydrolase Toxin Requires Elongation Factor Tu for Delivery to Target Cells. **Cell**, 163, n. 3, p. 607-619, 2015/10/22/ 2015.
- XU, Q.; ABDUBEK, P.; ASTAKHOVA, T.; AXELROD, H. L. *et al.* Structure of the [gamma]-d-glutamyl-l-diamino acid endopeptidase YkfC from *Bacillus cereus* in complex with l-Ala-[gamma]-d-Glu: insights into substrate recognition by NlpC/P60 cysteine peptidases. **Acta Crystallographica Section F**, 66, n. 10, p. 1354-1364, 2010.
- XU, Q.; CHIU, H.-J.; FARR, C. L.; JAROSZEWSKI, L. *et al.* Structures of a Bifunctional Cell Wall Hydrolase CwIT Containing a Novel Bacterial Lysozyme and an NlpC/P60 dl-Endopeptidase. **Journal of Molecular Biology**, 426, n. 1, p. 169-184, 2014/01/09/ 2014.
- XU, Q.; RAWLINGS, N. D.; CHIU, H.-J.; JAROSZEWSKI, L. *et al.* Structural Analysis of Papain-Like NlpC/P60 Superfamily Enzymes with a Circularly Permuted Topology Reveals Potential Lipid Binding Sites. **PLOS ONE**, 6, n. 7, p. e22013, 2011.
- YADAV, S. K.; MAGOTRA, A.; GHOSH, S.; KRISHNAN, A. *et al.* Immunity proteins of dual nuclease T6SS effectors function as transcriptional repressors. **EMBO reports**, 22, n. 6, p. e51857, 2021/06/04 2021. <https://doi.org/10.15252/embr.202051857>.
- ZHANG, D.; DE SOUZA, R. F.; ANANTHARAMAN, V.; IYER, L. M. *et al.* Polymorphic toxin systems: Comprehensive characterization of trafficking modes, processing, mechanisms of action, immunity and ecology using comparative genomics. **Biology Direct**, 7, n. 1, p. 18, 2012/06/25 2012.
- ZHANG, H.; GAO, Z.-Q.; SU, X.-D.; DONG, Y.-H. Crystal structure of type VI effector Tse1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Letters**, 586, n. 19, p. 3193-3199, 2012/09/21/ 2012.
- ZHANG, H.; ZHANG, H.; GAO, Z.-Q.; WANG, W.-J. *et al.* Structure of the Type VI Effector-Immunity Complex (Tae4-Tai4) Provides Novel Insights into the Inhibition Mechanism of the Effector by Its Immunity Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 288, n. 8, p. 5928-5939, 2013.
- ZHENG, L.; KELLY, C. J.; COLGAN, S. P. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 309, n. 6, p. C350-C360, 2015.

10. Anexos





10.1 Publicações científicas

Anexo 1: Artigo publicado no FEBS Journal: *Revisiting the steps of Salmonella gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions* (<https://doi.org/10.1111/febs.16211>).



STATE-OF-THE-ART REVIEW

Revisiting the steps of *Salmonella* gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions

Stephanie Sabinelli-Sousa , André Luiz de Araújo-Silva , Julia Takuno Hespanhol  and Ethel Bayer-Santos 

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil

Keywords

bacteriocins; colicins; effectors; inflammation; interbacterial competition; microbiota; microcins; *Salmonella*; T6SS; toxins

Correspondence

E. Bayer-Santos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil
Tel: +55 (11) 3091 7298
E-mail: ebayersantos@usp.br
Website: bayersantoslab.com

Stephanie Sabinelli-Sousa and André Luiz de Araújo-Silva contributed equally to this article

(Received 15 July 2021, revised 12 September 2021, accepted 20 September 2021)

doi:10.1111/febs.16211

A commensal microbial community is established in the mammalian gut during its development, and these organisms protect the host against pathogenic invaders. The hallmark of noninvasive *Salmonella* gut infection is the induction of inflammation via effector proteins secreted by the type III secretion system, which modulate host responses to create a new niche in which the pathogen can overcome the colonization resistance imposed by the microbiota. Several studies have shown that endogenous microbes are important to control *Salmonella* infection by competing for resources. However, there is limited information about antimicrobial mechanisms used by commensals and pathogens during these *in vivo* disputes for niche control. This review aims to revisit the steps that *Salmonella* needs to overcome during gut colonization—before and after the induction of inflammation—to achieve an effective infection. We focus on a series of reported and hypothetical antagonistic interbacterial interactions in which both contact-independent and contact-dependent mechanisms might define the outcome of the infection.

Introduction

Mammals harbor a complex gastrointestinal microbiota that includes bacteria, archaea, viruses, and unicellular eukaryotes. The adult intestinal microbiota is composed by hundreds of species living in symbiosis [1]. The microbiota provides a variety of benefits for their hosts, including nutrients, protection against infections, and maturation of the immune system [2–

4]. In exchange, the host provides a nutrient-rich habitat in which microbes can live [5]. The interaction between these species is essential for the healthy physiology of the host, and the interdependence between them suggests a long coevolution [6].

The assembly of the gut microbiota occurs in an organized manner together with host development. It

Abbreviations

AMP, antimicrobial peptide; BtuB, vitamin B12 transporter; CDI, contact-dependent growth inhibition; Cir, colicin I receptor; FepA, ferrienterobactin receptor; FhuA, receptor for ferrichrome iron; Fiu, catecholate siderophore receptor; Fur, ferric uptake regulator; Hcp, hemolysin coregulated protein; OmpC, outer membrane porin C; OmpF, outer membrane porin F; OmpR, outer membrane porin R; PAAR, proline-alanine-alanine-arginine; RBD, receptor-binding domain; ROS, reactive oxygen species; RpoS, RNA polymerase sigma factor; SCFAs, short-chain fatty acids; SPI, *Salmonella* pathogenicity island; SpoT, bifunctional (p)ppGpp synthase/hydrolase; T3SS, type III secretion system; VgrG, valine-glycine repeat protein.

10.1 Figuras suplementares

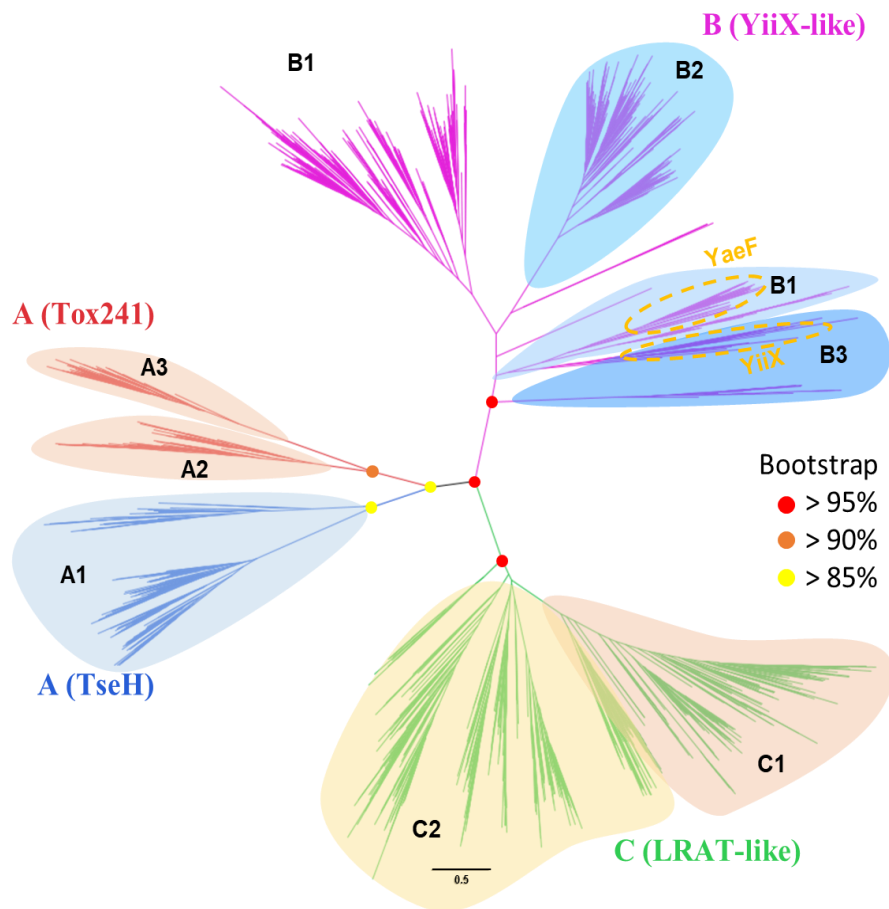
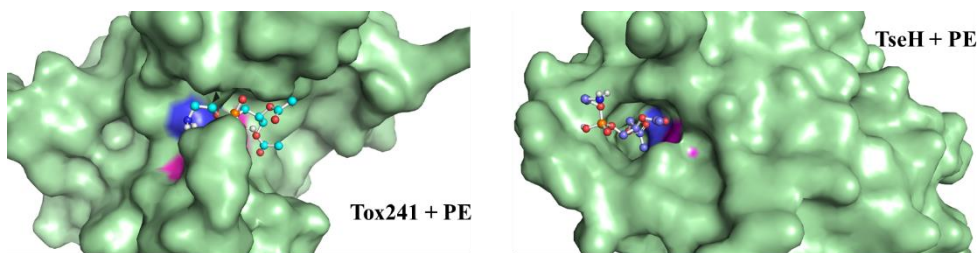


Figura S1: Posição dos homólogos de *E. coli* na filogenia apresentada neste trabalho. Embora próximas, as proteínas YiiX e YaeF, destacadas em amarelo, pertencem a linhagens basais distintas do clado B (YiiX/YaeF/Poxvirus G6R-like).



Docking	ΔG (kcal/mol)	Kd
Tox241+PE	- 4,9	271,4 mM
Tox241+PG	- 4,8	321,0 mM
Tox241+CA	- 4,8	321,0 mM
TseH+PE	- 5,1	194,1 mM
TseH+PG	- 4,2	877,8 mM
TseH+CA	- 4,4	627,9 mM

Figura S2: Docking molecular entre a estrutura predita de Tox241₂₀₋₁₇₀ ou TseH e os principais fosfolipídeos de membrana de *E. coli*: Fosfotidietanolamina (PE),

Fosfatidilglicerol (PG) e Cardiolipina (CA). Valores de variação de energia livre (ΔG) e constantes de dissociação (K_d) estão demonstrados na tabela para cada docking realizado. E é apresentado uma visualização em superfície de ambas proteínas para os melhores resultados obtidos.