

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

DANIEL ENRIQUE SÁNCHEZ LIMACHE

**Estudo da função de SPI-22 T6SS de *Salmonella bongori* em competições bacterianas e interações com células fagocíticas**

São Paulo

2022

Daniel Enrique Sánchez Limache

**Estudo da função de SPI-22 T6SS de *Salmonella bongori* em competições bacterianas e interações com células fagocíticas**

**Versão corrigida**

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

Orientadora: Dra. Ethel Bayer Santos

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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)

Sánchez Limache, Daniel Enrique  
Estudo da função de SPI-22 T6SS de Salmonella bongori em competições bacterianas e interações com células fagocíticas / Daniel Enrique Sánchez Limache; orientadora Ethel Bayer Santos. -- São Paulo, 2022.  
47 p.

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

1. Salmonella bongori. 2. T6SS. 3. SPI-22. 4. VRR-Nuc. 5. Efetores. I. Bayer Santos, Ethel , orientador. II. Título.



SANCHEZ-LIMACHE, D. E. **Estudo da função de SPI-22 T6SS de *Salmonella bongori* em competições bacterianas e interações com células fagocíticas.** 2022. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022,

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a Gustavo Arantes Lorga, um amigo que sempre me motivou a dedicar-me ao máximo possível de modo a demonstrar o meu verdadeiro potencial.



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer à minha família que tem me ajudado e apoiado as minhas escolhas de vida e profissionais.

Aos meus amigos que tem me motivado a continuar com a minha escolha de carreira acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas que tem me ajudado no desenvolvimento do mestrado e pela ótima convivência nas horas de café.

À minha orientadora, Ethel Bayer Santos, por ter mantido um ambiente de trabalho amigável, e por ter me capacitado durante o desenvolvimento deste trabalho, o qual tornou-me um pesquisador melhor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto de pesquisa (processo nº 2019/22715-8).

## Resumo

Bactérias desenvolveram mecanismos de antagonismo para atacar espécies competidoras e garantir vantagem adaptativa. O T6SS (*type 6 secretion system*) é um sistema de secreção de proteínas que se assemelha funcionalmente a um arpão contrátil, no qual uma lança composta por proteínas Hcp (*hemolysin-coregulated protein*), VgrG (*valine-glycine repeat protein G*) e PAAR (*proline-alanine-alanine-arginine*) é lançada em direção a célula alvo liberando efetores tóxicos. Em *Salmonella* spp., os genes responsáveis pela montagem do T6SS ficam agrupados em ilhas de patogenicidade (*Salmonella Pathogenicity Islands*, SPI). *Salmonella bongori* possui a SPI-22 que codifica um T6SS exclusivo desta espécie; no entanto, sua função ainda não havia sido caracterizada. O objetivo deste trabalho foi analisar a função de SPI-22 T6SS de *S. bongori* quanto a sua atividade antibacteriana e anti-eucariótica. Os resultados demonstram que SPI-22 T6SS tem função antibacteriana. Análises *in silico* identificaram diversos possíveis efetores secretados pelo SPI-22 T6SS. Dentre esses efetores, escolhemos quatro genes que possuem domínio VRR-Nuc (*virus-type replication-repair nuclease*) para caracterização funcional (SBG\_1828, SBG\_1841, SBG\_2718 e SBG\_2723). SBG\_2723 e SBG\_1841, renomeados TseV2 e TseV3 (*type VI effector with VRR-Nuc*), apresentaram toxicidade quando expressos em *Escherichia coli*; enquanto SBG\_2718 e SBG\_1828, renomeados TseV1 e TseV4, não afetaram o crescimento dessa bactéria. Ensaios de competição bacteriana confirmaram que TseV2 e TseV3 são secretados via SPI-22 T6SS. Além disso, ensaios de competição bacteriana revelaram que as proteínas VgrG2 (SBG\_2715) e VgrG3 (SBG\_3770) são importantes para secreção de TseV2 e TseV3, respectivamente. Para testar a atividade anti-eucariótica de SPI-22 T6SS, realizamos ensaios de resistência a predação por *Dictyostelium discoideum*, avaliando a capacidade dessa ameba em formar placas de fagocitose ao se alimentar das cepas selvagem e mutante T6SS. Resultados preliminares sugerem que o mutante T6SS possa ser mais susceptível a predação; no entanto, mais estudos serão necessários para esclarecer essa função. Nesse trabalho caracterizamos a função de SPI-22 T6SS e identificamos novos efetores secretados por esse sistema, demonstrando a participação de diferentes VgrG na seleção e secreção desses efetores.

**Palavras-chave:** *Salmonella bongori*; T6SS; SPI-22; VRR-Nuc; Efetores.

## Abstract

Bacteria have evolved antagonistic mechanisms to attack competing species and secure adaptive advantages. The T6SS (type 6 secretion system) is a protein secretion system that functionally resembles a contractile harpoon in which a spear composed of Hcp (hemolysin-coregulated protein), VgrG (valine-glycine repeat protein G) and PAAR (proline-alanine-arginine) proteins is launched toward the target cell to release toxic effectors. In *Salmonella* spp., the genes responsible for assembling the T6SS are clustered in *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI). *Salmonella bongori* carries a SPI-22 that encodes a T6SS unique to this species; however, its function was not yet characterized. The objective of this work was to analyze the function of SPI-22 T6SS from *S. bongori* regarding its antibacterial and anti-eukaryotic activity. Results demonstrate that SPI-22 T6SS displays antibacterial function. *In silico* analyses identified several possible effectors secreted by SPI-22 T6SS. Among these effectors, we chose four genes that have VRR-Nuc (virus-type replication-repair nuclease) domain for functional characterization (SBG\_1828, SBG\_1841, SBG\_2718 and SBG\_2723). SBG\_2723 and SBG\_1841, renamed TseV2 and TseV3 (type VI effector with VRR-Nuc), showed toxicity when expressed in *Escherichia coli*; while SBG\_2718 and SBG\_1828, renamed TseV1 and TseV4, did not affect the growth of this bacterium. Bacterial competition assays confirmed that TseV2 and TseV3 are secreted via SPI-22 T6SS. Furthermore, bacterial competition assays revealed that VgrG2 (SBG\_2715) and VgrG3 (SBG\_3770) are important for secretion of TseV2 and TseV3, respectively. To test the anti-eukaryotic activity of SPI-22 T6SS, we performed predation assays using *Dictyostelium discoideum* to evaluate the ability of this amoeba to form phagocytic plaques once feeding on the wild-type and T6SS mutant strains. Preliminary results suggest that the T6SS mutant may be more susceptible to predation; however, further studies will be needed to clarify this function. In this work we characterized the function of SPI-22 T6SS and identified new effectors secreted by this system, demonstrating the participation of different VgrG proteins in the selection and secretion of these effectors.

**Key words:** *Salmonella bongori*; T6SS; SPI-22; VRR-Nuc; Effectors.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	10
1.1. Mecanismos de antagonismo bacteriano .....	10
1.2. Sistema de secreção do tipo VI (T6SS) .....	11
1.2.1. Componentes estruturais e mecanismo de secreção .....	11
1.2.2. Atividades de efetores antibacterianos .....	13
1.3. <i>Salmonella</i> spp. ....	14
2. Justificativa .....	18
3. Objetivos .....	19
3.1. Objetivos específicos .....	19
4. Materiais e métodos .....	20
4.1. Cepas e cultivo .....	20
4.2. Mutagênese .....	22
4.3. Clonagem de plasmídeo para complementação .....	23
4.4. Análises <i>in silico</i> para identificação de efetores do T6SS .....	23
4.5. Ensaio de toxicidade em <i>Escherichia coli</i> .....	24
4.6. <i>Western blot</i> .....	24
4.7. Ensaio de competição bacteriana .....	25
4.8. Ensaio de formação de placa de fagocitose .....	25
4.9. Análises bioinformáticas .....	26
5. Resultados .....	27
5.1. Identificação de componentes do T6SS no genoma de <i>S. bongori</i> .....	27
5.2. O sistema SPI-22 T6SS está ativo em meio LB .....	28
5.3. SPI-22 T6SS possui atividade antibacteriana .....	28
5.4. Identificação de efetores secretados pelo SPI-22 T6SS .....	29
5.5. TseV2/TsiV2.1 e TseV3/TsiV3 constituem pares efector e proteína de imunidade .....	34
5.6. TseV2 e TseV3 são efetores secretados pelo SPI-22 T6SS .....	35
5.7. Predições das estruturas 3D dos efetores TseV1-4 .....	37
5.8. TseV2 e TseV3 dependem de VgrGs distintos para secreção .....	38
5.9. Ensaio de formação de placa de fagocitose .....	41
6. Discussão .....	43
7. Conclusão .....	45
8. Referências .....	46
9. Anexos .....	53

## 1. Introdução

### 1.1. Mecanismos de antagonismo bacteriano

Em um ambiente onde há uma grande população e uma quantidade limitada de recursos é natural que ocorra competição entre os indivíduos da população (BIRCH, 1957). O resultado da competição entre enteropatógenos e membros da microbiota intestinal é um evento determinante para permitir a entrada e/ou permanência do patógeno nesse ambiente (HIBBING *et al.*, 2010; SOMMER *et al.*, 2017). A microbiota intestinal de um indivíduo adulto é formada ao longo do seu desenvolvimento, e é composta por mais de mil espécies que convivem em homeostasia (LOZUPONE *et al.*, 2012).

A microbiota pode ser considerada parte do sistema de defesa do hospedeiro, inibindo o crescimento de espécies invasoras por um fenômeno chamado de *colonization resistance* (LAWLEY; WALKER, 2013). Bactérias oportunistas necessitam de um evento que desestabilize a composição da microbiota intestinal para poder se estabelecer nesse ambiente. Os eventos que perturbam o equilíbrio da microbiota podem ser exógenos, como tratamentos com antibióticos (FUKAMI, 2015), e/ou endógenos, como o desenvolvimento de imunodeficiências (PIGGOTT *et al.*, 2016) e doenças inflamatórias crônicas (SOMMER *et al.*, 2017).

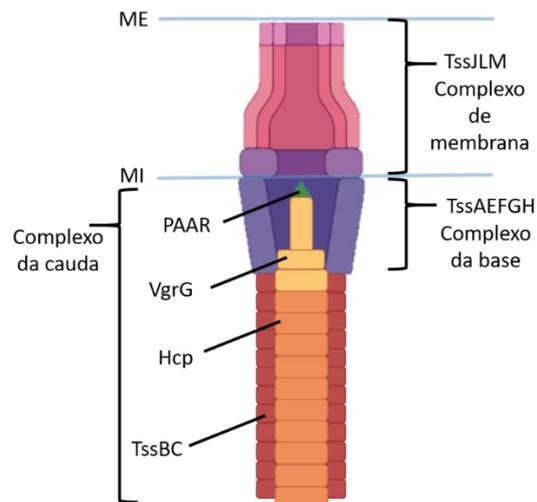
Durante a evolução, diferentes mecanismos de competição bacteriana foram selecionados e/ou adquiridos por transferência horizontal de genes (BLONDEL *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2019). Esses mecanismos podem ser independentes ou dependentes de contato entre as células (PETERSON *et al.*, 2020). Como exemplo de estratégia contato-independente pode ser citado as bacteriocinas, que compreendem um grupo de peptídeos e/ou proteínas sintetizados por ribossomos que exibem atividade antimicrobiana (RILEY; WERTZ *et al.*, 2002). As bacteriocinas são moléculas de vários tamanhos, estruturas e mecanismos de ação, e são produzidas tanto por bactérias Gram-negativas como Gram-positivas (SIMONS & DUVAL *et al.*, 2020). Em Gram-negativas, as colicinas de *E. coli* foram as primeiras a serem descobertas (CASCALES *et al.*, 2007). A sua liberação no meio extracelular ocorre normalmente quando a bactéria sofre autólise resultante de um estresse ambiental (RILEY, 2009; SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2021). Em Gram-positivas, as bacteriocinas são peptídeos ou proteínas, e são classificadas em três classes: classe I, composta por lantibióticos ou lantipeptídeos; classe II, composta por pequenos peptídeos termoestáveis (<10 kDa); classe III, composta por proteínas maiores e lábeis

(ALVAREZ-SIEIRO *et al.*, 2016). As bacteriocinas são secretadas no meio extracelular e interagem com receptores na membrana das células alvo (ex. receptores de captação de ferro), e são internalizadas através da membrana interna pelas maquinarias Tol e Ton (LAZDUNSKI *et al.*, 1998; PILSL; BRAUN 1998; CASCALES *et al.*, 2007). As estratégias contato-dependentes envolvem complexos proteicos chamados de sistemas de secreção de proteínas, que podem ser do tipo I, III, IV, V, VI e VII (T1SS, T4SS, T5SS, T6SS e T7SS). O T1SS é mais conhecido pelo sistema de secreção da hemolisina A em *Escherichia coli* e é composto pelas proteínas HlyA, HlyB, HlyC, HlyD e TolC (ANDERSEN *et al.*, 2003), e secreta proteínas para o meio extracelular. Contudo, existe um tipo especial de T1SS que é capaz de liberar agregados proteicos que permanecem conectados à membrana da célula produtora e provocam morte de células alvo. Esse sistema é chamado de Cdz (*contact-dependent inhibition by glycine zipper proteins*) (GARCÍA-BAYONA *et al.*, 2017). No T4SS, a proteína acopladora VirD4 seleciona efetores antibacterianos que possuem um domínio XVIPCD (*Xanthomonas VirD4-interacting protein conserved domain*) para serem translocados para dentro da célula alvo (SOUZA *et al.*, 2015; SGRO *et al.*, 2019). O T5SS - também denominado CDI (*contact dependent inhibition*) -, compreende proteínas translocadas para o lado externo da célula que permanecem ancoradas a membrana externa até o contato com o receptor da célula alvo, o qual ativa a translocação da porção tóxica para dentro da célula alvo (AOKI, 2005). Já o T6SS (PUKATZKI *et al.* 2006) é um sistema contrátil evolutivamente relacionado a bacteriófagos que injeta toxinas dentro de células alvo (HOOD *et al.*, 2010). O T7SS – também chamado de sistema de secreção ESX ou ESAT-6 (6 kDa *early secreted antigenic target*) (BRODIN *et al.*, 2004) – é um sistema presente em bactérias Gram-positivas que transcola proteínas por meio de um poro transmembrana liberando-as para o meio extracelular (CAO *et al.*, 2017).

## **1.2. Sistema de secreção do tipo VI (T6SS)**

### **1.2.1. Componentes estruturais e mecanismo de secreção**

O T6SS é composto por proteínas estruturais que formam o complexo de membrana (TssL, TssM e TssJ), o complexo da base (TssA, TssE, TssF, TssG e TssH) e o complexo da cauda (TssB, TssC, TssD/Hcp, TssI/VgrG e PAAR) (ALIKHAN *et al.*, 2018) (Figura 1). Essa estrutura é filogeneticamente relacionada ao aparato contrátil de um bacteriófago T4 (PUKATZKI *et al.*, 2007; FILLoux, 2013).

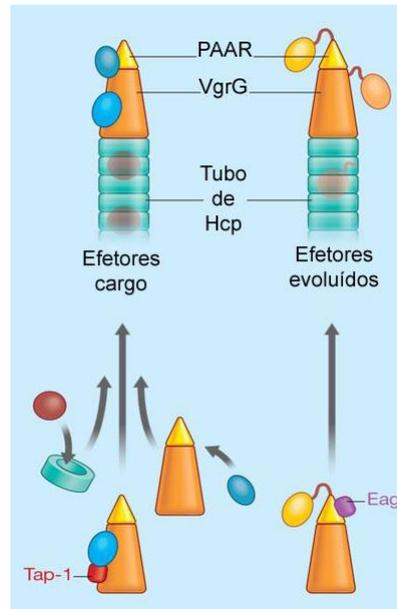


**Figura 1. Modelo dos complexos proteicos do T6SS:** Representação gráfica dos três complexos que compõem o T6SS. A membrana externa e a membrana interna estão representadas pelas siglas ME e MI, respectivamente.

Os efetores são translocados através das membranas interna e externa associados as proteínas Hcp (*hemolysin-coregulated protein*), que forma o tubo ejetado em direção a célula-alvo; VgrG (*valine-glycine repeat protein G*), que está localizada na extremidade do tubo formado por Hcp; e PAAR (*proline-alanine-alanine-arginine*), localizada na extremidade da ponta formada por VgrG (DURAND *et al.*, 2014; CIANFANELLI *et al.*, 2016). A diversidade de isoformas dessas proteínas está associada a secreção de diferentes efetores, sendo que cada proteína estrutural é responsável pela ligação e secreção de um grupo de efetores (HACHANI *et al.*, 2014; BONDAGE *et al.*, 2016).

Os efetores do T6SS são secretados com o auxílio dos componentes que formam a agulha (VgrG, PAAR e Hcp) de duas maneiras: interações diretas não covalentes, denominados efetores cargo (*cargo effectors*) (DURAN *et al.*, 2014); e fusionados a porção C-terminal de um dos três componentes da agulha, denominados efetores evoluídos (*evolved effectors*) (CUI *et al.*, 2009; PISSARIDOU *et al.*, 2018). Proteínas adaptadoras contendo domínios DUF1795 (WHITNEY *et al.*, 2015), DUF2169 (BONDAGE *et al.*, 2016), e DUF4123 (UNTERWEGER *et al.*, 2017) auxiliam na ligação de efetores com as proteínas Hcp, VgrG e PAAR (FILLOUX *et al.*, 2013) (Figura 2). Tap-1 (*T6SS adaptor protein 1*) é um exemplo de adaptador contendo o domínio DUF4123 (LIANG *et al.*, 2015), que interage diretamente com o efector Tde e a porção C-terminal de VgrG de *Agrobacterium tumefaciens* (BONDAGE *et al.*, 2016). Proteínas contendo o domínio DUF2169 são codificadas a montante de

genes de efetores evoluídos contendo domínio PAAR, e podem também facilitar a ancoragem em VgrG (BONDAGE *et al.*, 2016). Proteínas contendo o domínio DUF1795, ex. Eag (*Effector associated gene*), são requeridas para estabilizar efetores evoluídos contendo PAAR (WHITNEY *et al.*, 2015).



**Figura 2. Modelo de vias de secreção de efetores do T6SS.** Representação esquemática do transporte de efetores do T6SS (Hcp, VgrG e PAAR). Do lado esquerdo está representado efetores carga interagindo com Hcp ou VgrG-PAAR. Do lado direito estão representados efetores evoluídos fusionados a proteína PAAR. Proteínas adaptadoras, como Tap-1 e EagR, auxiliam na ancoragem dos efetores a proteínas estruturais da ponta do dardo. Imagem adaptada de Hernandez *et al.* (2020).

### 1.2.2. Atividade de efetores antibacterianos

Os efetores secretados pelo T6SS podem afetar diferentes componentes da célula alvo, podendo ser a membrana celular pela ação de fosfolipases (RUSSELL *et al.*, 2013; FLAUGNATTI *et al.*, 2016; RINGEL *et al.* 2016; MA *et al.*, 2017), a parede celular por meio da degradação ou inibição da síntese do peptidoglicano (RUSSELL *et al.* 2012; BROOKS *et al.*, 2013; ALTINDIS *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2017; FITZSIMONS *et al.* 2018; MA *et al.*, 2018; SIBINELLI-SOUSA *et al.*, 2020), o DNA ou RNAs por meio da ação de nucleases (KOSKINIEMI *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2014; BONDAGE *et al.*, 2016; FITZSIMONS *et al.* 2018; PISSARIDOU *et al.*, 2018; JANA *et al.*, 2019; HESPANHOL *et al.*, 2021), a degradação de metabolitos celulares como NAD<sup>+</sup> (WHITNEY *et al.*, 2015; HOOD *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2018), e até componentes do citoesqueleto afetando a divisão celular (TING *et al.*, 2018). A grande variedade de efetores secretados pelos T6SSs promovem uma vantagem competitiva

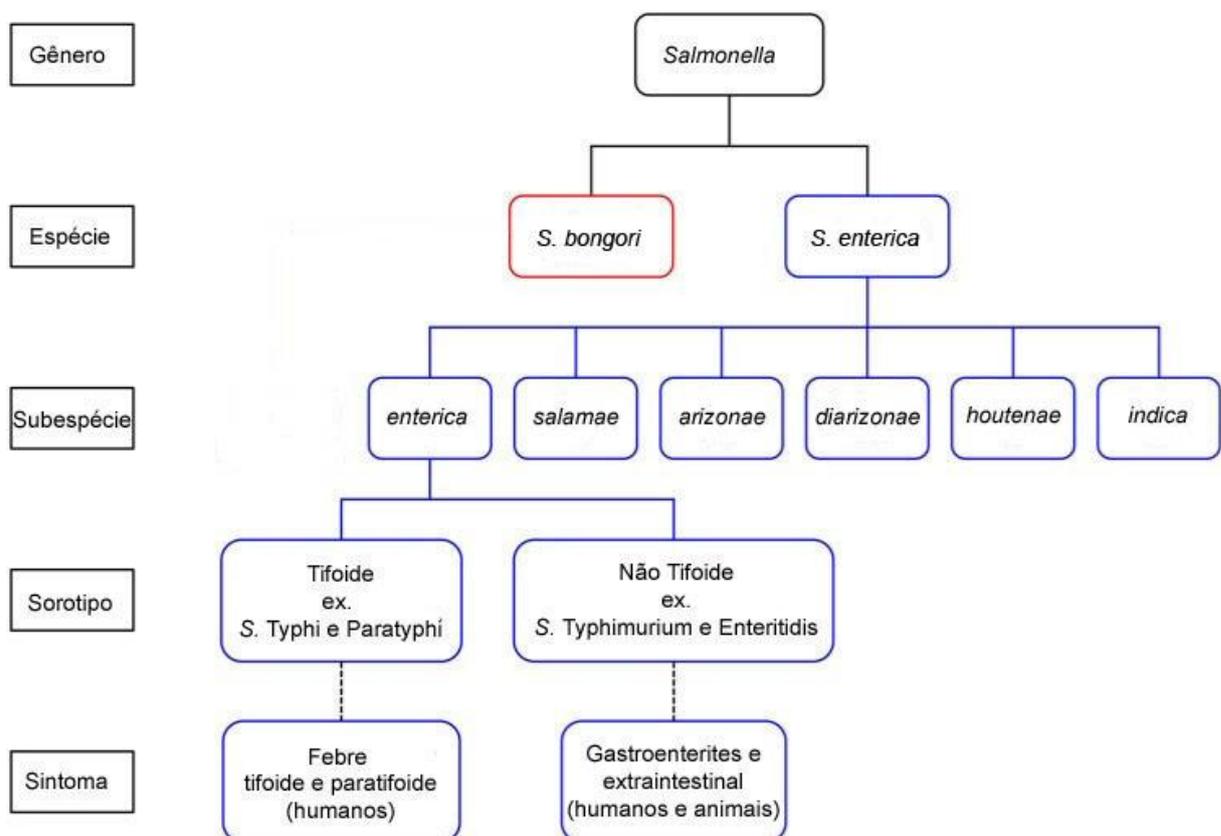
para a bactéria que os produz durante a colonização de novos ambientes (ALCOFORADO-DINIZ *et al.*, 2015).

De modo que a bactéria produtora dos efetores não se intoxique com as suas próprias toxinas, ou por ataque de células irmãs, na vizinhança dos genes de efetores há um ou mais genes de imunidade que inibem a atividade toxica. Este sistema é relacionado ao sistema toxina-antitoxina (TA) do tipo II encontrado em genomas bacterianos e plasmídeos (OGURA; HIRAGA, 1983; JURENAS *et al.*, 2022). O sistema TA foi primeiramente observado em plasmídeos de *E. coli* que exibiam um mecanismo de manutenção através de morte pós-segregacional (PSK – *post-segregational killing*), no qual o plasmídeo expressava tanto genes tóxicos para a célula assim como genes que inibiam a toxicidade, deste modo bactérias que não possuíam os genes de resistência a toxina, morriam após a divisão celular (LOBATO *et al.*, 2016). Atualmente o sistema TA é dividido em VIII tipos, dependendo do mecanismo de ação da proteína de imunidade (SINGH *et al.*, 2021). No TA tipo I, a inibição ocorre por meio da produção de um RNA antisense que inibe a tradução do mRNA da toxina (GERDES *et al.*, 1986). No TA tipo II, tanto a toxina e antitoxina são proteínas que foram um complexo (GOEDERS; VAN, 2014). No TA tipo III, a antitoxina é um RNA que se liga diretamente a proteína toxica (FINERAN *et al.*, 2009). No TA tipo IV, tanto a toxina como a antitoxina são proteínas, mas neste caso a antitoxina compete pelo substrato com a toxina (MASUDA *et al.*, 2012). No TA do tipo V, a antitoxina é uma endonuclease que degrada especificamente o mRNA da toxina correspondente (WANG *et al.*, 2012). No TA do tipo VI, a antitoxina apresenta uma atividade de protease, degradando a toxina (AAKRE *et al.*, 2013). No TA tipo VII, a antitoxina modifica a toxina por meio de uma ação enzimática (WANG *et al.*, 2021). No TA tipo VIII, a antitoxina mascara a atividade da toxina que por sua vez, é uma sRNA (CHOI *et al.*, 2018).

### **1.3. *Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. são bactérias bacilares Gram-negativas da família Enterobacteriaceae. O gênero *Salmonella* compreende duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica* (Figura 3). Sendo que *S. enterica*, é ainda subdividida em 10 subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, subsp. VII, subsp. A, subsp. B e subsp. C) (ALIKHAN *et al.* 2018). Todas as subespécies de *S. enterica* são

capazes de provocar gastroenterites, e alguns dos mais de 2000 sorotipos de *S. enterica enterica* podem ocasionar infecções sistêmicas como a febre tifoide (ASHTON *et al.* 2016). Essas infecções podem levar a morte se não tratadas adequadamente, principalmente em pacientes jovens e idosos (SU; CHIU, 2007). *S. bongori* normalmente está associada a infecções de animais de sangue frio (ex. répteis, anfíbios) (LE MINOR *et al.*, 1969; POPOFF; LE MINOR, 2007), mas existem relatos de infecção em crianças (GIAMMANCO *et al.*, 2002). Segundo uma comparação do conteúdo G+C do genoma de *E. coli* e *Salmonella* sp, acredita-se que *S. bongori* seja uma espécie intermediária entre as duas espécies (FOOKES *et al.*, 2011). Outro motivo que ressalta esta ideia é devido a *S. bongori* não ter um estilo de vida intracelular como ocorre com *S. enterica* (FOOKES *et al.*, 2011), além de não possuir vários genes e ilhas de patogenicidade que são exclusivas de *S. enterica*, como a ausência da SPI-2 (*Salmonella pathogenicity island 2*) (HENSEL *et al.*, 1995).



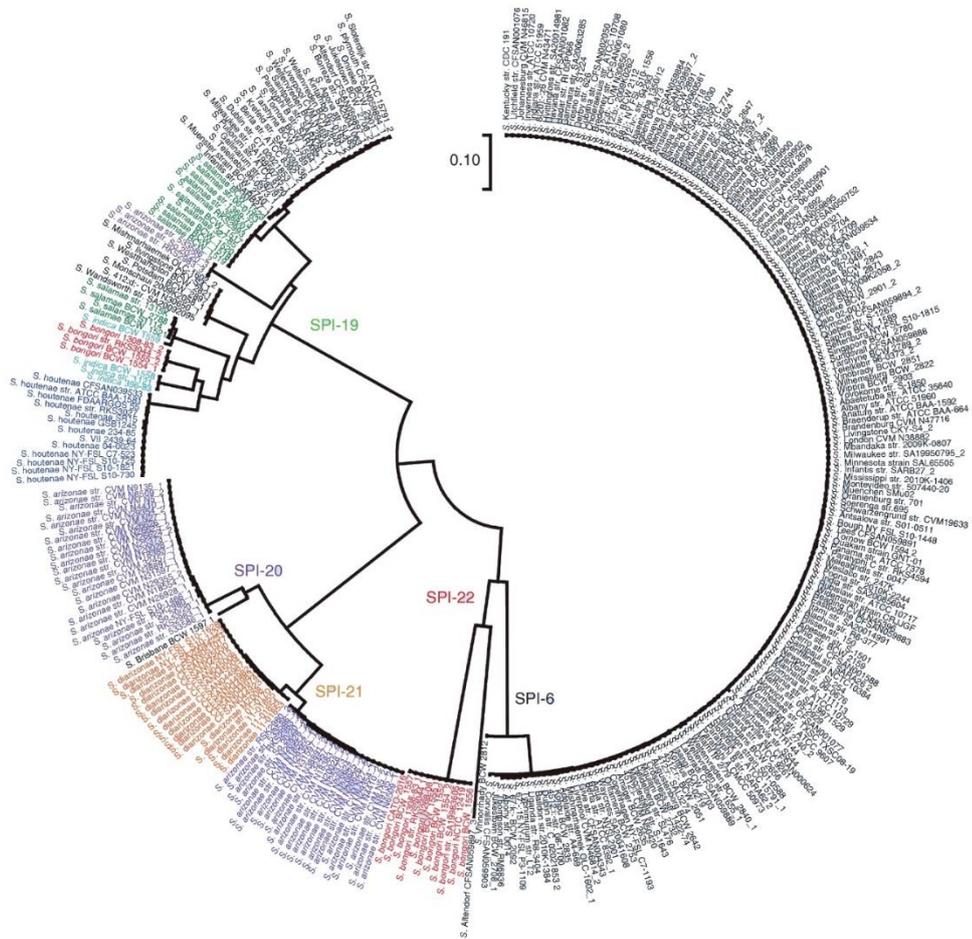
**Figura 3. Classificação de espécies e subespécies de *Salmonella*.** (Imagem adaptada de Hurley *et al.*, 2014).

A SPI-2 codifica um T3SS que é importante para promover a sobrevivência e replicação intracelular, e proporciona a capacidade de proliferação em tecidos

extraintestinais, provocando infecções sistêmicas (HENSEL *et al.*, 1997; HENSEL *et al.*, 1998). Após a entrada na célula eucariótica, ocorre a maturação do vacúolo contendo a *Salmonella* (SCV – *Salmonella-containing vacuole*) no qual o SPI-2 T3SS, por meio da secreção de efetores através da membrana do vacúolo, controla as funções celulares. Aproximadamente 30 efetores são secretados de dentro do SCV (MILLS *et al.*, 2008), e possuem atividades diversas como manter a proximidade do vacúolo ao complexo de Golgi da célula hospedeira, modular o citoesqueleto e interferir com a sinalização do sistema imune (FIGUEIRA; HOLDEN, *et al.*, 2012).

Embora *S. bongori* não possua um SPI-2 T3SS, essa bactéria codifica um SPI-1 T3SS, presente também em *S. enterica*. Contudo, existem diferenças entre os efetores secretados por esse sistema entre as duas espécies. Foram encontrados 12 possíveis efetores secretados pelo SPI-1 T3SS de *S. bongori* (FOOKES *et al.*, 2011).

A virulência de *Salmonella* spp. está relacionada a expressão de genes localizados nas ilhas de patogenicidade (SPI) (MARCUS *et al.*, 2000). A maioria dos sorotipos de *S. enterica* codificam um T6SS a partir de SPI-6 (BLONDEL *et al.*, 2009). No entanto, alguns sorotipos codificam T6SSs evolutivamente distintos a partir de diferentes ilhas de patogenicidade, como SPI-19, SPI-20 e SPI-21 (BAO *et al.*, 2019) (Figura 4). Análises filogenéticas sugerem que esses sistemas foram adquiridos em diferentes eventos de transferência horizontal e poderiam desempenhar funções distintas (BLONDEL *et al.*, 2009; FOOKES *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2019). *S. bongori* codifica um cluster estrutural de T6SS a partir de SPI-22 (FOOKES *et al.*, 2011); contudo, ainda não se conhece a função desse sistema.



**Figura 4. Relação evolutiva entre os diferentes loci de T6SS do gênero *Salmonella*.** Nesta árvore filogenética pode-se observar a distância entre os diferentes T6SSs codificados nas ilhas de patogenicidade. Para a construção da árvore foi utilizada a sequência de aminoácidos da proteína TssC (Imagem retirada de BAO *et al.*, 2019).

## 2. Justificativa

Os estudos sobre efetores bacterianos são de grande importância devido ao seu potencial biotecnológico. Algumas de suas aplicações podem ser utilizadas para combater infecções bacterianas, auxiliar no desenvolvimento de novas drogas. Com a descoberta da nova ilha de patogenicidade SPI-22 de *S. bongori*, que codifica um T6SS, é possível que encontremos efetores únicos dessa espécie. O estudo desta bactéria ainda pode ajudar a entender o processo evolutivo do gênero *Salmonella*.

Considerando os pontos levantados acima, decidimos estudar a função do SPI-22 T6SS de *S. bongori* e analisar se ele possui atividade antibacteriana ou anti-eucariótica. Além disso, decidimos identificar novos efetores secretado por esse sistema, e analisar a relação desses efetores com as diferentes proteínas VgrG codificadas no genoma de *S. bongori* NCTC 12419.

### 3. Objetivos

Estudar a função do SPI-22 T6SS de *S. bongori*, identificar um novo efector secretado por esse sistema, e analisar a contribuição das proteínas VgrG para a função do sistema.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Determinar se SPI-22 T6SS possui atividade antibacteriana;
- Identificar um efector novo efector secretado pelo SPI-22 T6SS de *S. bongori*;
- Determinar qual proteína VgrG é responsável pela secreção do efector identificado anteriormente;
- Determinar se SPI-22 T6SS possui atividade anti-eucariótica.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Cepas e cultivo

Bactérias utilizadas neste trabalho (Tabela 1), foram cultivadas em meio LB (*Lysogeny Broth*): NaCl 10 g/L; Triptona 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L (para meio sólido, é adicionado ágar bacteriológico 15 g/L). Todas as cepas utilizadas neste trabalho foram cultivadas em meio líquido a 37 °C (exceto quando indicado) sob agitação (200 rpm). Antibióticos foram utilizados nas seguintes concentrações: ampicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL, e estreptomicina 50 µg/mL.

*Dictyostelium discoideum* Ax2(Ka) (BLOOMFIELD *et al.*, 2008), foi crescido em meio HL5: peptona 14,3 g/L; extrato de levedura 7,15 g/L; maltose 18 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0,641 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,49 g/L. Culturas de *D. discoideum* foram cultivadas a 22 °C sem agitação. Experimentos de formação de placa de fagocitose foram realizados em placas de 24 poços com 1,5 cm de diâmetro (Costar® # 3524) em meio SM-ágar (*Standard Medium*) (FROQUET *et al.*, 2009): peptona 10 g/L; extrato de levedura 1 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,2 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1 g/L; glicose 1%; ágar 20 g/L

**Tabela 1. Cepas, plasmídeos e iniciadores.**

Cepa	Descrição	Fonte
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>S. enterica enterica</i> Typhimurium ATCC 14028s	ATCC
<i>Salmonella bongori</i>	<i>S. bongori</i> NCTC 12419	NCTC
$\Delta$ tssB	<i>S. bongori</i> $\Delta$ tssB (SBG_1238)	Este estudo
$\Delta$ tseV2/tsiV2.1/2.2	<i>S. bongori</i> $\Delta$ tseV2/tsiV2.1/2.2::Km (SBG_2723/SBG_2724/SBG_2725)	Este estudo
$\Delta$ tseV3/tsiV3	<i>S. bongori</i> $\Delta$ tseV3/tsiV3::Km (SBG_1841/SBG_1842)	Este estudo
$\Delta$ vgg1	<i>S. bongori</i> $\Delta$ vgg1 (SBG_1246)	Este estudo
$\Delta$ vgg2	<i>S. bongori</i> $\Delta$ vgg2 (SBG_2715)	Este estudo
$\Delta$ vgg3	<i>S. bongori</i> $\Delta$ vgg3 (SBG_3770)	Este estudo
$\Delta$ tssB tssB	<i>S. bongori</i> $\Delta$ tssB (SBG_1238) pFPV25.1 tssB	Este estudo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13439 para teste de competição bacteriana	NCTC
<i>E. coli</i> K12 W3110	Teste de competição bacteriana	Eric Cascales
<i>E. coli</i> K12 W3110 pEXT22 $\emptyset$	Teste de competição bacteriana	Este estudo
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Clonagem e teste de toxicidade	Estoque do laboratório
<i>Dictyostelium discoideum</i>	<i>D. discoideum</i> Ax2(Ka) para ensaios de formação de placas de fagocitose	Thierry Soldati
Plasmídeo	Descrição	Referência
pKD46	P <sub>BAD</sub> promotor, pSC101 oriTS, Amp <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pKD4	FRT ahp FRT PS1 PS2 oriR6K, Km <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	P <sub>BAD</sub> promotor, cl857 $\lambda$ PR FLP pSC101 oriTS, Amp <sup>R</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pBRA	Derivado de pBAD24, P <sub>BAD</sub> promotor, mob, pBBR1 ori, Sp <sup>R</sup>	Souza <i>et al.</i> , 2015
pSUB11	Derivado de pKD4, 3xFLAG FRT aph FRT, oriR6K, Km <sup>R</sup>	Uzzau <i>et al.</i> , 2001

pBRA TseV1	pBRA expressando TseV1 (SBG_2718) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pBRA TseV2	pBRA expressando TseV2 (SBG_2723) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pBRA TseV3	pBRA expressando TseV3 (SBG_1841) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pBRA TseV4	pBRA expressando TseV4 (SBG_1828) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22	P <sub>TAC</sub> promotor, R100 ori, Km <sup>R</sup>	Dykxhoorn <i>et al.</i> , 1996
pEXT22 TsiV1.1	pEXT22 expressando TsiV1.1 (SBG_2719) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22 TsiV1.2	pEXT22 expressando TsiV1.2 (SBG_2720) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22 TsiV2.1	pEXT22 expressando TsiV2.1 (SBG_2724) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22 TsiV2.2	pEXT22 expressando TsiV2.2 (SBG_2725) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22 TsiV3	pEXT22 expressando TsiV3 (SBG_1842) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT22 TsiV4	pEXT22 expressando TsiV4 (SBG_1829) para teste de toxicidade em <i>E. coli</i>	Este estudo
pEXT20	P <sub>TAC</sub> promotor, pBR322 ori, Amp <sup>R</sup>	Dykxhoorn <i>et al.</i> , 1996
pFPV25.1	P <sub>rpsM</sub> promotor, GFP mut3, pBR322 ori, Amp <sup>R</sup>	Valdivia & Falkow, 1996
pFPV25.1 TsiV2.1	pFPV25.1 expressando TsiV2.1 para competição bacteriana	Este estudo
pFPV25.1 TsiV3	pFPV25.1 expressando TsiV3 para competição bacteriana	Este estudo
pFPV25.1 TssB	pFPV25.1 expressando TssB para competição bacteriana	Este estudo
pWSK29	P <sub>TAC</sub> promotor, pSC101 ori, Amp <sup>R</sup>	Wang & Kushner, 1991

Iniciadores	Sequência	Propósito
EBS 199-F	GAGATGTTCTTAAATAGAGGTGCAGTAATTTATGC ACCAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Deleção de <i>tssB</i> (SBG_1238)
EBS 200-R	TTATCCATTGTTCTTCTCCTGTATGCGGTTACGCG TTTTCCATATGAATATCCTCCTTAG	Deleção de <i>tssB</i> (SBG_1238)
EBS 201-F	TTGCTTGATGTAATCAATTCGC	Confirmar deleção de <i>tssB</i> (SBG_1238)
EBS 202-R	CTTCGAGCATATCGCGTG	Confirmar deleção de <i>tssB</i> (SBG_1238)
EBS 326-F	GCAACAAAGTATAAAAGGAATTTCTTATGCCCGA CGTGTAGGCTGGAGCT	Deleção de <i>vgrG1</i> (SBG_1246)
EBS 327-R	ACTCATCAGTTAATCCTCACCAGTCCGCCTTTGAT CATATGAATATCCTC	Deleção de <i>vgrG1</i> (SBG_1246)
EBS 328-F	CGTTTCACACAGTAATCATGCTTATTATTTGTCC GTGTAGGCTGGAGCT	Deleção de <i>vgrG2</i> (SBG_2715)
EBS 329-R	AACATGGTGTTACCTCTCTGGCATCAGTTGAAAT GCATATGAATATCCTC	Deleção de <i>vgrG2</i> (SBG_2715)
EBS 330-F	GTATTCCGTTTCACACAGTAACCATGCTTATTATT GTGTAGGCTGGAGCT	Deleção de <i>vgrG3</i> (SBG_3770)
EBS 331-R	CTGTAAGGTTTTACTGCTCCGGCGCGTCCGGCG GCATATGAATATCCTC	Deleção de <i>vgrG3</i> (SBG_3770)
EBS 332-F	ATACAGAACTGCCGGATAG	Confirmar deleção de <i>vgrG1</i> (SBG_1246)
EBS 333-R	CCATATCGCCATGCAATAC	Confirmar deleção de <i>vgrG1</i> (SBG_1246)
EBS 334-F	GATTCTGCGTGCAATAGC	Confirmar deleção de <i>vgrG2</i> (SBG_2715)
EBS 335-R	AAATCATGGTGATATGATGACAG	Confirmar deleção de <i>vgrG2</i> (SBG_2715)
EBS 336-F	AGTCAGCAGGTTGATATCT	Confirmar deleção de <i>vgrG3</i> (SBG_3770)
EBS 337-R	GGTGAGCATAAACGGTAAC	Confirmar deleção de <i>vgrG3</i> (SBG_3770)
EBS 345-F NcoI	TTTTccatggGCGAAATTCAGGCTCCAATTGAAG	Clonagem de <i>tseV1</i> (SBG_2718 C-term) em pBRA
EBS 346-R Sall	CTTTgtcgacTCAGTCCATAATCCCTGATTTG	Clonagem de <i>tseV1</i> (SBG_2718 C-term) em pBRA
EBS 347-F EcoRI	TTTgaattcAGGAGGAATTCACCATGAATGATAAAAT AAAATCACTAC	Clonagem de <i>tsiV1.1</i> (SBG_2719) em pEXT22
EBS 348-R BamHI	TTGggatccTTAGTCCATCCTGTTTCG	Clonagem de <i>tsiV1.1</i> (SBG_2719) em pEXT22
EBS 349-F EcoRI	TTTgaattcAGGAGGAATTCACCATGCAGGACGTGA ATAAAAC	Clonagem de <i>tsiV1.2</i> (SBG_2720) em pEXT22
EBS 350-R BamHI	TTGggatccTTAATCAAAACGTTTTATCCATTTTTTC	Clonagem de <i>tsiV1.2</i> (SBG_2720) em pEXT22

EBS 351-F NcoI	TTTTccatggGCTTATGCCAAAACCCATTAAAAG	Clonagem de <i>tseV2</i> (SBG_2723 C-term) em pBRA
EBS 352-R Sall	CTTTgtcgaccTAGAATAATGATGGTATTGGAAAAG	Clonagem de <i>tseV2</i> (SBG_2723 C-term) em pBRA
EBS 353-F EcoRI	TTTgaattcAGGAGGAATTCACCGTGTATATATGAT TAATTTAAATG	Clonagem de <i>tsiV2.1</i> (SBG_2724) em pEXT22
EBS 354-R BamHI	AAGggtaccTTAAATAAAAAACGATTAAACC	Clonagem de <i>tsiV2.1</i> (SBG_2724) em pEXT22
EBS 357-F NcoI	TTTTccatggGCTTATGCCAGGAAAGCCTG	Clonagem de <i>tseV3</i> (SBG_1841 C-term) em pBRA
EBS 358-R Sall	CTTTgtcgaccTTAAATGCCATGCTGCC	Clonagem de <i>tseV3</i> (SBG_1841 C-term) em pBRA
EBS 362-R	CGTAAGAGCAACAACCG	Confirmar deleção de <i>tseV3/tsiV3</i> (SBG_1841/SBG_1842) usado com EBS 377-F
EBS 369-F	GAATGGCAATAACGATTAATATCAACGGACTGAC AGTGTAGGCTGGAGCT	Deleção de <i>tseV2/tsiV2.1/2.2</i> (SBG_2723/SBG_2724/SBG_2725)
EBS 370-R	CACTATAAATCAATTTTCATTCATCTGTTACTCCA CATATGAATATCCTC	Deleção de <i>tseV2/tsiV2.1/2.2</i> (SBG_2723/SBG_2724/SBG_2725)
EBS 371-F	TGCAAAACACCGCCTTTCCGGTGTGCCAGTGCCA GTGTAGGCTGGAGCT	Deleção de <i>tseV3/tsiV3</i> (SBG_1841/SBG_1842)
EBS 372-R	AAACTAAAGGGATTAGCGTAAGAGCAACAACCTT ACATATGAATATCCTC	Deleção de <i>tseV3/tsiV3</i> (SBG_1841/SBG_1842)
EBS 375-F	AATTATCAGAGAGAGACACCG	Confirmar deleção de <i>tseV2/tsiV2.1/2.2</i> (SBG_2723/SBG_2724/SBG_2725)
EBS 376-R	GCCTCTTGCAATGATACAAG	Confirmar deleção de <i>tseV2/tsiV2.1/2.2</i> (SBG_2723/SBG_2724/SBG_2725)
EBS 377-F	GCAGTAAGAATGACTCACATC	Confirmar deleção de <i>tseV3/tsiV3</i> (SBG_1841/SBG_1842) usado com EBS 362-R
EBS 462-F XbaI	CTAGtctagaTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACC AGGAATACTATTG	Clonagem de TssB-FLAG (SBG_1238) em pFPV25.1
EBS 463-R HindIII	ACATAagcttTTACTTGTCTCATCGTCCTTGTAGTC CGCGTTTTTCGGCC	Clonagem de TssB-FLAG (SBG_1238) em pFPV25.1
EBS 482-F XbaI	CTAGtctagaTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGTG ATAACAAGACATT	Clonagem de <i>tsiV3</i> (SBG_1842) em pFPV25.1
EBS 483-R HindIII	CCCaagcttTTAATCAAAGCGCCTTATC	Clonagem de <i>tsiV3</i> (SBG_1842) em pFPV25.1
EBS 484-F NcoI	CATTccatggGTATGTGTGCGGAAGGG	Clonagem de <i>tseV4</i> (SBG_1828) em pBRA usado com EBS 358-F
EBS 485-F BamHI	AAACggtaccAGGAGGAATTCACCATGAGTGATAAC AAGACATTACC	Clonagem de <i>tsiV4</i> (SBG_1829) em pEXT22
EBS 486-R HindIII	TTTaaagcttTTAATCAAAGCGCCTTATCC	Clonagem de <i>tsiV4</i> (SBG_1829) em pEXT22
EBS 503-F BclI	AAAAtgatcaGTGTTATATATGATTAATTTAAATG	Clonagem de <i>tsiV2.1</i> (SBG_2724) em pFPV25.1
EBS 504-R HindIII	CCCaagcttTTAAATAAAAAACGATTAAAC	Clonagem de <i>tsiV2.1</i> (SBG_2724) em pFPV25.1
EBS 506-F BamHI	TTTggtaccAGGAGGAATTCACCATGAGTGATAACA AGACATTAC	Clonagem de <i>tsiV3</i> (SBG_1842) em pEXT22
EBS 507-R HindIII	TTAATCAAAGCGCCTTATCaagcttAAAA	Clonagem de <i>tsiV3</i> (SBG_1842) em pEXT22
EBS 508-F KpnI	TTTTggtaccAGGAGGAATTCACCATGCAGGTAAAC AATACATTATG	Clonagem de <i>tsiV2.2</i> (SBG_2725) em pEXT22
EBS 509-R BamHI	CTATAAATCAATTTTCATTCATCTGggtaccAAAA	Clonagem de <i>tsiV2.2</i> (SBG_2725) em pEXT22

<sup>a</sup>As enzimas de restrição estão em minúsculas e o epítipo FLAG está sublinhado.

## 4.2. Mutagênese

Para construir as cepas mutantes de *S. bongori* (Tabela 1), foi utilizado o protocolo descrito por Datsenko e Warnner (2000). Brevemente, cepas selvagens são transformadas com o plasmídeo pKD46 (termosensível) que codifica genes de  $\lambda$ -Red ( $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\text{exo}$ ) e crescidas a 30 °C. Plasmídeos contendo genes de resistência aos antibióticos cloranfenicol ou canamicina (pKD3 e pKD4, respectivamente) são utilizados como molde para uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram

desenhados iniciadores que possuem 15 nucleotídeos (nt) de homologia com o plasmídeo e 35 nt de homologia com as regiões flanqueadoras do gene alvo a ser deletado. Para a transformação com o produto de PCR, bactérias contendo pKD46 foram crescidas até OD<sub>600nm</sub> 0.6 em 15 mL de meio LB contendo 1,5% L-arabinose, e eletroporadas (2500 V, aproximadamente 5,8 ms). A seleção de clones contendo o gene de resistência integrado no genoma foi realizada em placas contendo antibiótico. Para remover o gene de resistência das cepas mutantes, essas foram transformadas com o plasmídeo pCP20 que expressa um gene de recombinase (FLP) que reconhece as regiões FRT (FLP *recognition target*) que flanqueiam o gene de resistência a antibiótico. Ambos pKD46 e pCP20 foram eliminados posteriormente cultivando as bactérias a 37 °C por 16 h e confirmando por repique das colônias em meio com e sem antibióticos.

A inserção do epítipo 3xFLAG no C-terminal do gene Hcp (SBG\_1240) foi realizada por recombinação homóloga utilizando o sistema  $\lambda$ -Red e uma sequência molde amplificada a partir do plasmídeo pSUB11 (UZZAU *et al.*, 2001).

### 4.3. Clonagem de plasmídeo para complementação

A complementação dos mutantes  $\Delta tssB$  (SBG\_1238),  $\Delta tsiV2.1$  (SBG\_2724),  $\Delta tsiV3$  (SBG\_1842) foram realizadas utilizando o plasmídeo pFPV25.1 (VALDIVIA; FALKOW, 1996). Este plasmídeo possui o promotor do gene *rpsM* (STM14\_4121) que controla a expressão da proteína ribossomal S13 e confere expressão constitutiva (VALDIVIA; FALKOW, 1996). Para as clonagens, foram utilizadas as enzimas de restrição (*tssB*: XbaI/PaeI; *tsiV2.1*: BclI/HindIII; *tsiV3*: XbaI/HindIII) e os iniciadores descritos na Tabela 1 de modo a retirar o gene que promove a expressão da proteína GFP (*mut1*) e inserir os genes de interesse.

### 4.4. Análises *in silico* para identificação de efetores do SPI-22 T6SS

Foi realizado uma busca por BLAST no genoma de *S. bongori* NCTC 12419 para procurar possíveis efetores codificados na vizinhança gênica de VgrG, Hcp, PAAR, PAAR-like (DUF4150), DUF2169, DUF1795 e DUF4123. Após a identificação da posição dos genes de T6SS descritos acima, foram analisados 10 genes a montante e a jusante destes utilizando o programa Bastion6 (WANG *et al.*, 2018). O programa prediz a probabilidade de uma proteína ser um efector do T6SS, utilizando modelos conhecidos e por um processo de aprendizado de máquina. Os resultados

são atribuídos um valor numérico entre 0 – 1. Valores maiores ou iguais a 0,5 foram considerados como candidatos a efetores. Para as análises foram utilizadas as configurações padrões para a análise.

#### **4.5. Ensaio de toxicidade em *Escherichia coli***

As clonagens e os ensaios de toxicidade em *E. coli* foram realizados pelos estudantes de iniciação científica Julia Takuno Hespanhol (FAPESP nº 18/25316-4) e Gustavo Chagas Santos (FAPESP nº 20/15389-4) de acordo com o protocolo descrito por Bayer-Santos *et al.* (2019). Em resumo, *E. coli* contendo os genes efetores clonados no plasmídeo pBRA (SOUZA *et al.*, 2015) e os genes de proteínas de imunidade no plasmídeo pEXT22 (DYKXHOORN *et al.*, 1996) foram crescidas em meio LB, OD<sub>600nm</sub> ajustadas para 1.0 e diluídas em série. Em seguida, 5 µL de cada diluição foram plaqueados em placas LB-ágar contendo 0,2% D-glicose para repressão dos genes, ou em 0,2% L-arabinose e 200 mM IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) para indução da expressão dos genes.

#### **4.6. Western blot**

*S. bongori* WT e *S. bongori*::Hcp3xFLAG foram crescidos até OD<sub>600nm</sub> 2.5, e 1 mL das culturas foi coletado por centrifugação (13500 g por 2 min), o sobrenadante da cultura foi descartado e adicionado tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (dodecil sulfato de sódio), 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol, 12,5 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 0,02 % azul de bromofenol) com inibidores de protease (Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-Free # A32965) às células, na proporção de 100 µL para cada pellet de células obtido a partir de 1 mL de cultura em OD<sub>600nm</sub> 1.0. As amostras foram desnaturadas a 100 °C por 15 min e separadas em SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Após a transferência das amostras para a membrana de nitrocelulose (0,2 µm), essas foram bloqueadas com uma solução contendo 5% de leite desnatado, Tween 20 0.05% em tampão fosfato salina (PBS) por 2 h. Em seguida, foi realizada incubação com o anticorpo primário anti-FLAG (Sigma-Aldrich® #F7425) (diluição 1:4000) por 1 h. As membranas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 20 0.05% por 5 min cada, sob agitação. E em seguida, incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Thermo Fisher Scientific™ #31460) (diluição 1:8000) por 1 h, seguido pelo mesmo ciclo de lavagens. Como o anticorpo secundário é conjugado à HRP

(*horseradish peroxidase*), as membranas foram reveladas utilizando o substrato luminol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pierce™ ECL *Western blotting* #32106).

#### 4.7. Ensaios de competição bacteriana

Para este ensaio, as bactérias foram classificadas como predadoras (bactérias com T6SS ativo) e presas (bactérias susceptíveis ao ataque das predadoras). Para a contagem das UFCs (unidades formadoras de colônia) das presas, *K. pneumoniae* foi selecionada usando ampicilina, os mutantes  $\Delta tseV2/tsiV2.1/2.2::km$  e  $\Delta tseV3/tsiV3::km$ , ainda possuem as resistências a canamicina provenientes do processo de deleção descrito a cima, e *E. coli* foi transformada com pEXT22 (DYKXHOORN *et al.*, 1996), que promove resistência canamicina. Todos os predadores, tanto selvagem quanto mutantes não possuem resistência a antibióticos. A partir de um pré-inóculo de 3 mL de LB contendo antibióticos crescido por 16 h, foi realizado um sub-inóculo (1:50) no mesmo meio sem antibióticos e crescido a 37 °C até OD<sub>600nm</sub> igual a 1,0. Em seguida, a OD<sub>600nm</sub> foi ajustada para 0.4, e as cepas misturadas na proporção 4:1 (predadora:presa) ou 10:1 para os ensaios com mutantes de  $\Delta vgrG$ . Em membranas de nitrocelulose (0,2 µm) cortadas nas dimensões 1x1 cm e em tubos de 1,5 mL contendo 995 µL de meio LB, foram depositados 5 µL da mistura predador:presa. Os tubos foram diluídos e plaqueados para contagem do tempo zero (*input*), e as membranas foram incubadas em uma placa de LB-ágar a 37 °C por 24 horas. Em seguida, as membranas foram coletadas com pinça, transferidas para tubos de 1.5 mL contendo 1 mL de LB, vortexadas, e feitas diluições seriadas para contagem das UFCs (*output*). Para realizar o cálculo da taxa de presas recuperadas após cada tempo de co-incubação, as UFCs do *output* foram divididas pelo valor obtido no *input* de sua respectiva condição. Para a visualização do resultado da competição, os valores de cada condição foram normalizados pelo valor da condição controle, considerando WT=1.

$$\frac{UFC\ Output(wt)}{UFC\ Input(wt)} = X(= 1) \quad \frac{UFC\ Output}{UFC\ Input} = Y \quad \frac{Y}{X} = Taxa\ de\ recuperação\ de\ presas$$

#### 4.8. Ensaio de formação de placa de fagocitose

Ensaios foram realizados conforme protocolo de Froquet *et al.* (2009). Em resumo, placas de 24 poços (Costar® # 3524) foram preparadas com 2 mL de meio SM-ágar. Bactérias foram crescidas em 3 mL de LB por 16 h e normalizadas para

OD<sub>600nm</sub> 2,0. Foram depositados 50 µL de cada cultura bacteriana em cada poço contendo aproximadamente  $2,8 \times 10^4$  UFCs, e deixado secar em fluxo laminar por 1 h - fazendo movimentos circulares periodicamente para distribuir as bactérias de forma homogênea até secar. As células de *D. discoideum* foram lavadas duas vezes em meio DB (*development buffer*) (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.5). A quantidade de células foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e ajustada a um volume de 5 µL. Diluições seriadas para atingir a concentração de 10000, 15000, 20000 e 40000 células foram realizadas, e em seguida foi depositado 5 µL no centro de cada poço. Após secagem das gotas no fluxo laminar, as placas foram cultivadas por um período de 4-7 dias a 22 °C e foto documentadas.

#### 4.9. Análises bioinformáticas

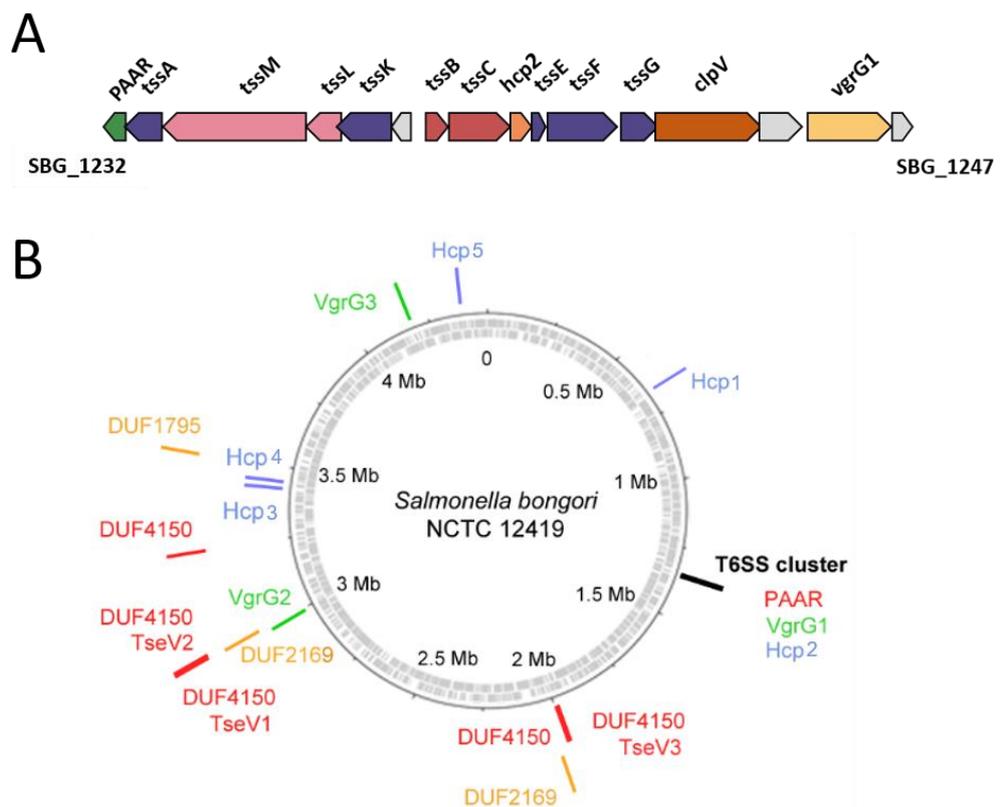
Alinhamento de sequências foram produzidas pelo algoritmo de pareamento-local MAFFT (KATOY; STANDLEY, 2013) e analisadas com AliView (LARSSON, 2014) para separar as áreas de interesse. Os logos das sequências foram produzidos utilizando Jalview (WATERHOUSE *et al.*, 2009). As predições de estrutura foram realizadas com ColabFold (MIRDITA *et al.*, 2021) e AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021), e a visualização por meio de Pymol (DELANO, 2002).

Os genomas de *S. bongori* NCTC 12419 (número de acesso ASM25299v1) e *S. Typhimurium* ATCC 14028s (número de acesso ASM2216v1) foram retirados da base de dados do NCBI e alinhados utilizando BLASTn (CAMACHO *et al.*, 2009). Os alinhamentos foram analisados usando Artemis Comparison Tool (ATC) (CARVER *et al.*, 2005). O mapa genômico foi construído usando ATC plug-in DNAPlotter (CARVER *et al.*, 2009).

## 5. Resultados

### 5.1. Identificação de componentes do T6SS no genoma de *Salmonella bongori* NCTC 12419

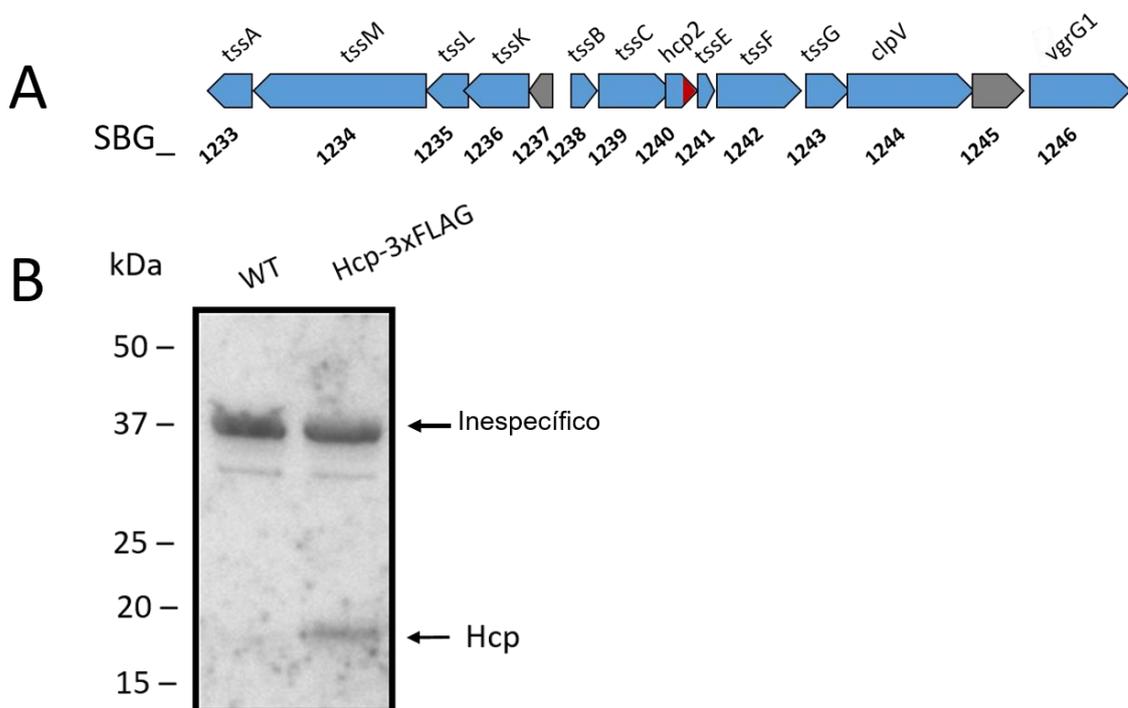
O cluster de genes do SPI-22 T6SS é codificado pelos genes presentes na região entre SBG\_1232 e SBG\_1247 no genoma de *S. bongori* NCTC 12419 (Figura 5A) (FOOKES *et al.*, 2011). Para identificação de genes órfãos codificados fora desta região, realizamos uma busca por BLAST utilizando os homólogos codificados dentro do cluster estrutural como *query*. Encontramos três genes codificando VgrG (SBG\_1246, SBG\_2715 e SBG\_3770), um gene com domínio PAAR (SBG\_1232), cinco genes contendo o domínio PAAR-like/DUF4150 (SBG\_1841, SBG\_1846, SBG\_2718, SBG\_2723 e SBG\_2955), e cinco genes contendo o domínio Hcp (SBG\_0599, SBG\_1240, SBG\_3120, SBG\_3143 e SBG\_3925) (Tabela 2, Figura 5B). Esses genes foram renomeados arbitrariamente em ordem numérica como descrito na figura 5B.



**Figura 5. Cluster do SPI-22 T6SS e genes órfãos codificados no genoma de *S. bongori* NCTC 12419. (A)** Representação esquemática dos genes do cluster estrutural do T6SS. **(B)** Mapa circular do genoma de *S. bongori* mostrando as posições dos genes órfãos (azul: Hcp; verde: VgrG; vermelho: PAAR; amarelo: adaptadores).

## 5.2. O SPI-22 T6SS é expresso constitutivamente em meio LB

O SPI-6 T6SS de *Salmonella enterica* Typhimurium está reprimido em meio LB pela proteína H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*) (BRUNET *et al.*, 2015). Para analisarmos se a expressão de SPI-22 T6SS de *S. bongori* está ativa em meio LB, realizamos uma fusão do epítipo FLAG (3xFLAG) na porção C-terminal do gene Hcp (SBG\_1240) no seu locus genômico (Figura 6A), sendo regulado pelo promotor endógeno. Análises por *Western blot* do extrato total de proteínas da cepa contendo Hcp-3xFLAG (17 kDa) revelaram uma banda do tamanho esperado, sugerindo que o SPI-22 T6SS esteja ativo nessas condições (Figura 6B).

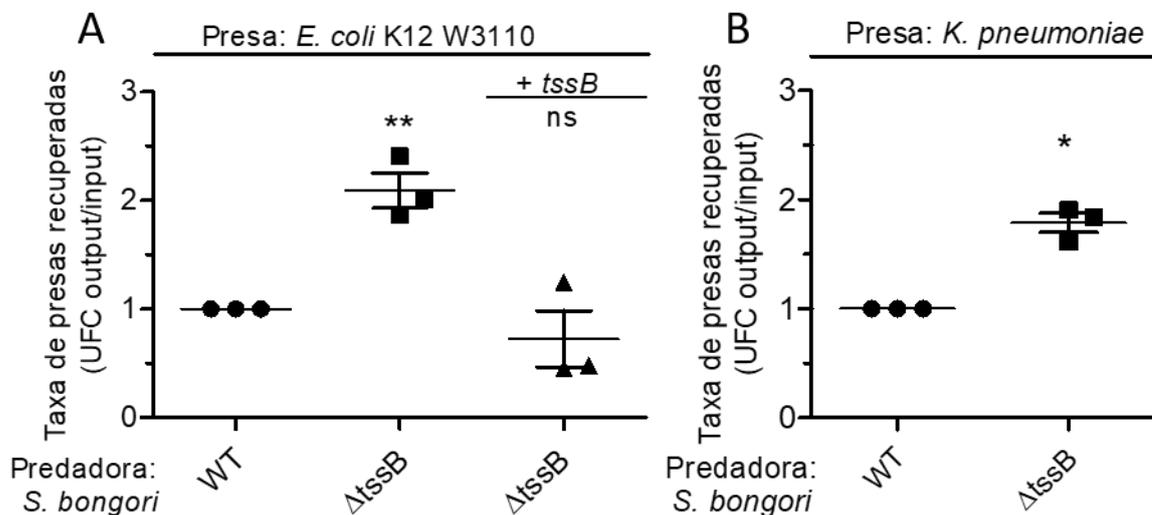


**Figura 6. Expressão de Hcp-3xFLAG é constitutiva em meio LB. (A)** Genes estruturais do SPI-22 T6SS (azul) e epítipo 3xFLAG (vermelho) fusionado a região C-terminal da proteína Hcp (SBG\_1240). **(B)** Cepas WT e Hcp-3xFLAG foram crescidas em meio LB líquido até OD<sub>600nm</sub> igual a 2. As bactérias foram coletadas e o extrato total de proteínas separado em SDS-PAGE 15%, seguido de *Western blot* com anticorpos anti-FLAG.

## 5.3. O SPI-22 T6SS possui atividade antibacteriana

Uma vez que as evidências sugerem que o SPI-22 T6SS é expresso de forma constitutiva quando cultivada em meio LB, decidimos analisar se o SPI-22 T6SS de *S. bongori* possui atividade antibacteriana. Iniciamos ensaios de competição entre *S. bongori*, *E. coli* (K12 W3110) e *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13439) (Figura 7). Para verificar se o SPI-22 T6SS é de fato utilizado por *S. bongori* para a competição, utilizamos duas cepas para as competições: WT (*wild-type*) e  $\Delta$ tssB (mutante nulo

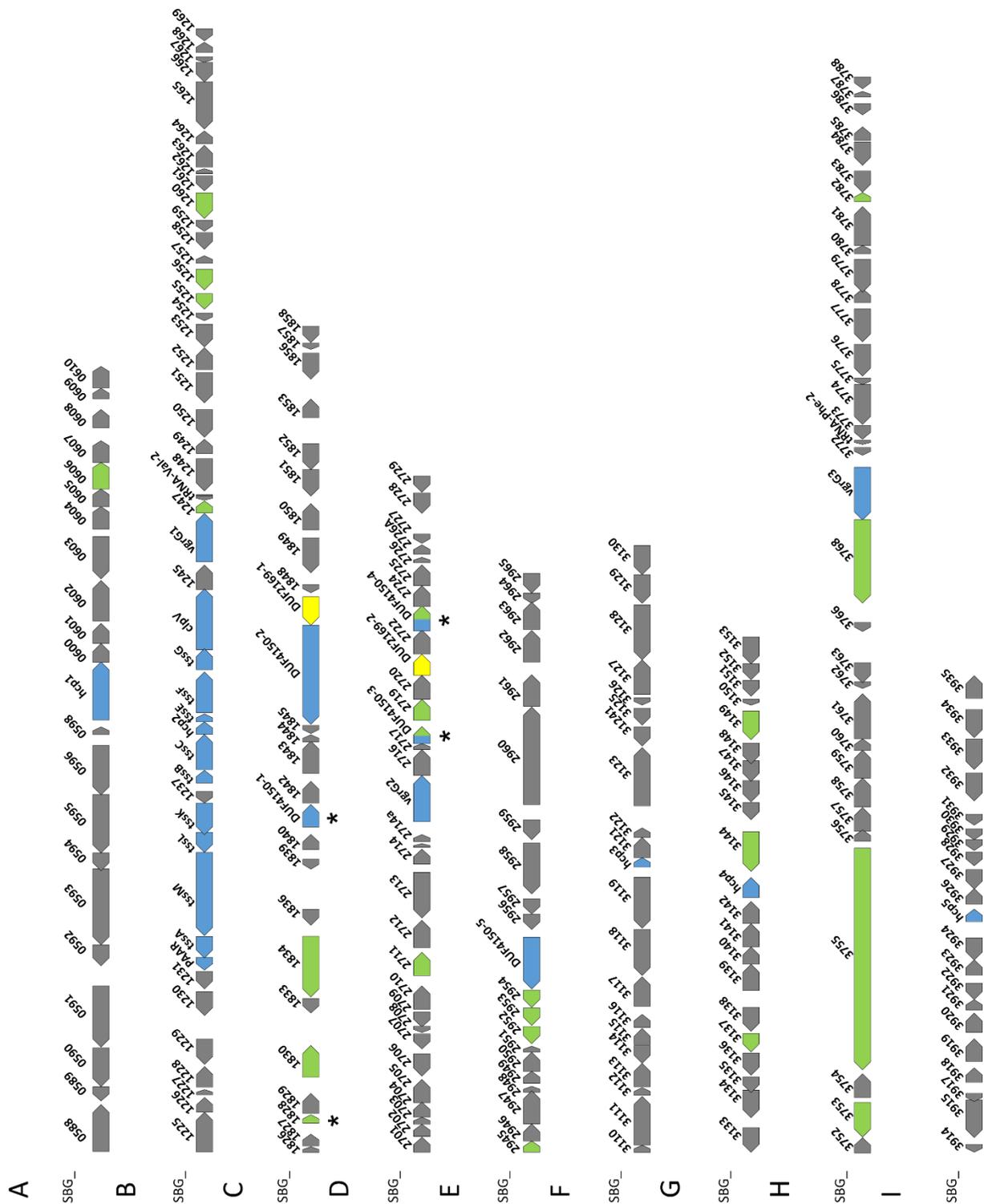
T6SS). O motivo de utilizarmos um mutante  $\Delta tssB$  é devido a ser uma proteína importante para a contração da bainha do sistema T6SS (BÖNEMANN *et al.*, 2009). Observamos que quando *S. bongori* WT e  $\Delta tssB$  (predadora) eram co-incubadas com *E. coli* (presa), era possível recuperar mais presas quando essas eram co-incubada com  $\Delta tssB$  (Figura 7A). O mesmo perfil foi obtido para uma segunda espécie de presa, *Klebsiella pneumoniae* (Figura 7B). A complementação de  $\Delta tssB$ , restaurou os níveis observados para a cepa WT, confirmando a atividade antibacteriana do SPI-22 T6SS (Figura 7A). Esses resultados demonstram que o SPI-22 T6SS tem atividade antibacteriana.



**Figura 7. O SPI-22 T6SS fornece vantagem competitiva para *S. bongori* contra outras espécies bacterianas. (A)** Competição bacteriana entre *S. bongori* e *E. coli* K12 W3110 em meio LB. **(B)** Competição bacteriana entre *S. bongori* WT,  $\Delta tssB$  e  $\Delta tssB$  complementado com pFPV25.1 expressando *tssB* contra *E. coli* K12 W3110 e *K. pneumoniae* em meio LB-ágar incubando por 24 horas. O resultado representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisados por meio de comparação com WT que foi normalizado para 1. One-way ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett's. (\*  $p < 0,5$ ; \*\* $p < 0,05$  e ns, não significativo).

#### 5.4. Identificação de efetores secretados pelo SPI-22 T6SS

Sabendo que o SPI-22 T6SS possui atividade antibacteriana, decidimos analisar o genoma de *S. bongori* em busca de possíveis efetores que pudessem promover esse fenótipo. Utilizamos o programa Bastion6 (WANG *et al.*, 2018) para identificar prováveis efetores codificados na vizinhança de genes estruturais/órfãos e adaptadores do T6SS. Analisamos 10 genes a montante ou jusante dos genes de interesse (Figura 8), e encontramos um total de 23 candidatos (Tabela 2).



**Figura 8.** Esquema da região genômica contendo os genes estruturais T6SS (azul), os prováveis efetores identificados (verde) e proteínas adaptadoras DUF2169 (amarelo). **(A)** Cluster de genes vizinhos a Hcp1. **(B)** Cluster estrutural de T6SS contendo PAAR (SBG\_1232), Hcp2 (SBG\_1240) e VgrG1 (SBG\_1246). **(C)** Cluster de genes vizinhos a DUF4150-1 (SBG\_1841), DUF4150-2 (SBG\_1846) e DUF2169-1 (SBG\_1847). **(D)** Cluster de genes vizinhos a VgrG2 (SBG\_2715), DUF4150-3 (SBG\_2718), DUF2169-2 (SBG\_2721) e DUF4150-4 (SBG\_2723). **(E)** Cluster de genes vizinhos a DUF4150-5 (SBG\_2955). **(F)** Cluster de genes vizinhos a Hcp3 (SBG\_3120). **(G)** Cluster de genes vizinhos a Hcp4 (SBG\_3143). **(H)** Cluster de genes vizinhos a VgrG3 (SBG\_3770). **(I)** Cluster de genes vizinhos a Hcp5 (SBG\_3925). Foram analisados 10 genes a montante e a jusante de cada gene estrutural utilizando software Bastion6 (WANG *et al.*, 2018).

Dentre os efetores preditos, os genes SBG\_2718 e SBG\_2723 chamaram nossa atenção (Figura 8D), pois contém um domínio N-terminal PAAR-like/DUF4150 e um domínio C-terminal anotado como VRR-Nuc (*virus-type replication-repair nuclease*) (Pfam PF08774) (KINCH et al, 2005; IYER et al., 2006).

**Tabela 2. Prováveis efetores do SPI-22 T6SS de acordo com predição do programa Bastion6.**

Figura 8	KEGG <sup>a</sup>	Nome <sup>b</sup>	Domínio (Pfam)	e-value	Predição Bastion6 <sup>c</sup>
Cluster (A)	SBG_0599	Hcp1	T6SS_HCP	2.1e-13	0.814
	SBG_0606		CT_C_D	1.7e-93	0.539
Cluster (B)	SBG_1232		PAAR_motif	0.0043	0.312
	SBG_1234		ImcF-related_N	7.1 e-26	0.507
	SBG_1240	Hcp2	T6SS_HCP	3.6 e-37	0.682
	SBG_1246	VrgG1	VgrG	1.5 e-78	0.945
	SBG_1247		MORN_2	0.0093	0.658
	SBG_1255		Sod_Fe_	4.2 e-39	0.626
	SBG_1256		NLPC_P	6.3 e-3	0.569
	SBG_1260		Oxidored_FMN	1.4 e-88	0.536
Cluster (C)	SBG_1828		DUF4366	0.089	0.606
	SBG_1830		Peptidase_C69	2.1 e-123	0.803
	SBG_1834		Autotransporter	7.2 e-41	0.669
	SBG_1841	TseV3	DUF4150+VRR-Nuc	3.3 e-30	0.821
	SBG_1846		DUF4150+EndoU	1.1 e-33	0.934
	SBG_1847		DUF2169	1 e-71	0.590
Cluster (D)	SBG_2715	VrgG2	VgrG	2.1 e-71	0.926
	SBG_2711		Mltc_	1.8 e-66	0.663
	SBG_2718	TseV1	DUF4150+VRR-Nuc	2.6 e-34	0.495
	SBG_2719		DUF3396	8.2 e-26	0.756
	SBG_2721		DUF2169	3 e-63	0.630
	SBG_2723	TseV2	DUF4150+VRR-Nuc	1.4 e-31/0.021	0.549
Cluster (E)	SBG_2945		LptD_N	7.9 e-32	0.575
	SBG_2952		unknow	-	0.906
	SBG_2953		unknow	-	0.886
	SBG_2954		unknow	-	0.851
	SBG_2955		DUF4150+DUF3274	3.7 e-31	0.949
Cluster (F)	SBG_3120	Hcp3	T6SS_HCP	1.6 e-20	0.644
Cluster (G)	SBG_3137		Pirin	1.8 e-37	0.707
	SBG_3143	Hcp4	T6SS_HCP	0.003	0.831
	SBG_3144		G_glu_transpept	2.5 e-187	0.524
	SBG_3149		SBP_bac_8	2.5 e-42	0.631

Cluster (H)	SBG_3770	VgrG3	VgrG	5.1 e-72	0.872
	SBG_3753		DUF1996	1.2 e-38	0.945
	SBG_3755		Big_13	9.8 e-23	0.567
	SBG_3756		unknow	-	0.629
	SBG_3768		unknow	-	0.938
	SBG_3782		DUF4156	1.2 e-30	0.619
Cluster (I)	SBG_3925	Hcp5	T6SS_HCP	6.50 e-26	0.526

Genes estruturais (azul) utilizados para análise da vizinhança. Efetores preditos (verde) e adaptadores (amarelo).

<sup>a</sup>número de acesso KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

<sup>b</sup>nomes arbitrários utilizados neste trabalho.

<sup>c</sup>score Bastion6.

O domínio de VRR-Nuc de TseV4 (SBG\_1828) não foi identificado durante a análise por Bastion6

A jusante dos genes SBG\_2718 e SBG\_2723 pode-se encontrar dois pares de genes que possuem o domínio DUF3396 (SBG\_2719 e SBG\_2720; SBG\_2724 e SBG\_2725) (Pfam PF11876) (Figura 8D). Esta configuração de genes sugere que as proteínas contendo o domínio VRR-Nuc (SBG\_2718 e SBG\_2723) poderiam ser efetores fusionados ao domínio PAAR-like/DUF4150, e os genes com domínio DUF3396 poderiam ser proteínas de imunidade.

Após as análises iniciais pelo software Bastion6, utilizamos a ferramenta BLASTP (KANEHISA *et al.* 2022) para localizar outros genes que possuíam o domínio VRR-Nuc no genoma de *S. bongori*. Identificamos os genes SBG\_1828 e SBG\_1841, ambos apresentando uma proteína contendo DUF3396 codificada a jusante (Figura 8C). SBG\_1828 parece estar truncada, pois não possui domínio N-terminal PAAR-like/DUF4150 - o que provavelmente inviabilizaria sua secreção via SPI-22 T6SS (Figura 9).

Embora tenhamos encontrado genes que aparentam ser efetores evoluídos e possuem um valor de predição do Bastion6 mais alto (SBG\_1846, com 0.934; SBG\_2955, com 0.949) que as dos genes com domínio predito para os VRR-Nuc (SBG\_2718, com 0.495; SBG\_2723, com 0.549; SBG\_1841, com 0.821; SBG\_1828, com 0.606), decidimos estudá-los devido a existirem quatro cópias de possíveis efetores no genoma, e por ser um domínio associado com atividade de nucelase, podendo ser um efector que interaja com células eucarióticas. Desta maneira, consideramos as proteínas com domínio VRR-Nuc como possíveis efetores do SPI-22 T6SS, e renomeamos os genes SBG\_2718, SBG\_2723, SBG\_1841 e SBG\_1828

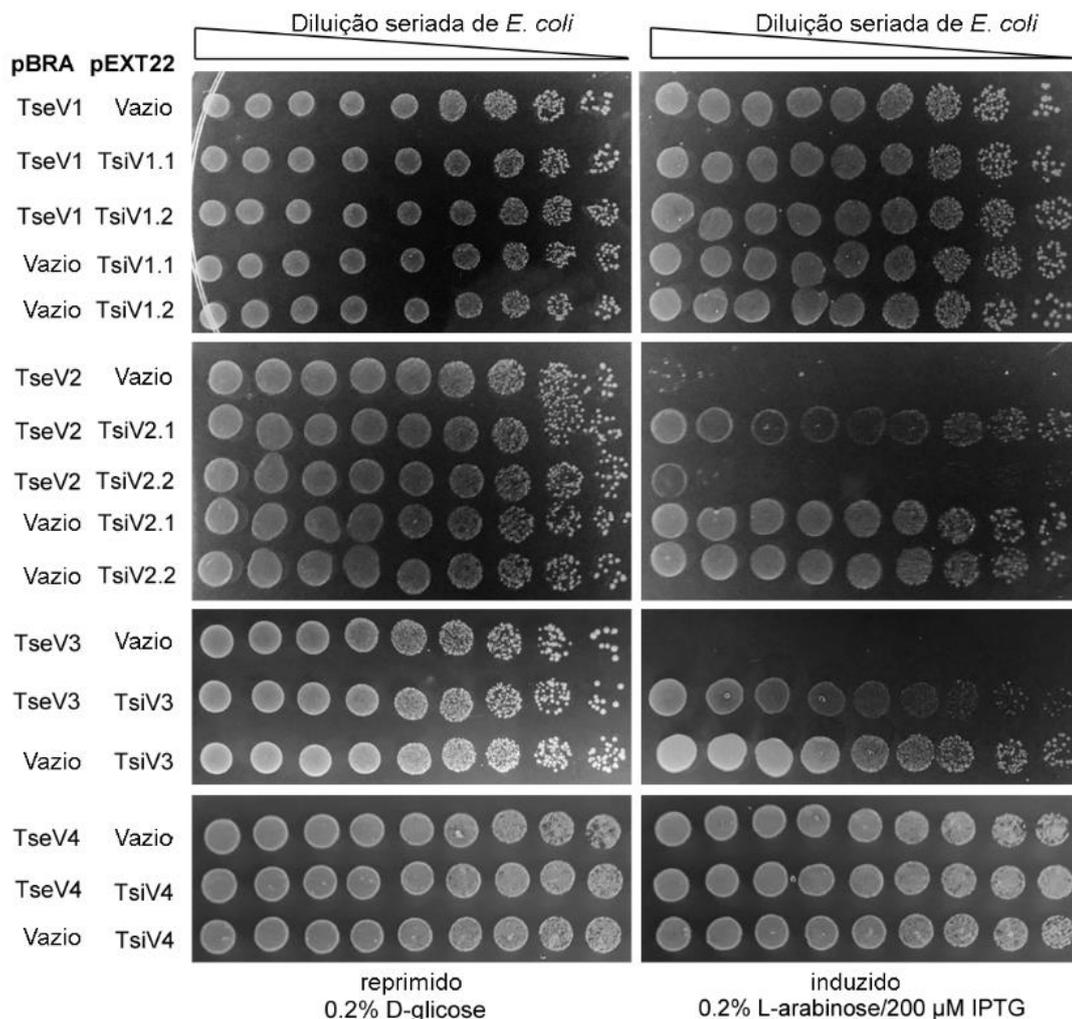
para TseV1, TseV2, TseV3 e TseV4 (*Type VI effector with VRR-Nuc*), respectivamente, seguindo a nomenclatura previamente proposta por Wang *et al.* (2021). As possíveis proteínas de imunidade também foram renomeadas: SBG\_2719 e SBG\_2720 como TsiV1.1 e TsiV1.2; SBG\_2724 e SBG\_2725 como TsiV2.1 e TsiV2.2; SBG\_1842 como TsiV3 e SBG\_1829 como TsiV4.



**Figura 9. Alinhamento comparativo de genes contendo o domínio VRR-Nuc.** SBG\_1841, SBG\_2723 e SBG\_2718 possuem domínios DUF4150 em sua porção N-terminal e VRR-Nuc em seu C-terminal. SBG\_1828 apresenta somente um domínio VRR-Nuc. Estrela vermelha indica o início do alinhamento do domínio VRR-Nuc. Alinhamentos feitos por Aliview (LARSSON *et al.*, 2014) e logo adicionado com Jalview (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

### **5.5. TseV2/TsiV2.1 e TseV3/TsiV3 constituem pares efetor e proteína de imunidade**

Para testar a atividade antibacteriana dos genes TseV1, TseV2, TseV3, e TseV4 foram realizados ensaios de toxicidade em *E. coli* (Figura 10). Para esses ensaios, cada efetor e sua respectiva proteína de imunidade foram clonados em plasmídeos compatíveis e com expressão controlada. A porção C-terminal dos efetores TseV1, TseV2 e TseV3, e a sequência completa de TseV4 foram clonados no plasmídeo pBRA, que possui um promotor P<sub>BAD</sub> (induzido por L-arabinose e reprimido por D-glicose) (SOUZA *et al.*, 2015). As proteínas de imunidade foram clonadas no plasmídeo pEXT22, que possui um promotor P<sub>TAC</sub> que é induzido por IPTG (DYKXHOORN *et al.*, 1996). Em seguida, cada par de efetor e proteína de imunidade foram co-transformados em *E. coli*. As cepas foram crescidas, diluídas, e 5 µL de cada cepa foi adicionado sobre placas de LB-ágar contendo 0,2% de D-glicose ou 0,2% de L-arabinose mais 200 µM de IPTG. Os resultados demonstraram que TseV1 e TseV4 não apresentam atividade toxica, e apenas TseV2 e TseV3 foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* (Figura 10). Além disso, verificamos que somente a proteína de imunidade TsiV2.1 foi capaz de proporcionar imunidade contra TseV2. Da mesma forma, apenas TsiV3 foi capaz de neutralizar o efeito tóxico de TseV3 (Figura 10).



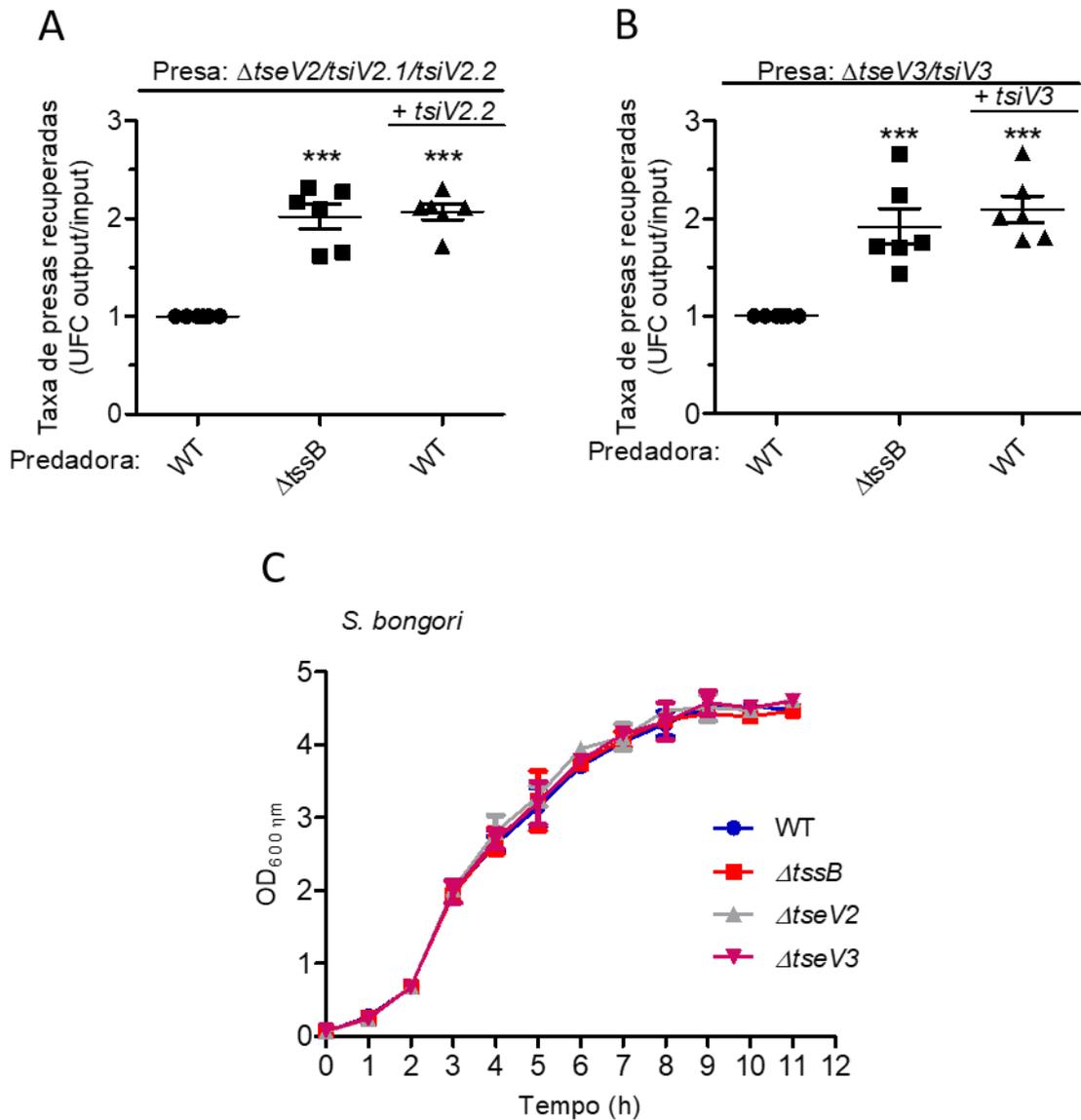
**Figura 10. Ensaio de toxicidade em *E. coli*.** Os genes com domínio VRR-Nuc (TseV1-4) foram clonados no plasmídeo pBRA, e os genes de proteínas de imunidade (TsiV1-4) foram clonados no plasmídeo pEXT22, com expressão regulada pelos promotores  $P_{BAD}$  e  $P_{TAC}$ , respectivamente. Imagens cedidas por Julia Takuno Hespanhol e Gustavo Chagas Santos.

### 5.6. TseV2 e TseV3 são efetores secretados pelo SPI-22 T6SS

Sabendo que TseV2 e TseV3 possuem atividade tóxica quando expressas no citoplasma de *E. coli*, ainda era necessário verificar se esses efetores são dependentes do T6SS para a sua secreção. Para testar essa hipótese, utilizamos uma cepa triplo mutante  $\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  e uma duplo mutante  $\Delta tseV3/tsiV3$  como presas para competir contra WT e  $\Delta tssB$  em ensaios de competição bacteriana (Figura 11A e 11B). Se os efetores forem secretados via SPI-22 T6SS, a ausência de suas respectivas imunidades na célula presa deixaria essa susceptível a intoxicação.

Realizando esses ensaios, recuperamos um maior número de presas quando as cepas susceptíveis foram co-incubadas com  $\Delta tssB$ , indicando que TseV2 e TseV3 são secretados via SPI-22 T6SS (Figura 11A e 11B). Além disso, quando

$\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  foi complementada com o plasmídeo pFVP25.1 expressando TsiV2.1, essa cepa deixou de ser susceptível a WT (Figura 11A). O mesmo padrão foi observado para  $\Delta tseV3/tsiV3$  (Figura 11B). As curvas de crescimento demonstram que mesmo com as deleções dos genes, o crescimento das cepas não foi afetado (Figura 11C)



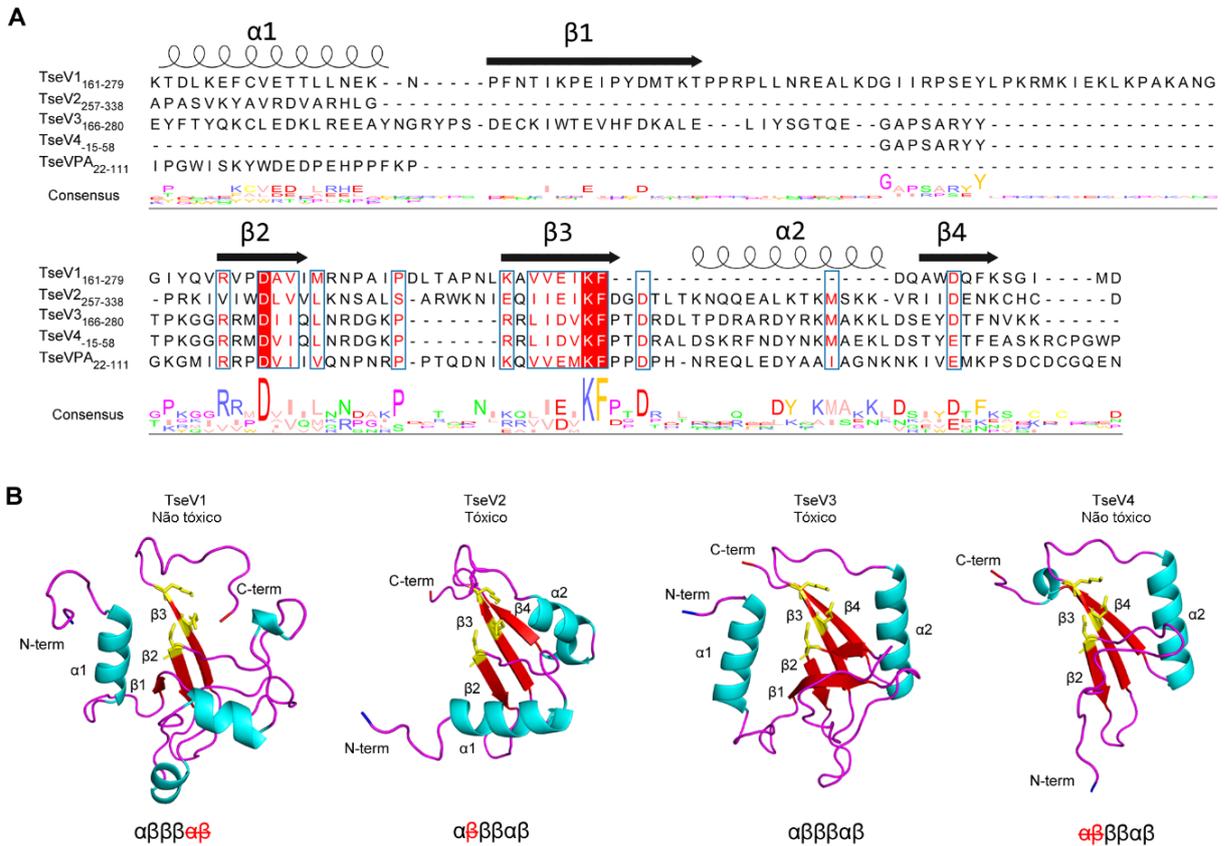
**Figura 11. TseV2 e TseV3 são secretados via SPI-22 T6SS. (A)** Competição bacteriana de *S. bongori* WT e  $\Delta tssB$  contra cepa triplo mutante  $\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  complementada ou não com pFPV25.1  $t siV2.1$ . O resultado representa a média e desvio padrão de seis experimentos realizados independentemente em duplicata. **(B)** Competição bacteriana de *S. bongori* WT e  $\Delta tssB$  contra cepa duplo mutante de  $\Delta tseV3/tsiV3$  complementada ou não com pFPV25.1  $t siV3$ . O resultado representa a média e desvio padrão de seis experimentos realizados independentemente em duplicata. **(C)** Curva de crescimento das cepas mutantes e WT de *S. bongori* utilizados nos ensaios de competição. A curva representa a média de dois experimentos independentes. (\*\*\*)  $p=0,005$ ; ns, não significativo).

### 5.7. Predições das estruturas 3D dos efetores TseV1-4

Proteínas contendo o domínio VRR-Nuc constituem uma família (PF08774) que pertence a superfamília PD-(D/E)xK (STECZKIEWICZ *et al.*, 2012). A superfamília PD-(D/E)xK é composta por um grupo funcionalmente diverso que possui representantes que estão envolvidos em replicação de DNA (*Holliday junction resolvases*), processos de restrição-modificação, reparo de DNA e *splicing* (STECZKIEWICZ *et al.*, 2012). Inicialmente foi sugerido que proteínas contendo o domínio VRR-Nuc estariam envolvidas com metabolismo de DNA (IYER *et al.*, 2006). O domínio de VRR-Nuc é caracterizado por ter uma arquitetura singular no seu core catalítico, formada por duas alfa-hélices e quatro folhas beta na sequência:  $\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  (STECZKIEWICZ *et al.*, 2012). Os resíduos catalíticos conservados característicos da superfamília PD-(D/E)xK (Asp, Glu e Lys) estão localizados entre  $\beta_2\beta_3$  (STECZKIEWICZ *et al.*, 2012).

Para entender melhor o motivo pelo qual somente TseV2 e TseV3 possuem atividade tóxica em *E. coli*, analisamos as sequências primárias e as predições das estruturas terciárias dos homólogos TseV1, TseV2, TseV3 e TseV4 de *S. bongori*, e ainda incluímos TseV<sup>PA</sup> de *Pseudomonas aeruginosa* (PA0822) (WANG *et al.*, 2021).

Através de uma análise cuidadosa das sequências, é possível observar que partes essenciais do core catalítico ( $\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ ) estão ausentes nos efetores TseV1, TseV2 e TseV4 (Figura 12A e 12B). TseV1 não possui  $\alpha_2$  e  $\beta_4$ ; TseV2, não contém  $\beta_1$ ; e TseV4 não contém  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  (Figura 12A e 12B). Como TseV2 é a proteína tem menos componentes estruturais ausentes e ainda tem efeito tóxico, isso indica que  $\beta_1$  talvez não seja essencial para a atividade enzimática.



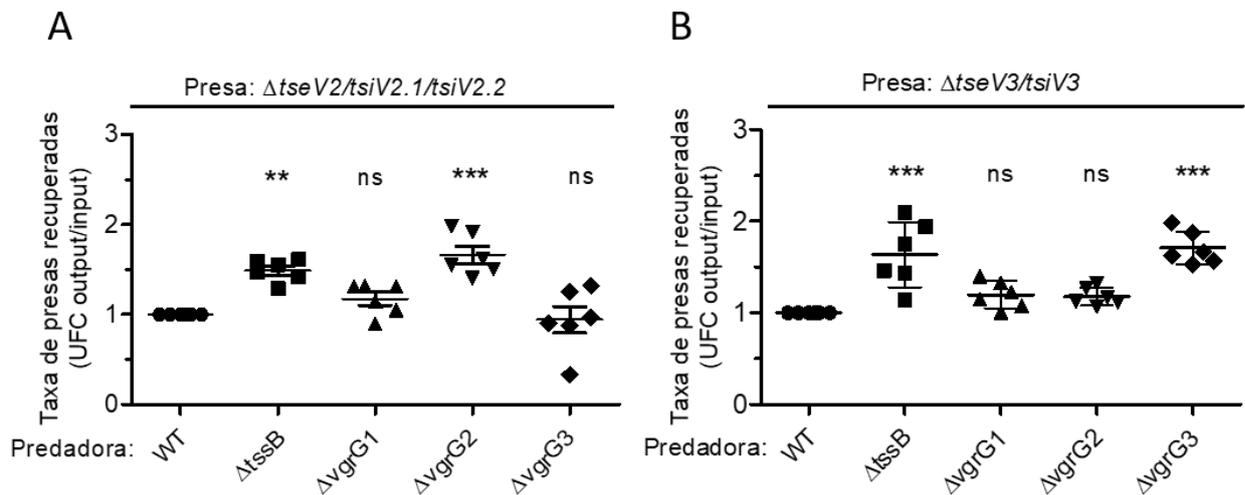
**Figura 12. Alinhamento e predição estrutural de TseV1, TseV2, TseV3 e TseV4. (A)** Alinhamento estrutural dos domínios de VRR-Nuc de TseV1, TseV2, TseV3, TseV4 e TseV<sup>PA</sup>. **(B)** Predições estruturais do core catalítico dos efetores TseV1-4 de *S. bongori*. Abaixo está assinalado em vermelho os elementos estruturais ausentes em cada homólogo.

### 5.8. TseV2 e TseV3 dependem de VgrGs distintos para secreção

As proteínas PAAR ficam localizadas na extremidade do dardo formado por VgrGs, havendo interação específica entre essas proteínas (SHNEIDER *et al.*, 2013). Deste modo, para que um efetor contendo o domínio PAAR seja secretado, esse precisa interagir com um VgrG. Como os efetores TseV2 e TseV3 possuem um domínio PAAR-like/DUF4150 na porção N-terminal, gostaríamos de identificar a qual dos três VgrGs codificados no genoma de *S. bongori*, esses dois efetores poderiam associar-se para secreção (HACHANI *et al.*, 2014; BONDAGE *et al.*, 2016). Para tanto, construímos cepas mutantes para os três VgrGs e realizamos ensaios de competição bacteriana. Para este ensaio, utilizamos a cepa triplo mutante  $\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  e a duplo mutante  $\Delta tseV3/tsiV3$  como presas para competir contra WT,  $\Delta tssB$  e os mutantes de cada VgrG encontrado no genoma de *S. bongori*:  $\Delta vgrG1$  (SBG\_1246),  $\Delta vgrG2$  (SBG\_2715) e  $\Delta vgrG3$  (SBG\_3770) (Figura 13).

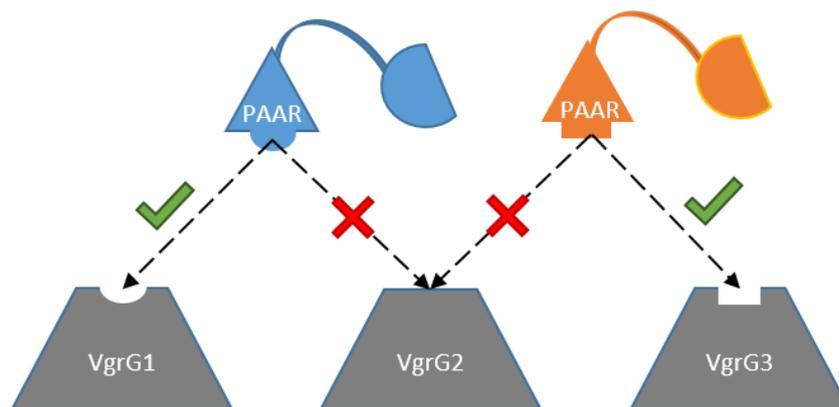
Quando competimos  $\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  contra as cinco cepas predadoras, somente obtivemos um número maior de recuperação de presas quando essas foram

co-incubadas com  $\Delta tssB$  e  $\Delta vgrG2$ , indicando que VgrG2 é importante para secreção de TseV2 (Figura 13A). Além disso, quando competimos  $\Delta tseV3/tsiV3$  contra as cinco cepas predadoras, observamos uma maior recuperação de presas quando co-incubadas com  $\Delta tssB$  e  $\Delta vgrG3$ , sugerindo que a secreção de TseV3 é dependente de VgrG3 (Figura 13B).



**Figura 13. TseV2 e TseV3 são secretados por VgrGs distintos.** (A) Competição bacteriana de *S. bongori*  $\Delta tseV2/tsiV2.1/tsiV2.2$  contra mutantes de três proteínas VgrG. (B) Competição bacteriana de *S. bongori*  $\Delta tseV3/tsiV3$  contra mutantes de três proteínas VgrG. O resultado representa a média e o desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em duplicata. (\*\*  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p > 0.005$ ; ns não significativo).

Um trabalho recente revelou que a porção C-terminal das proteínas VgrG determina a interação e seleção de efetores (LIANG *et al.*, 2021) (Figura 14).



**Figura 14. Modelo de interação entre as proteínas PAAR e VgrG:** A extremidade C-terminal do trîmero de VgrG possui sequências de amino ácidos distintos, o que promove a especificidade da interação com as proteínas de secreção como o PAAR, efetores e proteínas adaptadoras. Por meio destas sequências distintas é possível que ocorra a secreção de múltiplos efetores ligados ao VgrG no caso de ser formado por um heterotrîmero.

As proteínas VgrG2 e VgrG3 (órfãs) são bastante diferentes quando comparadas a VgrG1, que é codificada dentro do cluster SPI-22 T6SS (25,2% e 24,2% de identidade, respectivamente) (Figura 15). No entanto, as proteínas VgrG2 e VgrG3 apresentam 80,4% de identidade, considerando a sequência completa dessas duas proteínas. Além disso, a porção N-terminal de VgrG2 e VgrG3 possui uma identidade de 96,9% (VgrG2<sub>1-565</sub> e VgrG3<sub>1-545</sub>), e somente 26% de identidade entre as regiões C-terminais (VgrG2<sub>566-709</sub> e VgrG3<sub>546-728</sub>) (Figura 16). Esses resultados corroboram os achados que indicam que a região C-terminal de VgrG seja responsável pela seleção dos efetores (LIANG *et al.*, 2021).



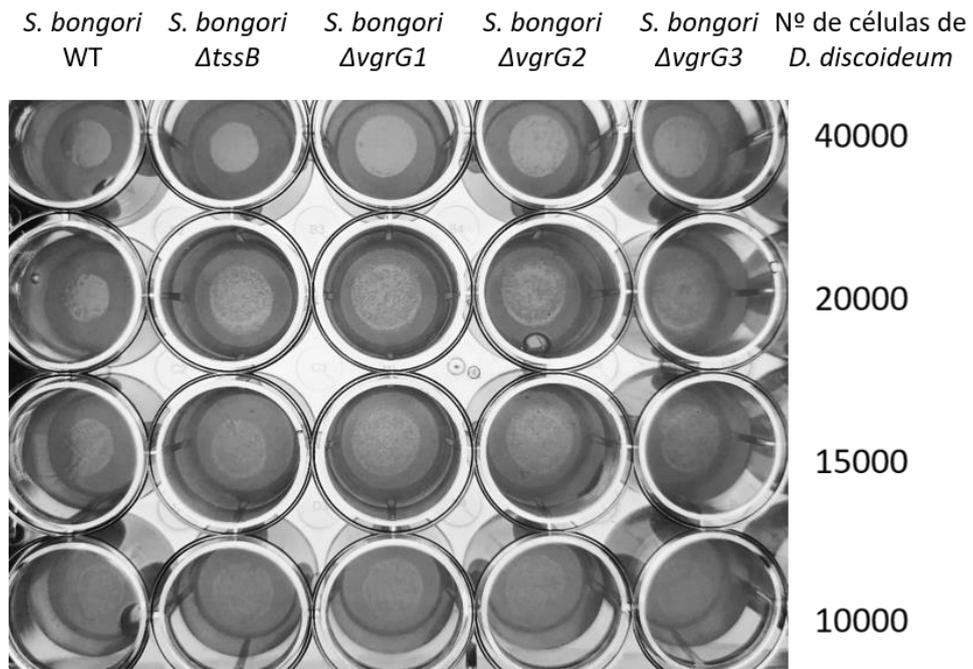
**Figura 15. Alinhamento das proteínas VgrG1, VgrG2 e VgrG3 de *S. bongori*.** Alinhamento da sequência de aminoácidos de VgrG1 (SBG\_1246), VgrG2 (SBG\_2715) e VgrG3 (SBG\_3770). Alinhamento feito com AliView (LARSSON, 2014) e logo das sequências adicionadas em Jalview (WATERHOUSE *et al.*, 2009).



**Figura 16. Alinhamento das proteínas VgrG2 e VgrG3 de *S. bongori*.** Alinhamento de sequência de aminoácidos de VgrG2 e VgrG3. Alinhamento feito com AliView (LARSSON, 2014) e logo das seqüências adicionados em Jalview (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

### 5.9. Ensaio de formação de placa de fagocitose

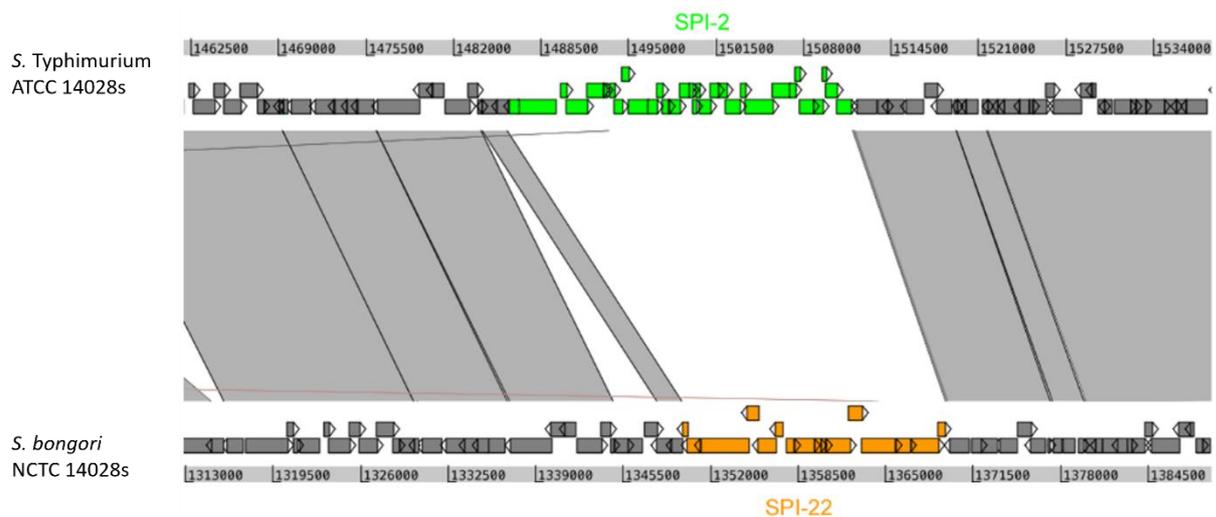
Para testar se o SPI-22 T6SS de *S. bongori* é capaz de atacar células eucariotas, decidimos realizar ensaios de formação de placa de fagocitose utilizando como modelo a ameba de vida livre *Dictyostelium discoideum*. Neste ensaio, foram utilizados *S. bongori* WT,  $\Delta$ tssB,  $\Delta$ vgrG1,  $\Delta$ vgrG2 e  $\Delta$ vgrG3 como fonte de alimento para *D. discoideum* (Figura 17). Os resultados revelam a formação de um halo maior na cepa  $\Delta$ tssB em comparação a WT (Figura 17), sugerindo que o T6SS de *S. bongori* promova alguma resistência ao ataque de *D. discoideum*. Porém, esses resultados ainda são muito preliminares para permitir que possamos chegar a uma conclusão sobre a atividade anti-eucariótica de SPI-22 T6SS.



**Figura 17. Ensaio de fagocitose com *Dictyostelium discoideum*.** Representação média de três experimentos de fagocitose utilizando *S. bongori* WT,  $\Delta tssB$ ,  $\Delta vgrG1$ ,  $\Delta vgrG2$  e  $\Delta vgrG3$ . Cada poço apresenta aproximadamente  $2,8 \times 10^4$  UFCs. As fotos foram tiradas no quarto dia de incubação. A direita está representada a quantidade de *D. discoideum* inoculada em cada poço da placa.

## 6. Discussão

Quando as bactérias estão inseridas em um ambiente em que há necessidade de disputar recursos, cada pequena vantagem que uma bactéria possa apresentar para se sobressair em relação às competidoras é de grande importância para a sua sobrevivência. Durante o processo evolutivo, *S. bongori* adquiriu o SPI-22 T6SS, o qual foi inserido no mesmo locus gênico que o SPI-2 T3SS de *S. enterica* (Figura 18). O SPI-2 T3SS de *S. enterica* é ativado após a entrada da bactéria no vacúolo fagocítico de células hospedeiras por meio da sinalização da mudança do pH (LÖBER *et al.*, 2006). Aproximadamente 30 efetores distintos são liberados através da membrana do vacúolo via SPI-2 T3SS (MILLS *et al.*, 2008), e podem ter funções variadas (FIGUEIRA; HOLDEN, 2012). O SPI-2 T3SS é importante para a infecção e sobrevivência de *S. enterica* em macrófagos (HENSEL *et al.*, 1998). Uma das nossas hipóteses é que SPI-22 T6SS poderia também fornecer alguma vantagem no confronto contra células eucarióticas.



**Figura 18. Sintenia da região genômica contendo SPI-22 T6SS de *S. bongori* e SPI-2 T3SS de *S. enterica* Typhimurium 14028s.** Alinhamento genômico das regiões que codificam o SPI-22 T6SS de *S. bongori* NCTC 12419 (ASM25299v1) e o SPI-2 T3SS de *S. Typhimurium* 14028s (ASM2216v1). Análises realizadas utilizando o software ACT (CARVER *et al.*, 2012).

De acordo com Fookes *et al.* (2011), o SPI-22 T6SS de *S. bongori* possui similaridade com o locus CTS2 T6SS de *Citrobacter rodentium*, indicando uma possível transferência horizontal de genes. Embora possua um TssM truncado devido a uma mutação de mudança de fase de leitura do gene que o codifica, o locus CTS2 de *C. rodentium* é importante para que ocorra a colonização do intestino dos murinos

e também é um importante fator de virulência para este patógeno (SERAPIO-PALACIOS *et al.*, 2022).

De acordo com os resultados dos ensaios de expressão Hcp e competição bacteriana (Figura 6 e 7), podemos concluir que a expressão do SPI-22 T6SS é constitutiva em meio LB e proporciona atividade antibacteriana. Esses resultados contrastam com o que é observado para SPI-6 T6SS de *S. Typhimurium*, que está reprimido nas mesmas condições pela proteína H-NS (Brunet *et al.*, 2015). A proteína H-NS é conhecida por se ligar e reprimir regiões do genoma que são ricas em A/T, frequentemente resultantes de transferências horizontais (NAVARRE *et al.*, 2007). Foi demonstrado que ambos locus que codificam T6SS em *C. rodentium* (CTS1 e CTS2) são ativados pela deleção de H-NS, contudo é possível detectar uma expressão basal dos genes de CTS2 em bactérias com H-NS WT (SERAPIO-PALACIOS *et al.*, 2022). O motivo pelo qual H-NS não silencia o cluster de SPI-22 T6SS é desconhecido, mas é possível que diferenças nas regiões promotoras dos dois clusters possam explicar esse fenótipo.

*S. bongori* demonstrou possuir um grande arsenal de efetores que podem ser utilizados para competir com as distintas espécies de bactérias que possa encontrar no ambiente (DURAND *et al.*, 2014). A expressão de vários efetores com a mesma arquitetura (TseV1-4) demonstra que esse grupo deve ser importante para a competição bacteriana (Figura 9).

As alterações estruturais do core catalítico ( $\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ ) dos efetores TseV pode explicar o motivo pelo qual somente TseV2 e TseV3 são tóxicos quando expressas em *E. coli* (Figura 12). Segundo Steczkiewicz *et al.* (2012), o domínio VRR-Nuc, que pertence a superfamília PD-(D/E)xK, pode possuir variações em sua estrutura. TseV2 e TseV3 apresentam mais estruturas importantes conservadas em relação aos outros efetores. Segundo as nossas previsões, TseV1 não possui os dois últimos elementos  $\alpha_2\beta_4$  do core catalítico. Já os dois primeiros elementos  $\alpha_1\beta_1$  estão ausentes em TseV4. TseV2 não possui a  $\beta_1$ , mas ainda consegue ter um efeito tóxico. Esse resultado pode indicar que  $\beta_1$  não seja essencial para a atividade enzimática de VRR-Nuc, ou que alguma outra alteração estrutural compensou a ausência de  $\beta_1$ . O mesmo pode ser observado no trabalho de Wang *et al.* (2021), onde TseV<sup>PA</sup> possui um domínio VRR-Nuc com as mesmas características de TseV2 (ausência de  $\beta_1$ ), e ainda assim apresenta atividade tóxica.

Para que possa ocorrer a secreção de efetores evoluídos contendo PAAR, é necessário que ocorra a interação com uma proteína VrgG (WOOD *et al.*, 2019). O motivo pelo qual somente um VgrG é responsável pela secreção de cada efetor está relacionado a proteína PAAR possuir especificidade por VgrG (Figura 13 e 14) (BONDAGE *et al.*, 2016; LIANG *et al.* 2021). A proteína PAAR é importante para estabilizar o enovelamento das porções C-terminais do trímero de VgrG, onde essas proteínas se encontram e interagem. Esse tipo de interação ocorre por meio de pontes de hidrogênio entre as fitas  $\beta$  do C-terminal do trímero de VgrG e a base cônica de PAAR (SHNEIDER *et al.*, 2013). Essa especificidade pode ser evidenciada nos nossos resultados com VgrG2 e VgrG3 (Figura 16), nos quais apenas a sequência C-terminal é divergente. Essas mudanças ocasionaram que apenas um VgrG seja capaz de interagir com um TseV (Figura 13). Desta maneira, diferentes combinações de efetores podem ser injetados em uma bactéria alvo pela seleção de VgrGs distintos (HACHANI *et al.*, 2014), possibilitando uma maior vantagem competitiva à bactéria predadora.

## 7. Conclusão

Neste trabalho caracterizamos a atividade antibacteriana de SPI-22 T6SS. Demonstramos a utilização de dois efetores antibacterianos evoluídos de proteínas PAAR-like com o domínio VRR-Nuc. Além disso, confirmamos que os efetores TseV2 e TseV3 são secretados via SPI-22 T6SS por meio de interação com VgrG2 e VgrG3, respectivamente. Esses resultados revelam que *S. bongori* é capaz de montar um T6SS carregando diferentes proteínas tóxicas, o que confere vantagem adaptativa para esta espécie.

## 9. Referências

- AAKRE, CHRISTOPHER D.; PHUNG, TUYEN N.; HUANG, D.; LAUB, MICHAEL T. A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation through a Direct Interaction with the  $\beta$  Sliding Clamp. *Molecular Cell*, v. 52, n. 5, p. 617-628, 2013.
- ALCOFORADO-DINIZ, J.; LIU, Y. C.; COULTHURST, S. J. Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cellular microbiology*, v. 17 n. 12, p. 1742–1751, 2015.
- ALIKHAN N-F, ZHOU Z.; SERGEANT M. J.; ACHTMAN M. A genomic overview of the population structure of Salmonella. *PLOS Genetics*, v. 14, n. 4, e1007261, 2018.
- ALTINDIS, E.; DONG, T.; CATALANO, C.; MEKALANOS, J. Secretome analysis of *Vibrio cholerae* type VI secretion system reveals a new effector-immunity pair. *MBio*, v. 6, e00075-15, 2015.
- ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 100, n. 7, p. 2939-2951, Apr 2016.
- ANDERSEN, C. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. Em *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* p. 122-165. Springer Berlin Heidelberg. 2003.
- AOKI, S. K. Contact-Dependent Inhibition of Growth in *Escherichia coli*. *Science*, v. 309, n. 5738, p. 1245-1248, 2005.
- ARAVIND, L.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res*, v. 28, n. 18, p. 3417-3432, 2000.
- ASHTON, P. M.; NAIR, S.; PETERS, T. M.; BALE, J. A.; POWELL, D. G.; PAINSET, A.; TEWOLDE, R.; SCHAEFER, U.; JENKINS, C.; DALLMAN, T. J.; DE PINNA, E. M.; GRANT, K. A. Identification of Salmonella for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ*, v. 4, e1752, 2016.
- BAO, H.; ZHAO, J. H.; ZHU, S.; WANG, S.; ZHANG, J.; WANG, X. Y.; *et al.* Genetic diversity and evolutionary features of type VI secretion systems in Salmonella. *Future Microbiol.* v. 14, p. 139-154, 2019.
- BAYER-SANTOS E.; LIMA L.P.; CESETI L.M.; RATAGAMI C.Y.; SANTANA E.S.; SILVA A.M.; FARAH C.S.; ALVAREZ-MARTINEZ C.E. Xanthomonas citri T6SS mediates resistance to Dictyostelium predation and is regulated by an ECF sigma factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environ Microbiol*, v. 20, p. 1562–1575, 2018.
- BAYER-SANTOS, E.; CENENS, W.; MATSUYAMA, B. Y.; OKA, G. U.; DI SESSA, G.; MININEL, I. D. V.; ALVES, T. L.; FARAH, C. S. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. *PLOS Pathogens*, v. 15, n. 9, e1007651, 2019.
- BIRCH, L. C. The Meanings of Competition. *The American Naturalist*, v. 856, n. 91, p. 5–18, 1957.
- BLONDEL, C.J.; JIMENEZ, J.C.; CONTRERAS, I. SANTIVIAGO, C.A. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. *BMC Genomics*. v. 10, p.354, 2009.
- BLOOMFIELD, G.; TANAKA, Y.; SKELTON, J.; IVENS, A. *et al.* Widespread duplications in the genomes of laboratory stocks of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Biology*, v. 9, n. 4, p. R75, 2008.
- BRODIN, P.; ROSENKRANDS, I.; ANDERSEN, P.; COLE, S. T.; BROSCHE, R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol*, v. 12, n. 11, p. 500-508, 2004.
- BROOKS, T. M.; UNTERWEGER, D.; BACHMANN, V.; KOSTIUK, B.; PUKATZKI, S. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *The Journal of biological chemistry*, v. 288 n. 11, p. 7618-7625, 2013.
- BRUNET, Y. R.; KHODR, A.; LOGGER, L.; AUSSEL, L.; MIGNOT, T.; RIMSKY, S.; CASCALES, E.; BÄUMLER, A. J. H-NS Silencing of the Salmonella Pathogenicity Island 6-Encoded

Type VI Secretion System Limits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 7, p. 2738-2750, 2015.

BLONDEL, C. J.; JIMÉNEZ, J. C.; LEIVA, L. E.; ÁLVAREZ, S. A. *et al.* The Type VI Secretion System Encoded in *Salmonella* Pathogenicity Island 19 Is Required for *Salmonella enterica* Serotype Gallinarum Survival within Infected Macrophages. *Infection and Immunity*, v. 81, n. 4, p. 1207-1220, 2013.

BONDAGE, D. D.; LIN, J.; MA, L.; KUO, C.; LAI, R. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor–effector complex. *PNAS*, v. 113, n. 27, p. 3931-3940, 2016.

BÖNEMANN, G.; PIETROSIUK, A.; DIEMAND, A.; ZENTGRAF, H.; MOGK, A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *The EMBO Journal*, v. 28, n. 4, p. 315-325, 2009.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 421, 2009.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN, M.; RAJANDREAM, M. A. *et al.* ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*, v. 21, n. 16, p. 3422-3423, 2005.

CARVER, T.; THOMSON, N.; BLEASBY, A.; BERRIMAN, M. *et al.* DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics*, v. 25, n. 1, p. 119-120, 2009.

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.

CASCALES, E.; BUCHANAN, S. K.; DUCHE, D.; KLEANTHOUS, C.; LLOUBES, R.; POSTLE, K.; RILEY, M.; SLATIN, S.; CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 71, p.158–229, 2007.

CAO, Z.; CASABONA, M. G.; KNEUPER, H.; CHALMERS, J. D.; PALMER, T. The type VII secretion system of *Staphylococcus aureus* secretes a nuclease toxin that targets competitor bacteria. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 16183, 2017.

CEPAS, V.; SOTO, S. M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. v.9, n. 10, 2020.

CHEN, S.; LARSSON, M.; ROBINSON, R. C.; CHEN, S. L. Direct and convenient measurement of plasmid stability in lab and clinical isolates of *E. coli*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 2017.

CHOI, J. S.; KIM, W.; SUK, S.; PARK, H. *et al.* The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. *RNA Biology*, v. 15, n. 10, p. 1319-1335, 2018/10/03 2018.

CIANCIOTTO, N. P.; WHITE, R. C. Expanding Role of Type II Secretion in Bacterial Pathogenesis and Beyond. *Infect Immun*, v. 85, n. 5, May 2017.

CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L. COULTHURST, S. J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends Microbiol.* v. 24, p. 51-62, 2016.

CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, JI. Plant Immunity: a Lesson from Pathogenic Effector Proteins. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 10, p. 1453-1461, 2009.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n.12, p. 6640-6645, 2000.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography*, v. 40, n. 1, p. 82-92, 2002.

DURAND, E.; CABBILLAU, C.; CASCALES, E. JOURNET, L. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol.* v. 22, p. 498-507, 2014.

DYKXHOORN, D. M.; ST PIERRE, R.; LINN, T. A set of compatible tac promoter expression vectors. *Gene*, v. 177, n. 1-2, p. 133-136, 1996.

- FIGUEIRA, R.; HOLDEN, D. W. Functions of the Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology (Reading)*, v. 158, n. Pt 5, p. 1147-1161, 2012.
- FINERAN, P. C.; BLOWER, T. R.; FOULDS, I. J.; HUMPHREYS, D. P. *et al.* The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 3, p. 894-899, 2009.
- FILLOUX, A. Microbiology: a weapon for bacterial warfare. *Nature*. v. 500, p. 284-285, 2013.
- FITZSIMONS, T. C.; LEWIS, J. M.; WRIGHT, A.; KLEIFELD, O.; SCHITTENHELM, R. B.; POWELL, D.; *et al.* Identification of Novel Acinetobacter baumannii Type VI Secretion System Antibacterial Effector and Immunity Pairs. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 8, e00297-18, 2018.
- FLAUGNATTI, N.; LE, T. T.; CANAAN, S.; ASCHTGEN, M. S.; NGUYEN, V. S.; BLANGY, S.; *et al.* A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* v. 99, p. 1099–1118, 2016.
- FOOKES, M.; SCHROEDER, G.N.; LANGRIDGE, G.C.; BLONDEL, C.J.; MAMMINA, C.; CONNOR, T.R.; *et al.* Salmonella bongori provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS pathogens*, v. 7, e1002191, 2011.
- FROQUET, R.; LELONG, E.; MARCHETTI, A.; COSSON, P. Dictyostelium discoideum: A model host to measure bacterial virulence. *Nature protocols*, v. 4, p. 25-30, 2009.
- FUKAMI, T. Historical Contingency in Community Assembly; Integrating, Niches Species Pools, and Priority Effects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 46, n. 1, p. 1-23, 2015.
- GARCÍA-BAYONA, L.; GUO, M. S.; LAUB, M. T. Contact-dependent killing by Caulobacter crescentus via cell surface-associated, glycine zipper proteins. *Elife*, v. 6, e24869, 2017.
- GARMORY, H. S.; TITBALL, R. W.; BROWN, K. A.; BENNETT, A. M. Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated Salmonella. *Microb Pathog*, v. 34, n. 3, p. 115-119, 2003.
- GERDES, K.; BECH, F. W.; JØRGENSEN, S. T.; LØBNER-OLESEN, A. *et al.* Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *The EMBO Journal*, v. 5, n. 8, p. 2023-2029, 1986.
- GIAMMANCO, G. M.; PIGNATO, S.; MAMMINA, C.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A.; NASTASI, A.; GIAMMANCO, G. Persistent endemicity of Salmonella bongori 48:z(35):--in Southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *J Clin Microbiol*, v. 40, n. 9, p. 3502-3505, 2002.
- GOEDERS, N.; VAN MELDEREN, L. Toxin-Antitoxin Systems as Multilevel Interaction Systems. *Toxins*, v. 6, n. 1, p. 304-324, 2014.
- HACHANI, A.; ALLSOPP, L.P.; ODUKO, Y. FILLOUX, A. The VgrG proteins are "a la carte" delivery systems for bacterial type VI effectors. *The Journal of biological chemistry*, v. 289, p. 17872-17884, 2014.
- HAGA, T.; KUMABE, S.; IKEJIRI, A.; SHIMIZU, Y.; LI, H.; GOTO, Y.; MATSUI, H.; MIYATA, H.; MIURA, T. In Vitro and in Vivo Stability of Plasmids in Attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium Used as a Carrier of DNA Vaccine is Associated with its Replication Origin. *Experimental Animals*, v. 55, n. 4, p. 405-409, 2006.
- HERNANDEZ, R. E.; GALLEGOS-MONTERROSA, R.; COULTHURST, S. J. Type VI secretion system effector proteins: Effective weapons for bacterial competitiveness. *Cellular Microbiology*, v. 22, n. 9, p. e13241, 2020.
- HESPANHOL, J. T.; SANCHEZ LIMACHE, D. E.; GONÇALVES NICASTRO, G.; MEAD, L.; LLONTOP, E. E.; SANTOS, G. C.; FARAH, C. S.; DE SOUZA, R. F.; GALHARDO, R. D. S.; LOVERING, A.; SANTOS, E. B. *Antibacterial T6SS effectors with a VRR-Nuc domain induce target cell death via DNA Double-Strand Breaks*, Cold Spring Harbor Laboratory, *Ahead of print*, 2021. <https://dx.doi.org/10.1101/2021.12.26.474169>
- HENSEL, M.; SHEA, J.; GLEESON, C.; JONES, M.; DALTON, E.; HOLDEN, D. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, v. 269, n. 5222, p. 400-403, 1995.

HENSEL, M.; SHEA, J. E.; BÄUMLER, A. J.; GLEESON, C.; BLATTNER, F.; HOLDEN, D. W. Analysis of the boundaries of Salmonella pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology*, v. 179, n. 4, p. 1105-1111, 1997.

HENSEL, M.; SHEA, J. E.; WATERMAN, S. R.; MUNDY, R.; NIKOLAUS, T.; BANKS, G.; VAZQUEZ-TORRES, A.; GLEESON, C.; FANG, F. C.; HOLDEN, D. W. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol*, v. 30, n. 1, p. 163-174, 1998.

HIBBING, M.; FUQUA, C.; PARSEK, M.; PETERSON, B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, p. 15-25, 2010.

HICKS, S. W.; GALÁN, J. E. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat Rev Microbiol*, v. 11, n. 5, p. 316-326, 2013.

HOOD, R. D.; SINGH, P.; HSU, F.; GÜVENER, T.; CARL, M. A.; TRINIDAD, R. R.; SILVERMAN, J. M.; OHLSON, B. B.; HICKS, K. G.; PLEMEL, R. L.; LI, M.; SCHWARZ, S.; WANG, W. Y.; MERZ, A. J.; GOODLETT, D. R.; MOUGOUS, J. D. A type VI secretion system of Pseudomonas aeruginosa targets a toxin to bacteria. *Cell host microbe*, v. 7, n. 1, p. 25–37, 2010.

HURLEY, D.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol*, v. 5, p. 481, 2014.

IYER, L. M.; BABU, M. M.; ARAVIND, L. The HIRAN Domain and Recruitment of Chromatin Remodeling and Activities to Damaged DNA. *Cell Cycle*, v. 5, n. 7, p. 775-782, 2006.

JANA, B.; FRIDMAN, C. M.; BOSIS, E.; SALOMON, D. A modular effector with a DNase domain and a marker for T6SS substrates. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 3595, 2019.

JURÉNAS, D.; FRAIKIN, N.; GOORMAGHTIGH, F.; VAN MELDEREN, L. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2022.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KINCH, L. N.; GINALSKI, K.; RYCHLEWSKI, L.; GRISHIN, N. V. Identification of novel restriction endonuclease-like fold families among hypothetical proteins. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. 11, p. 3598-605, 2005.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein Science*, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2022.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KOSKINIEMI, S.; LAMOUREUX, J. G.; NIKOLAKAKIS, K. C.; T'KINT DE ROODENBEKE, C.; KAPLAN, M. D.; LOW, D. A.; HAYES, C. H. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; v. 110, n. 17, p. 7032–7037, 2013.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, v. 30, n. 22, p. 3276-3278, 2014.

LAWLEY, T. D.; WALKER, A. W. Intestinal Colonization Resistance. *Immunology*, v. 138, n.1 p. 1-11, 2013.

LAZDUNSKI, C. J.; BOUVERET, E.; RIGAL, A.; JOURNET, L.; LLOUBÈS, R.; BÉNÉDETTI, H. Colicin import into Escherichia coli cells. *Journal of bacteriology*, v. 180, n.19, p. 4993-5002, 1998.

LE MINOR, L.; CHAMOISEAU, G.; BARBE, E.; CHARIE-MARSAINES, C. *et al.* [10 new Salmonella serotypes isolated in Chad]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, v. 116, n. 6, p. 775-780, 1969.

LIANG, X.; MOORE, R.; WILTON, M.; WONG, M. J. *et al.* Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 29, p. 9106-9111, 2015.

LIANG, X.; PEI, T.-T.; LI, H.; ZHENG, H.-Y.; LUO, H.; CUI, Y.; TANG, M.-X.; ZHAO, Y.-J., XU, P.; DONG, T. VgrG-dependent effectors and chaperones modulate the assembly of the type VI secretion system. *PLOS Pathogens*, v. 17, n. 12, e1010116, 2021.

LOBATO-MÁRQUEZ, D.; DÍAZ-OREJAS, R.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 40, n. 5, p. 592-609, 2016.

LÖBER, S.; JÄCKEL, D.; KAISER, N.; HENSEL, M. Regulation of Salmonella pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol*, v. 296, n. 7, p. 435-447, 2006.

LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 220-230, 2012.

MA, J.; PAN, Z.; HUANG, J.; SUN, M.; LU, C.; YAO, H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence*, v. 8, n. 7, p. 1189-1202, 2017.

MA, J.; SUN, M.; PAN, Z.; LU, C.; YAO, H. Diverse toxic effectors are harbored by vgrG islands for interbacterial antagonism in type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1862, n. 7, p. 1635-1643, 2018.

MA, L.-S.; HACHANI, A.; LIN, J.-S.; FILLOUX, A.; LAI, E.-M. Agrobacterium tumefaciens deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell host microbe*, v. 16, n. 1, p. 94-104, 2014.

MACNAB, R. M. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1694, n. 1, p. 207-217, 2004.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B. B. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection*, v. 2, n. 2, p. 145-156, 2000.

MASUDA, H.; TAN, Q.; AWANO, N.; WU, K.-P. *et al.* YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, v. 84, n. 5, p. 979-989, 2012.

MILLS, E.; BARUCH, K.; CHARPENTIER, X.; KOBI, S. *et al.* Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli. *Cell Host Microbe*, v. 3, n. 2, p. 104-113, 2008.

MIRDITA, M.; SCHÜTZE, K.; MORIWAKI, Y.; HEO, L. *et al.* ColabFold-Making protein folding accessible to all. 2021.

MONJARÁS FERIA, J.; VALVANO, M. A. An Overview of Anti-Eukaryotic T6SS Effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020-October-19 2020.

NASKAR, S.; HOHL, M.; TASSINARI, M.; LOW, H. H. The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Molecular Microbiology*, v. 115, n. 3, p. 412-424, 2021.

NAVARRÉ, W. W.; MCCLELLAND, M.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev*, v. 21, n. 12, p. 1456-1471, 2007.

OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 80, n. 15, p. 4784-4788, 1983.

PETERSON, S. B.; BERTOLLI, S. K.; MOUGOUS, J. D. The Central Role of Interbacterial Antagonism in Bacterial Life, *Current Biology*, v. 30, n. 19, p. 1203-1214, 2020.

PETTY, N. K.; BULGIN, R.; CREPIN, V. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M. *et al.* The Citrobacter rodentium Genome Sequence Reveals Convergent Evolution with Human Pathogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 2, p. 525-538, 2010.

PIGGOTT, D. A.; ERLRANDSON, K. M. YARASHESKI K. E. Frailty in HIV: Epidemiology, Biology, Measurement, Interventions, and Research Needs. *Curr HIV/AIDS Rep*, v. 13, p. 340-348, 2016

PISSARIDOU, P.; ALLSOPP, L.; WETTSTADT, S.; HOWARD, S.; MAVRIDOU, D.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitor. *PNAS*. v. 115, n. 49, p. 12519-12524, 2018.

POPOFF M. Y.; LE MINOR L. E. Genus XXXIII. Salmonella. In: GARRITY, G. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. Springer Science & Business Media, 2007. p. 799.

PROFT, T. **Microbial toxins : current research and future trends**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; STURTEVANT, D.; KRASTINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; MEKALANOS, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 5, p. 1528-1533, 2006.

PUKATZKI, S.; MA, A. T.; REVEL, A. T.; STURTEVANT, D.; MEKALANOS, J. J. 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 of the United States of America*, v. 104, n. 39, p. 15508–15513, 2007.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*, v. 56, p. 117-137, 2002.

RUSSELL, A. B.; SINGH, P.; BRITTNACHER, M.; BUI, N. K.; HOOD, R. D.; CARL, M. A.; AGNELLO, D. M.; SCHWARZ, S.; GOODLETT, D. R.; VOLLMER, W.; MOUGOUS, J. D. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. *Cell host microbe*, v. 11, n. 5, p. 538–549, 2012.

RUSSELL, A. B.; LEROUX, M.; HATHAZI, K. *et al.* Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, v. 496, p. 508–512, 2013.

RUSSELL, A. B.; PETERSON, S. B.; MOUGOUS, J. D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature reviews. Microbiology*, v. 12, n. 2, p. 137–148, 2014.

SERAPIO-PALACIOS, A.; WOODWARD, S. E.; VOGT, S. L.; DENG, W. *et al.* Type VI secretion systems of pathogenic and commensal bacteria mediate niche occupancy in the gut. *Cell Reports*, v. 39, n. 4, p. 110731, 2022.

SGRO, G. G.; OKA, G. U.; SOUZA, D. P.; CENENS, W.; BAYER-SANTOS, E.; MATSUYAMA, B. Y.; BUENO, N. F.; DOS SANTOS, T. R.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; SALINAS, R. K.; FARAH, C. S. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 1078, 2019.

SHNEIDER, M. M.; BUTH, S. A.; HO, B. T.; BASLER, M.; MEKALANOS, J. J.; LEIMAN, P. G. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, v. 500, p. 350-353, 2013.

SIBINELLI-SOUSA, S.; HESPANHOL, J. T.; NICASTRO, G. G.; MATSUYAMA, B. Y.; MESNAGE, S.; PATEL, A.; DE SOUZA, R. F.; GUZZO, C. R.; BAYER-SANTOS, E. A Family of T6SS Antibacterial Effectors Related to I,d-Transpeptidases Targets the Peptidoglycan. *Cell reports*, v. 31, n. 12, 107813, 2020.

SIBINELLI-SOUSA, S.; HESPANHOL, J. T.; BAYER-SANTOS, E.; MARGOLIN, W. Targeting the Achilles' Heel of Bacteria: Different Mechanisms To Break Down the Peptidoglycan Cell Wall during Bacterial Warfare. *Journal of Bacteriology*, v. 203, n. 7, p. e00478-00420, 2021.

SINGH, G.; YADAV, M.; GHOSH, C.; RATHORE, J. S. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 2, p. 100047, 2021.

SOMMER, F.; ANDERSON, J.; BHARTI, R.; RAES J.; ROSENSTIEL P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. v. 15, p. 630-638, 2017.

SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BISSON-FILHO, A. W.; DUNGER, G.; HOBEIKA, L.; CAVALCANTE, N. S.; ALEGRIA, M. C.; BARBOSA, L. R. S.; SALINAS, R. K.; GUZZO, C. R.; FARAH, C. S. Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature Communications*, v. 6, n. 6453, 2015.

SU, L. H.; CHIU, C. H. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, v. 30, n. 3, 210–219, 2007.

- STECZKIEWICZ, K.; MUSZEWSKA, A.; KNIZEWSKI, L.; RYCHLEWSKI, L.; GINALSKI, K. Sequence, structure and functional diversity of PD-(D/E)XK phosphodiesterase superfamily. *Nucleic Acids Res*, v. 40, n. 15, p. 7016-7045, 2012.
- 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*, v. 293, n. 5, p. 1504–1514, 2018.
- TING, S.-Y.; BOSCH, D. E.; MANGIAMELI, S. M.; RADEY, M. C.; HUANG, S.; PARK, Y.-J.; KELLY, K. A.; FILIP, S. K.; GOO, Y. A.; ENG, J. K.; ALLAIRE, M.; VEESLER, D.; WIGGINS, P. A.; PETERSON, S. B.; MOUGOUS, J. D. Bifunctional Immunity Proteins Protect Bacteria against FtsZ-Targeting ADP-Ribosylating Toxins. *Cell*, v. 175, n. 5, 1380–1392.e14, 2018.
- UNTERWEGER, D.; KOSTIUK, B.; PUKATZKI, S. Adaptor Proteins of Type VI Secretion System Effectors. *Trends in Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 8-10, 2017.
- UZZAU, S.; FIGUEROA-BOSSI, N.; RUBINO, S.; BOSSI, L. Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n.26, p. 15264-15269, 2001.
- VALDIVIA, R. H.; FALKOW, S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of Salmonella typhimurium acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, v. 22, n. 2, p. 367-378, 1996.
- WANG, J.; YANG, B.; LEIER, A.; MARQUEZ-LAGO, T. T.; HAYASHIDA, M.; ROCKER, A.; ZHANG, Y.; AKUTSU, T.; CHOU, K.-C.; STRUGNELL, R. A.; SONG, J.; LITHGOW, T. Bastion6: a bioinformatics approach for accurate prediction of type VI secreted effectors. *Bioinformatics*, v. 34, n. 15, p. 2546-2555, 2018.
- WANG, S.; GENG, Z.; ZHANG, H.; SHE, Z.; DONG, Y. The Pseudomonas aeruginosa PAAR2 cluster encodes a putative VRR-NUC domain-containing effector. *The FEBS journal*, v. 288, n. 19, p. 5755–5767, 2021.
- WANG, R. F.; KUSHNER, S. R. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli. *Gene*, v. 100, p. 195-199, 1991.
- WANG, X.; LORD, D. M.; CHENG, H.-Y.; OSBOURNE, D. O. *et al.* A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology*, v. 8, n. 10, p. 855-861, 2012/10/01 2012.
- WANG, X.; YAO, J.; SUN, Y.-C.; WOOD, T. K. Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins. *Trends in Microbiology*, v. 29, n. 5, p. 388-393, 2021.
- WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M.; CLAMP, M. *et al.* Jalview Version 2- a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.
- WHITNEY, J. C.; QUENTIN D.; SAWAI, S.; LEROUX, M.; HARDING, B. N.; LEDVINA, H. L.; TRAN, B. Q.; ROBINSON, H.; GOO Y. A.; GOODLETT, D. R.; RAUNSER, S.; MOUGOUS, J. D. An interbacterial NAD(P)(+) glycohydrolase toxin requires elongation factor Tu for delivery to target cells. *Cell*, v. 163 p. 607-619, 2015.
- WOOD, T. E.; HOWARD, S. A.; WETTSTADT, S.; FILLOUX, A. PAAR proteins act as the 'sorting hat' of the type VI secretion system. *Microbiology (Reading)*, v. 165, n. 11, p. 1203-1218, Nov 2019.
- ZHENG, J.; HO, B.; MEKALANOS, J. J. Genetic Analysis of Anti-Amoebae and Anti-Bacterial Activities of the Type VI Secretion System in Vibrio cholerae. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, p. e23876, 2011

## 9. Anexos



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1067/2019** referente ao projeto intitulado: **"Estudo da função de SPI-22 T6SS de *Salmonella bongori* em competições bacterianas e interações com células fagocíticas"** sob a responsabilidade de **Daniel Enrique Sánchez Limache** e orientação do(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, 18 de novembro de 2019.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Declaro, para os devidos fins, que

**Daniel Enrique Sánchez Limache**

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 1 de junho de 2021  
(Declaração válida por 5 anos)



**Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva**  
Presidente da Comissão de Segurança Química



**Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira**  
Diretor do ICB



## **Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório**

### **Declaração de conclusão de curso**

Declaramos para os devidos fins que

#### **Daniel Enrique Sánchez Limache**

participou do curso de “Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório” em formato de ensino a distância, coordenado pela Central de Bioterismo do Instituto de Ciências Biomédicas em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e realizado pela REBIOTERIO - CNPq.

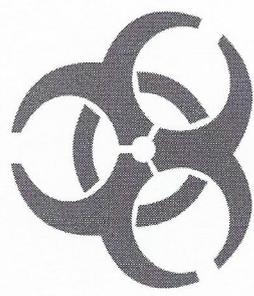
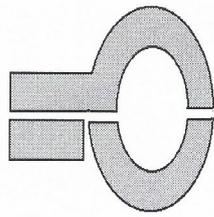
São Paulo, 25 setembro 2019

Central de Bioterismo  
ICB USP



Instituto de Ciências Biomédicas | USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária “Armando Salles Oliveira” • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900



# Certificado

Certificamos que **Daniel Enrique Sánchez Limache** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 04 de dezembro de 2019, com carga horária total de 6 horas.

*Gabriel Padilla*

**Prof. Dr. Gabriel Padilla**  
Responsável pelo Treinamento

*Veridiana Munford*

**Veridiana Munford**  
Técnica Responsável pelo Treinamento