

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

JULIA TAKUNO HESPANHOL

**Toxinas antibacterianas do sistema de secreção do tipo VI de
Salmonella que atuam sobre ácidos nucleicos**

São Paulo

2023

JULIA TAKUNO HESPANHOL

**Toxinas antibacterianas do sistema de secreção do tipo VI de
Salmonella que atuam sobre ácidos nucleicos**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Ethel Bayer Santos

Versão Original

São Paulo

2023

RESUMO

HESPANHOL, J.T; **Toxinas antibacterianas do sistema de secreção do tipo VI de *Salmonella* que atuam sobre ácidos nucleicos.** Dissertação (Mestre em Microbiologia) – Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, 2023.

Bactérias estabelecem relações antagonicas que induzem a morte de células competidoras para utilizar recursos do meio. Um desses mecanismos de antagonismo é mediado pelo sistema de secreção do tipo VI (T6SS), um aparato contrátil que secreta toxinas dentro das células alvo após o contato entre as bactérias. As bactérias produtoras de efetores tóxicos codificam proteínas de imunidade específicas para cada efector a fim de impedir a autointoxicação e intoxicação de células-irmãs. *Salmonella* spp. são bactérias associadas a infecções intestinais que codificam diferentes T6SSs em distintas ilhas de patogenicidade (SPI-6, SPI-19, SPI-20, SPI-21, SPI-22). Esses T6SSs são utilizados para competir com a microbiota e estabelecer uma infecção no hospedeiro. O objetivo deste trabalho era caracterizar duas novas famílias de efetores antibacterianos secretados pelo T6SS de *Salmonella* spp. que atuam sobre os ácidos nucleicos das células alvo. A caracterização do primeiro grupo de toxinas foi iniciada com a análise do genoma de *Salmonella bongori*. Utilizando ferramentas bioinformáticas, foi possível identificar um grupo de efetores secretado pelo SPI-22 T6SS que foram denominados TseVs (*type VI secreted effector VRR-Nuc*), em conjunto com suas respectivas proteínas de imunidade cognatas (TsiVs). Ensaio de toxicidade em *Escherichia coli* revelaram que TseV2/TsiV2.1 e TseV3/TsiV3 são pares efector e proteína de imunidade. A expressão de TseV2 e TseV3 em *E. coli* ativa a resposta SOS e induz a formação de quebras na dupla fita do DNA. Ensaio com proteína recombinante purificada revelaram que TseV3 é uma DNase estrutura-específica, clivando substratos que se assemelham a intermediários da forquilha de replicação ou da bolha de transcrição. A caracterização do segundo grupo de toxinas foi feita a partir da análise de centenas de genomas de *Salmonella*. Em *Salmonella enterica* sorotipo Oslo foi identificado um efector secretado pelo SPI-6 T6SS denominado provisoriamente de STox4. Essa proteína não apresenta similaridade com domínios descritos no Pfam. Análises bioinformáticas revelaram que STox4 tem similaridade remota com nucleases da superfamília HNH (*His-Metal finger*); no entanto, não foi detectada ativação da resposta SOS em células de *E. coli* expressando STox4. Curiosamente foram observadas alterações no padrão de bandas de RNAs, incluindo o aparecimento de uma banda com menor tamanho, o que sugere que essa toxina tem atividade de RNase ou de uma proteína modificadora de RNAs. STox4 parece constituir o primeiro membro de uma nova família de proteínas não caracterizada que atua sobre RNAs. A caracterização de efetores secretados pelo T6SS expande o repertório de armas biológicas utilizadas por patógenos durante infecções, e também revela novos domínios proteicos com funções não descritas. Estudos futuros serão capazes de identificar a atividade bioquímica de STox4, além de identificar seu alvo celular, determinando o mecanismo de intoxicação e possivelmente revelando novos alvos a serem explorados no desenvolvimento de antimicrobianos.

Palavras-chave: *Salmonella*. T6SS. Competição bacteriana. Efetores. Nucleases.

ABSTRACT

Bacteria establish antagonistic relationships to compete for resources in the environment. One of these mechanisms is mediated by the type VI secretion system (T6SS), a contractile apparatus that secretes toxins into target cells after contact between cells. Bacteria that produce toxic effectors also encode cognate immunity proteins to prevent autointoxication and intoxication of sister cells. *Salmonella* spp. are associated with intestinal infections and encode different T6SSs in distinct pathogenicity islands (SPI-6, SPI-19, SPI-20, SPI-21, SPI-22). These T6SSs are used to compete with the members of the microbiota and establish an infection in the host. The objective of this project was to characterize two new families of antibacterial effectors that target nucleic acids and are secreted by the T6SSs of *Salmonella* spp. The characterization of the first group of effectors began with the analysis of the *Salmonella bongori* genome. Using bioinformatics, it was identified a group of effectors secreted by the SPI-22 T6SS called TseVs (type VI secreted effector VRR-Nuc), together with their cognate immunity proteins (TsiVs). Toxicity assays in *Escherichia coli* revealed that TseV2/TsiV2.1 and TseV3/TsiV3 are effector and immunity protein pairs. Expression of TseV2 and TseV3 in *E. coli* activated the SOS response and induced the formation of DNA double-strand breaks. Assays with purified recombinant protein revealed that TseV3 is a structure-specific DNase, cleaving substrates that resemble replication fork intermediates or the transcription bubble. The characterization of the second family of effectors started with the analysis of thousands of *Salmonella* genomes. In *Salmonella enterica* serotype Oslo, a toxin secreted by the SPI-6 T6SS named STox4 was identified. This protein does not show similarity to domains described in Pfam. Bioinformatics analyzes revealed that STox4 has low similarity with the nuclease superfamily HNH (His-Metal finger). However, no activation of the SOS response in *E. coli* cells expressing STox4 was observed. Interestingly, changes in the pattern of RNA bands were observed, including the appearance of a smaller band, which suggests that this toxin has RNase activity or is an RNA-modifying protein. STox4 appears to constitute the first member of a new, uncharacterized family of proteins that acts on RNAs. The characterization of effectors secreted by the T6SS expands the repertoire of biological weapons used by pathogens during infections, and reveals new protein domains with undescribed functions. Future studies will be able to identify the biochemical activity of STox4, in addition to identifying its cellular target to determine the mechanism of intoxication and possibly reveal new targets to the development of antimicrobials.

Keywords: *Salmonella*. T6SS. Bacterial competition. Effectors. Nucleases.