

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA)

STEPHANIE SIBINELLI DE SOUSA

**Identificação e caracterização de novos efetores secretados
pelo sistema de secreção do tipo VI em *Salmonella* spp.**

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUATE PROGRAM IN BIOLOGICAL SCIENCES (MICROBIOLOGY)

STEPHANIE SIBINELLI DE SOUSA

**Identification and characterization of novel effectors secreted
by the type VI secretion system in *Salmonella* spp.**

SÃO PAULO

2023

RESUMO

SIBINELLI-SOUSA, S. **Identificação e caracterização de novos efetores secretados pelo sistema de secreção do tipo VI em *Salmonella* spp.** 2023. 157 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2023.

Bactérias vivem em comunidades polimicrobianas complexas, e utilizam diversas estratégias para competir por recursos. Bactérias Gram-negativas codificam um sistema de secreção de proteínas do tipo VI (T6SS) capaz de secretar efetores dentro de células-alvo, tanto eucarióticas como procarióticas. *Salmonella* spp. codificam cinco T6SSs filogeneticamente distintos em diferentes ilhas de patogenicidade (*Salmonella Pathogenicity Island*): SPI-6, SPI-19, SPI-20, SPI-21 e SPI-22. Trabalhos anteriores demonstraram a importância do SPI-6 T6SS de *S. Typhimurium* e do SPI-19 T6SS de *S. Gallinarum* para a competição bacteriana e infecção de macrófagos, respectivamente. No entanto, poucos efetores secretados pelos T6SSs de *Salmonella* foram descritos. Neste contexto, o projeto teve como objetivo identificar e caracterizar novos efetores do T6SS de *Salmonella* utilizando abordagens computacionais e experimentais. Primeiramente, foi identificada e caracterizada uma nova família de efetores antibacterianos que atuam sobre a parede celular de bactérias competidoras via um novo mecanismo de ação: L,D-carboxipeptidase e L,D-transpeptidase de troca de D aminoácidos. Em seguida, utilizando uma abordagem mais abrangente, foram realizados ensaios de co-immunoprecipitação com componentes estruturais do T6SS (*hemolysin-coregulated proteins*, Hcps) e seus parceiros de interação foram identificados por espectrometria de massas. Além disso, foram examinados 10 mil genomas de *Salmonella* em busca de novos efetores do T6SS empregando estratégias *in silico*. Como resultado, uma grande variedade de possíveis efetores foram identificados, revelando uma ampla diversidade de efetores do T6SS presentes em *Salmonella*, alguns deles contendo domínios proteicos com função desconhecida. Como forma de validar nossas análises, foi escolhido um possível efector (STox15) para a caracterização bioquímica e funcional. Resultados mostraram que STox15 e SImm15 constituem um novo par efector antibacteriano e proteína de imunidade do T6SS. De maneira geral, este projeto contribuiu para ampliar o conhecimento sobre os efetores do T6SS de *Salmonella* e sua importância em competições bacterianas e infecções de hospedeiros vertebrados.

Palavras-chave: *Salmonella*; competição bacteriana; sistema de secreção do tipo VI; efetores; toxinas; hemolysin coregulated protein; L,D-transpeptidase; fosfolipase.

ABSTRACT

SIBINELLI-SOUSA, S. **Identification and characterization of novel effectors secreted by the type VI secretion system in *Salmonella* spp.** 2023. 157 f. Thesis (Doctoral) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2023.

Bacteria live in complex polymicrobial communities and employ diverse strategies to compete for resources. Gram-negative bacteria encode a type VI protein secretion system (T6SS) capable of delivering effectors into both eukaryotic and prokaryotic target cells. *Salmonella* spp. encode five phylogenetically distinct T6SSs in different pathogenicity islands (*Salmonella* Pathogenicity Island): SPI-6, SPI-19, SPI-20, SPI-21, and SPI-22. Previous studies highlighted the importance of SPI-6 T6SS of *S. Typhimurium* and SPI-19 T6SS of *S. Gallinarum* in bacterial competition and vertebrate host infections, respectively. However, few effectors secreted by *Salmonella* T6SSs have been described. In this context, the project aimed to identify and characterize new effectors of *Salmonella* T6SS using computational and experimental approaches. Initially, we identified and characterized a new family of antibacterial effectors that target the cell wall of competing bacteria via a novel mechanism of action: L, D-carboxipeptidase and L,D-transpeptidase D-amino acid exchange activity. Subsequently, employing a more comprehensive approach, co-immunoprecipitation assays with the structural components of T6SS (hemolysin coregulated proteins, Hcps) were conducted, and their interaction partners were identified via mass spectrometry. In addition, 10,000 *Salmonella* genomes were examined to identify new T6SS effectors using *in silico* strategies. As a result, several possible effectors were identified, revealing a wide diversity, which contained previously unknown protein domains. A potential effector (STox15) was chosen for biochemical and functional characterization to validate our analyses. The results showed that STox15 and SImm15 constitute a new T6SS antibacterial effector and immunity protein pair. Overall, this project expanded our knowledge of *Salmonella* T6SS effectors and their significance in bacterial competition and vertebrate host infections.

Keywords: *Salmonella*; bacterial competition; Type VI secretion system; effectors; toxins; hemolysin coregulated protein; L,D-transpeptidase; phospholipase.