

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**TALYTA SOARES DO NASCIMENTO**

**Caracterização do Sistema de Secreção do Tipo VI de *Klebsiella pneumoniae*: a função da proteína VgrG**

**Rio de Janeiro**

2020

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**TALYTA SOARES DO NASCIMENTO**

**Caracterização do Sistema de Secreção do Tipo VI de *Klebsiella pneumoniae*: a função da proteína VgrG**

Dissertação apresentada no Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Miranda Lery Santos.

**Rio de Janeiro**

2020

Soares do Nascimento, Talyta .

Caracterização do Sistema de Secreção do Tipo VI de *Klebsiella pneumoniae*: a função da proteína VgrG / Talyta Soares do Nascimento. - Rio de Janeiro, 2020.

103 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Leticia Miranda Lery Santos.

Bibliografia: f. 66-103

1. Sistema de Secreção . 2. VgrG. 3. Interação patógeno-hospedeiro. 4. Virulência. I. Título.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**TALYTA SOARES DO NASCIMENTO**

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI DE *Klebsiella pneumoniae*: A FUNÇÃO DA PROTEÍNA VgrG**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Miranda Lery Santos.

**Aprovada em:** 09/04/2020

**EXAMINADORES:**

Dr. Luis Caetano Martha Antunes (ENSP - Fiocruz) - **Revisor**

Dr<sup>a</sup>. Ana Paula D’Allincourt Carvalho Asséf (IOC – Fiocruz) - **Presidente**

Dr<sup>a</sup>. Alessandra Mattos Saliba (Faculdade de Ciências Médicas - UERJ) - **Membro**

Dr<sup>a</sup>. Cristina Elisa Alvarez Martinez (Instituto de Biologia - Unicamp) - **Membro**

Dr<sup>a</sup>. Viviane Zahner (IOC – Fiocruz) - **Suplente**

Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (IBCCF - UFRJ) - **Suplente**

Rio de Janeiro, 09 de abril de 2020

Dedico esse trabalho a minha mãe e meu irmão por todo amor, apoio e alegria de todos os dias que me fazem seguir em frente. Amo vocês!

## Agradecimentos

Agradeço a Deus, àquele que é poderoso para fazer muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos – Efésios 3.20.

Agradeço a minha mãe que abriu mão dos seus sonhos para que a gente vivesse os nossos.

Ao meu irmão que sempre esteve ao meu lado, seja implicando comigo, seja me incentivando para viver o melhor da vida.

A todos os professores que tive na vida, graças ao trabalho de todos vocês cheguei até aqui. Em especial ao Vitor Quintan por me ensinar que: “Todos juntos somos fortes, somos flecha e somos arco, todos nós no mesmo barco, não há nada a temer, ao meu lado há um amigo que é preciso proteger” – Chico Buarque.

Ao Rodrigo Salles de Carvalho, meu primeiro orientador, que me motivou e incentivou a não desistir da Biologia.

A Letícia Lery por ter me recebido em 2015 e desde então me orientar de forma com que eu evolua e saia da minha zona de conforto, sempre com paciência e compreensão dos meus limites. Muito obrigada por tudo! De coração!

Aos orientadores que tive no Instituto Pasteur – Paris, Julia Chamot-Rooke, Martial Rey e Régis Tournebize pela paciência e carinho com que me receberam em seus laboratórios.

Ao Team Kp: Victor, Mayara, Luísa e Esther por dividir a missão de entender a *Klebsiella*.

Aos colaboradores do nosso grupo de pesquisa que nos ajudaram / ajudam a compreender o T6SS e a *K. pneumoniae*: Gisele Cardoso Amorim, Verônica Valadares, Teca Galvão, Heidi Pauer, Caetano Antunes.

Aos amigos que fiz nesses quase 5 anos de Lamicel. Pelas discussões durante o almoço e durante os nossos clubes de quinta, minha gratidão.

A Melissa, a Raquel e ao André pelas caronas e companhias até Niterói.

A Débora por aliviar nossos estresses diários com seus bolos maravilhosos.

A Luísa, ao Marcos e ao Plínio, ‘*talk, talk* tudo bom?’ Vocês são doidos demais! Obrigado por me deixarem ser doida com vocês. Obrigado pelas conversas científicas, não científicas, as lógicas e as não lógicas, aquelas sendo fato venéreo ou não. Obrigada por nosso religioso lanchinho da tarde. Obrigado pelos vídeos, piadas e memes idiotas que só a gente acha graça. Obrigado pelos abraços, pelos risos e por me motivarem todo o dia. Amo vocês! *We will never walk alone!*

A Fernanda Hermes por tornar as disciplinas e cursos mais divertidos, por me dar sorte nas apresentações de pôster, por vender / comprar minhas rifas, e principalmente por me salvar conseguindo balanças e reagentes de última hora.

Aos amigos que fiz durante minha estadia em Paris: Diogo, Luci, Aline, Isa, Lucas, Arthur, Luciana, Jota, Fabiana e Isabela. Vocês me fizeram mais feliz!

A Anna Luiza, a irmã que a vida me presenteou acompanhada do André e do Tutu, o bebê mais lindo do mundo.

Aos coordenadores, aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e aos discentes que atravessaram meu caminho durante os dois anos de mestrado.

Ao revisor e a banca avaliadora pela disponibilidade e disposição em contribuir na discussão dos resultados presentes nessa dissertação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, a Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

*When you walk through a storm  
Hold your head up high  
And don't be afraid of the dark*

*At the end of a storm  
There's a golden sky  
And the sweet silver song of a lark*

*Walk on through the wind  
Walk on through the rain  
Though your dreams be tossed and blown*

*Walk on, walk on  
With hope in your heart  
And you'll never walk alone*

*You'll never walk alone*

Oscar Hammerstein e Richard Rodgers.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
RESUMO .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	1
1.1.1. Características gerais e epidemiologia .....	1
1.1.2. Resistência a antimicrobianos .....	3
1.1.3. Mecanismos de virulência .....	5
1.2. Sistemas de Secreção .....	7
1.2.1. Aspectos gerais .....	7
1.2.2. O Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) .....	10
1.2.3. T6SS na competição bacteriana .....	13
1.2.4. T6SS na interação com células eucarióticas .....	14
1.2.5. T6SS em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	16
1.2.6. VgrGs em <i>K. pneumoniae</i> Kp 52.145.....	18
1.3. XL-MS.....	23
1.4. Justificativa.....	26
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
3. METODOLOGIA .....	28
3.1. Cultivo de THP-1 e obtenção de extratos proteicos.....	29
3.2. Análise da interação da VgrG4-CTD com proteínas do citoesqueleto.....	29
3.3. Interação proteína-proteína por cromatografia de afinidade a Ni <sup>2+</sup> .....	30
3.4. Reação de interação com reagente de <i>crosslinker</i> DSS.....	30

3.5. Cultivo Celular.....	31
3.6. Crescimento bacteriano.....	31
3.7. Estímulo com o reagente de entrega de proteína PULSin .....	32
3.8. Conjugação da proteína VgrG4-CTD a um <i>crosslinker</i> e a um fluoróforo .....	32
3.9. Análise da entrega do complexo VgrG4-CTD+D1P3+6-FAM através do PULSin em células A549 por microscopia de fluorescência.....	33
3.10. Análise da citotoxicidade do reagente PULSin nas células por ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-Difeniltetrazolio Brometo).....	33
3.11. Análise de alteração da morfologia celular após estímulo com PULSin + VgrG4-CTD seguido de infecção com <i>K. pneumoniae</i> por imunofluorescência.....	33
3.12. Análise da taxa de internalização bacteriana após tratamento com Citocalasina D por citometria de fluxo.....	34
3.13. Análise do papel da proteína VgrG4-CTD na internalização bacteriana por citometria de fluxo.....	34
3.14. Análise da taxa de internalização bacteriana após estímulo com PULSin + VgrG4-CTD e tratamento com Citocalasina D por citometria de fluxo.....	35
3.15. Análise do efeito da Citocalasina D em células ST 8814.....	36
3.16. Obtenção dos lisados proteicos de <i>K. pneumoniae</i> Kp52.145.....	36
3.17. <i>Beads</i> e revestimento com a proteína VgrG4-CTD.....	37
3.18. Experimento de co-precipitação.....	37
3.19. Análise proteômica.....	37
3.20. Espectrometria de Massas.....	38
3.21. Identificação de proteínas do extrato de <i>K. pneumoniae</i> que interagem com a VgrG4-CTD.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1. Interação entre VgrG4-CTD e proteínas do citoesqueleto.....	40
4.1.1. VgrG4-CTD é capaz de se ligar à actina, vimentina e citoqueratina.....	40
4.1.2. VgrG4-CTD é capaz de interagir diretamente com actina.....	42
4.2. Interação entre VgrG4-CTD e actina é importante para a interação patógeno-hospedeiro.....	46
4.2.1. Entrega da VgrG4-CTD no citoplasma de células eucarióticas.....	46
4.2.2. VgrG4-CTD é entregue no citoplasma de células alvo pelo PULSin.....	47

4.2.3. Estímulo com VgrG4-CTD não é citotóxico em macrófagos.....	50
4.2.4. VgrG4-CTD induz alterações na organização dos filamentos de actina de macrófagos, mas essa interação parece não mediar a internalização bacteriana em células fagocíticas....	51
4.2.5. VgrG4-CTD é importante para internalização bacteriana em células não fagocíticas	58
4.3. VgrG4-CTD pode carrear outras proteínas para translocação pelo T6SS.....	60
4.3.1. Identificação de ligantes da VgrG4-CTD em extratos proteicos da própria bactéria..	60
5. CONCLUSÕES .....	64
6. PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-FAM	6-Carboxifluoresceína
ACD	Domínio de <i>cross-linking</i> de actina (do inglês <i><u>A</u>ctin <u>C</u>rosslinking <u>D</u>omain</i> )
ACN	Acetonitrila
AcrAB	Família de proteínas de resistência à acriflavina (do inglês <i><u>A</u>criflavine <u>r</u>esistance <u>p</u>rotein <u>f</u>amily</i> )
AF	<u>Á</u> cido <u>F</u> órmico
Akt1 e Akt2	Treonina-proteína quinase 1 e 2
ANVISA	<u>A</u> gência <u>N</u> acional de <u>V</u> igilância <u>S</u> anitária
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin</i> )
Cdc42	Homólogo da proteína 42 de controle da divisão celular (do inglês <i><u>C</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ontrol <u>p</u>rotein <u>4</u>2 <u>h</u>omolog</i> )
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihydroethidium
DMSO	<u>D</u> imetilsulf <u>ó</u> xido
DNA	<u>Á</u> cido Desoxirribonucleico
DO	<u>D</u> ensidade <u>Ó</u> ptica
DSS	Suberato de Disuccinimidil (do inglês <i><u>D</u>isuccinimidyl <u>S</u>uberate</i> )
DTT	<u>D</u> i- <u>t</u> io- <u>t</u> reitol
DUF	Domínio de função desconhecida (do inglês <i><u>D</u>omain of <u>U</u>nknown <u>F</u>unction</i> )
GLASS	Sistema Global de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (do inglês <i><u>G</u>lobal <u>A</u>ntimicrobial <u>S</u>urveillance <u>S</u>ystem</i> )
GTP	Trifosfato de Guanosina
Hcp	Proteína co-regulada por hemolisina (do inglês <i><u>H</u>emolysin-<u>c</u>oregulated <u>p</u>rotein</i> )
IAA	<u>I</u> odo <u>a</u> ceto <u>a</u> mida
IcmF	Proteína de multiplicação intracelular F (do inglês <i><u>i</u>ntra<u>c</u>ellular <u>m</u>ultiplication <u>p</u>rotein <u>F</u></i> )
IRAS	<u>I</u> nfecções <u>R</u> elacionadas à <u>A</u> ssistência à <u>S</u> aúde

LapA	Proteína adesiva grande (do inglês <i>Large adhesive protein</i> )
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LPS	<u>L</u> ipopolissacarídeos
Mbp	Pares de Bases
MFI	<u>M</u> édia da <u>I</u> ntensidade da <u>F</u> luorescência
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês <i>Multiplicity of infection</i> )
NADPH	<u>N</u> icotinamida <u>A</u> denina <u>D</u> inucleótido Fosfato
OMP	Proteína de Membrana Externa (do inglês <i>Outer membrane protein</i> )
OmpA	Proteína de Membrana Externa OmpA (do inglês <i>Outer membrane protein A</i> )
OMS	<u>O</u> rganização <u>M</u> undial da <u>S</u> aúde
PAAR	Proteína que contém o domínio Pro-Ala-Ala-Arg (do inglês <i>Pro-Ala-Ala-Arg repeat containing protein</i> )
PBS	Tampão Fosfato Salino
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfato 3-cinase
PI3K-AKT	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
PLD 1	Proteína da família fosfolipase D (do inglês <i>phospholipase D family protein</i> )
Rac1	Substrato de toxina botulínica C3 relacionado com Ras 1 (do inglês <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> )
RhoA	Membro da família A homólogo de Ras (do inglês <i>Ras homolog family member A</i> )
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
R-PE	Do inglês <i>R-Phycoerythrin</i>
RPM	<u>R</u> otações por <u>m</u> inuto
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tge1-3	Família de Efetores Peptidoglicano Glicosídeo Hidrolase
THPTA	Tris(benziltriazolimetil)amina
Tle	Efedor com Atividade lipase/fosfolipase (do inglês <i>Type VI Lipase Effector</i> )

TLR4	Receptores do Tipo Toll 4
TMB	3,3',5,5'- <i>Tetramethylbenzidine</i>
Tse1-3	<i>Type six exported 1-3</i>
TssA-M	<i>Type six subunits A - M</i>
UEMP	Unidade de <u>E</u> spectrometria de <u>M</u> assas e <u>P</u> roteômica
UTI	Unidade de <u>T</u> ratamento <u>I</u> ntensivo
VgrG	<i>Valine Glycine repeat protein G</i>
VipA	<i>ClpV-interacting protein A</i>
VipB	<i>ClpV-interacting protein B</i>
XL-MS	<i>Crosslinking</i> acoplado à espectrometria de massas (do inglês <i>Cross-Linking Mass Spectrometry</i> )
YezP	Proteína extracelular de ligação ao zinco de <i>Yersinia</i> (do inglês <i>Yersinia extracellular zinc-binding protein</i> )

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Os principais <i>hits</i> identificados como possíveis parceiros de interação da VgrG4-CTD .....	63
------------------	--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo dos 9 tipos de sistemas de secreção.....	10
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo do T6SS.....	11
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática das sequências de aminoácidos das 3 VgrGs codificadas pelo genoma de <i>K. pneumoniae</i> Kp52.145 e a posição dos domínios funcionais propostos pelos <i>Conserved Domain Database</i> do NCBI.....	19
<b>Figura 4</b>	Alinhamento das sequências de aminoácidos das VgrGs 1, 2/3 e 4 presentes no genoma de <i>K. pneumoniae</i> Kp52.145.....	20
<b>Figura 5</b>	Proteína VgrG4-CTD recombinante .....	21
<b>Figura 6</b>	Caracterização das 246 proteínas identificadas a partir dos extratos proteicos de A546 (6A) e THP-1 (6B) de acordo com o <i>Gene Ontology</i> .....	22
<b>Figura 7</b>	Análise da interação da VgrG CTD com actina através de espectroscopia de fluorescência.....	23
<b>Figura 8</b>	Estrutura química do reagente de <i>crosslinker</i> DSS.....	24
<b>Figura 9</b>	Estrutura química do reagente de <i>crosslinker</i> NNP9.....	25
<b>Figura 10</b>	Esquema geral da lógica e abordagem metodológica utilizadas durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.....	28
<b>Figura 11</b>	Representação temporal do estímulo com a proteína VgrG4-CTD e infecção com Kp52.145.....	34
<b>Figura 12</b>	Representação temporal do estímulo com a proteína VgrG4-CTD, tratamento com citocalasina D e infecção com Kp52.145.....	36
<b>Figura 13</b>	VrgG4-CTD interage com proteínas do citoesqueleto.....	41
<b>Figura 14</b>	Co-purificação da VgrG4-CTD-Actina.....	43
<b>Figura 15</b>	Mapeamento das lisinas presentes nas sequências de aminoácidos das proteínas actina de galinha (número de acesso: P60711) e proteína recombinante VgrG4-CTD.....	44
<b>Figura 16</b>	Reação de <i>cross-linking</i> entre actina e VgrG4-CTD.....	45
<b>Figura 17</b>	Entrega intracelular da proteína <i>R-Phycoerythrin</i> (R-PE). .....	47
<b>Figura 18</b>	Estrutura química e grupamentos reativos presentes no agente de <i>crosslinker</i> D1P3.....	48

<b>Figura 19</b>	Complexo VgrG4-CTD-D1P3-6-FAM.....	49
<b>Figura 20</b>	Entrega do complexo VgrG4-CTD – D1P3 - 6-FAM no citoplasma de células A549 via reagente de entrega PULSin.....	50
<b>Figura 21</b>	Reagente PULSin e VgrG4-CTD não apresenta citotoxicidade a macrófagos.....	51
<b>Figura 22</b>	Entrega intracelular de VgrG4-CTD causa alteração nos filamentos de actina em macrófagos murinos RAW 264.7.....	53
<b>Figura 23</b>	Infecção com <i>K. pneumoniae</i> após entrega intracelular de VgrG4-CTD em macrófagos murinos RAW 264.7.....	54
<b>Figura 24</b>	Envolvimento do T6SS de <i>K. pneumoniae</i> e microfilamentos de macrófagos na fagocitose.....	56
<b>Figura 25</b>	Envolvimento da proteína VgrG4-CTD de <i>K. pneumoniae</i> na fagocitose.....	57
<b>Figura 26</b>	Envolvimento da VgrG4-CTD de <i>K. pneumoniae</i> 52.145 na internalização bacteriana.....	59

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI DE *Klebsiella pneumoniae*: A FUNÇÃO DA PROTEÍNA VgrG**

**RESUMO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Talyta Soares do Nascimento**

*Klebsiella pneumoniae* é um patógeno oportunista que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, podendo, porém, acometer pessoas saudáveis. É responsável por várias infecções agudas nos tratos urinário e respiratório, entre outros. Essa bactéria tem gerado preocupação nos sistemas de saúde pública ao redor do mundo pois cepas apresentando altos níveis de virulência e resistência a antimicrobianos tem sido frequentemente isolada. Recentemente, foi demonstrado que o Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) é um fator de virulência desta espécie. O T6SS é um complexo macromolecular montado através das membranas bacterianas e que atua como uma seringa que injeta proteínas efetoras no interior de outras células. Esses efetores conferem uma vantagem competitiva ou podem manipular o metabolismo da célula hospedeira para favorecer a infecção. Um dos componentes essenciais do T6SS é a proteína Valine-Glycine Repeat G (VgrG). A VgrG é montada no topo da seringa e pode apresentar uma extensão C-terminal variável, com função efetora. Até o momento, não há estudos sobre a função das proteínas VgrG codificadas no genoma de *K. pneumoniae*. Com o intuito de levantar hipóteses sobre a função do C-terminal da VgrG4 (VgrG4-CTD) de *K. pneumoniae*, em um trabalho anterior nosso grupo expressou a proteína recombinante e identificou seus ligantes em macrófagos e células do epitélio pulmonar. No total, 254 proteínas foram identificadas nos extratos de células eucarióticas. A categorização dessas proteínas revelou que a maioria dos possíveis ligantes são componentes do citoesqueleto, chaperonas ou participam da via endocítica. Neste trabalho, a interação da VgrG4-CTD com vimentina e citoqueratina foi confirmada por imunomarcção; contudo, a interação com tubulina não foi observada por este método. A interação com actina foi confirmada por experimentos de imunomarcção, espectroscopia de fluorescência e co-purificação. Para estudar o efeito de tais interações no contexto da infecção, transfectamos células eucarióticas com a proteína VgrG4-CTD recombinante. Por microscopia de fluorescência foi observado que a VgrG4-CTD induz remodelamento dos filamentos de actina em macrófagos. Em células do epitélio pulmonar, a VgrG4-CTD aumentou a internalização bacteriana. Numa outra vertente do projeto, hipotetizamos que a VgrG4-CTD pode funcionar como um domínio para ancoragem de outras proteínas, possibilitando a translocação delas pelo T6SS. Para estudar esta hipótese, realizamos experimentos de co-precipitação usando a VgrG4-CTD recombinante como isca e identificamos ligantes da VgrG4-CTD em extratos da própria *K. pneumoniae*. Identificamos que a VgrG4-CTD interage com fatores de virulência bacterianos como EF-TU, Pgc e DeoC. Esses dados, em conjunto, contribuem para melhor caracterização do papel da VgrG4-CTD e do T6SS para a patogênese de *K. pneumoniae*.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CHARACTERIZATION OF THE *Klebsiella pneumoniae* TYPE VI SECRETION SYSTEM: FUNCTION OF THE VgrG PROTEIN

#### Abstract

**Talyta Soares do Nascimento**

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen, which mainly affects immunocompromised patients, but can affect healthy people. It is responsible for several acute infections of the urinary and respiratory tracts, among others. This bacterium has caused concern in public health systems around the world as strains showing high levels of virulence and resistance to antimicrobials have often been isolated. Recently, the Type VI Secretion System (T6SS) has been shown to be a virulence factor of this species. T6SS is a macromolecular complex assembled across bacterial membranes and that acts as a syringe that injects effector proteins into other cells. These effectors confer a competitive advantage or can manipulate the metabolism of the host cell to favor infection. One of the essential components of T6SS is the Valine-Glycine Repeat G (VgrG) protein. VgrG is mounted on the top of the syringe and can have a variable C-terminal extension, with an effector function. To date, there are no studies on the function of VgrG proteins encoded in the *K. pneumoniae* genome. In order to raise hypotheses about the C-terminal function of VgrG4 (VgrG4-CTD) of *K. pneumoniae*, in a previous study our group expressed the recombinant protein and identified its ligands in macrophages and lung epithelial cells. In total, 254 proteins were identified in the eukaryotic cell extracts. The categorization of these proteins revealed that most of the possible ligands are components of the cytoskeleton, chaperones or participate in the endocytic pathway. In this work, the interaction of VgrG4-CTD with vimentin and cytokeratin was confirmed by immunodetection; however, the interaction with tubulin could not be observed by this method. The interaction with actin was confirmed by immunostaining, fluorescence spectroscopy and co-purification experiments. To study the effect of such interactions in the context of infection, we transfected eukaryotic cells with the recombinant VgrG4-CTD protein. By fluorescence microscopy it was observed that VgrG4-CTD induces remodeling of actin filaments in macrophages. In pulmonary epithelial cells, VgrG4-CTD increased bacterial internalization. In another aspect of the project, we hypothesized that VgrG4-CTD may function as a domain for anchoring other proteins, enabling their translocation by T6SS. To study this hypothesis, we performed pulldown experiments using recombinant VgrG4-CTD as bait and identified ligands of VgrG4-CTD in extracts of *K. pneumoniae*. We found that VgrG4-CTD interacts with bacterial virulence factors such as EF-TU, P<sub>gk</sub>, and DeoC. Together, these data contribute to a better characterization of the role of VgrG4-CTD and T6SS in the pathogenesis of *K. pneumoniae*.

# 1. INTRODUÇÃO:

## 1.1. *Klebsiella pneumoniae*

### 1.1.1. Características gerais e epidemiologia:

*Klebsiella pneumoniae* é membro da família Enterobacteriaceae, sendo uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, sem motilidade, e com uma cápsula polissacarídica proeminente. Esta espécie é encontrada de forma ubíqua na natureza, incluindo ambientes aquáticos, solo e plantas ou associadas a animais, inclusive a seres humanos (1,2). Em hospedeiros animais e humanos a *K. pneumoniae* pode ser encontrada como uma bactéria comensal, mas também pode ser um patógeno oportunista. O ambiente provavelmente atua como um reservatório de *K. pneumoniae*, e insetos como as moscas podem ser agentes de disseminação e dispersão bacteriana (3,4).

*K. pneumoniae* é uma bactéria comensal do trato gastrointestinal humano, entretanto, *Klebsiella* pode se disseminar para outros tecidos causando infecções associadas a saúde, como pneumonia, infecções do trato urinário e infecções sanguíneas. Grande parte dessas infecções acometem pacientes previamente doentes ou imunocomprometidos, neonatos e idosos (5). Contudo, alguns isolados possuem determinantes de virulência adicionais e podem acometer pessoas previamente saudáveis, causando infecções como abscesso hepático, endoftalmite e meningite na comunidade (6). Infecções causadas por *K. pneumoniae* geralmente são tratadas com  $\beta$ -lactâmicos ou antibióticos que tenham efeito contra enterobactérias. Contudo, isolados resistentes a um ou mais antibióticos são cada vez mais frequentes (5). Ainda, há relatos de isolados pan-resistentes, ou seja, resistentes a todos os antibióticos (7, 8) e isolados que são ao mesmo tempo multi-resistentes e hiper-virulentos (9).

*K. pneumoniae* é uma das principais causas de infecções hospitalares nos Estados Unidos da América (10), sendo a terceira principal causa de pneumonia. *K. pneumoniae* também é a principal causa de pneumonia associada à ventilação entre pacientes de unidades de tratamento intensivo (UTI), e esse tipo de infecção é responsável por 83% das pneumonias adquiridas nos hospitais americanos (10,11). Esse tipo de infecção também tem sido relatado no Brasil nos últimos anos, segundo o Portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência

à Saúde (IRAS) e resistência microbiana durante o ano de 2018 feita pela ANVISA mostra a ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea associadas ao uso do cateter venoso central, sendo a *K. pneumoniae* o microrganismo mais frequentemente identificado em UTIs adulta, pediátrica e neonatal dos hospitais brasileiros (12). Além disso, *K. pneumoniae* também é o principal microrganismo notificado associado a infecções do trato urinário, tanto na UTI adulta quanto na pediatria. Dentre os perfis bacterianos notificados, destacam-se *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e cefalosporinas de 3° e 4° geração na UTI adulta e *K. pneumoniae* sensível a carbapenêmicos e resistentes a cefalosporinas de 3° e 4° geração na UTI pediátrica (12).

*K. pneumoniae* é a segunda maior causa de infecções sanguíneas causadas por bactérias Gram-negativas, atrás somente da *E. coli* (10,11). Infecções sanguíneas são infecções secundárias resultantes da disseminação bacteriana na corrente sanguínea de fontes conhecidas como o trato urinário, o trato gastrointestinal, cateteres intravenosos ou urinários (15). A taxa de mortalidade em indivíduos acometidos por infecções sanguíneas causadas por *K. pneumoniae* é em torno de 20 a 30%, e a taxa de mortalidade na população em geral é estimada em 1,3 por 100.000 indivíduos (14). O trato urinário é o sítio mais comum de infecção por *K. pneumoniae*. Infecções do trato urinário associadas a cateteres são comumente relacionadas a *K. pneumoniae*. Acredita-se que a infecção seja facilitada pela habilidade de *K. pneumoniae* de formar biofilmes e aderir em cateteres (16). *K. pneumoniae* também é responsável por causar infecções em feridas e em locais que foram submetidos à cirurgia. Esse tipo de infecção representa 13% das infecções causadas por *K. pneumoniae* (4,10). Isolados ambientais de *K. pneumoniae* geralmente são mais suscetíveis a antibióticos que isolados clínicos, o que sugere que a pressão seletiva ocorre no ambiente clínico o que leva a *K. pneumoniae* clínica a apresentar um perfil de resistência frente a diferentes classes de antibióticos (17).

Genomas típicos de *K. pneumoniae* apresentam entre 5 e 6 milhões de pares de bases (Mpb), organizados em um cromossomo circular, podendo conter plasmídeos adicionais. Esses genomas contêm entre 5000 e 6000 genes, dos quais cerca de 1700 genes são conservados em todos os membros dessa espécie, enquanto que os outros genes, denominados genes acessórios, estão presentes em apenas subconjuntos de isolados ou cepas (17–19). Esses genes presentes no genoma acessório podem estar envolvidos com processos que conferem características específicas que diferenciam os membros dessa espécie. Por exemplo, alguns carregam genes que possibilitam a fixação de nitrogênio, outros contêm fatores de virulência adicionais ou, ainda, carregam genes envolvidos na resistência a agentes

antimicrobianos (20,21). Esses genes acessórios podem ser adquiridos principalmente através de mecanismos de transferência gênica horizontal entre diferentes espécies bacterianas ou entre cepas da mesma espécie, o que é evidenciado pela grande quantidade de ilhas genômicas e elementos genéticos móveis nos genomas de *K. pneumoniae* já analisados. Uma vez adquiridos, esses genes passam por pressão seletiva e, se conferirem vantagens adaptativas para a bactéria, serão selecionados positivamente, mantidos no genoma ou modificados por outros processos moleculares-evolutivos - dando origem à grande diversidade genotípica e fenotípica observada entre membros dessa espécie (17,22).

### **1.1.2. Resistência a antimicrobianos**

Devido à crescente resistência a antimicrobianos, *K. pneumoniae* tem sido apontada como uma ‘ameaça urgente à saúde humana’ pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (23). Mais de um terço dos isolados de *K. pneumoniae* reportados no *European Centre for Disease Prevention and Control* foram resistentes a pelo menos um grupo antimicrobiano, sendo o fenótipo de resistência mais comum a resistência combinada a fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos (5).

O tratamento dessas infecções é feito através do uso de antibióticos que atuam na inibição de mecanismos indispensáveis para o funcionamento celular, como a síntese de proteínas a nível ribossomal ou replicação de DNA, por exemplo (24). Dentre os antibióticos disponíveis atualmente, os carbapenemos são considerados a última opção terapêutica para tratamento de infecções resistentes; porém, cepas de *K. pneumoniae* que produzem enzimas carbapenemases são capazes de hidrolisar os  $\beta$ -lactâmicos, entre eles os carbapenêmicos (25).

Tal resistência é adquirida quando a bactéria se encontra em um ambiente hostil e por pressão seletiva, mecanismos de resistência que conferem proteção são selecionados. Mutações no genoma bacteriano são um mecanismo de variabilidade, que eventualmente podem levar a alterações de aminoácidos em proteínas e conseqüentemente podem alterar aspectos da conformação tridimensional da proteína. Quando essas alterações ocorrerem em proteínas alvo de antibióticos, podem impedir que o fármaco reconheça a proteína alvo e que seja capaz de inativá-la. Tais mutações são vantajosas quando a bactéria se encontra num ambiente com a presença seletiva de tal antibiótico, conferindo resistência e podendo ser selecionadas positivamente.

Além dos mecanismos de resistência adquiridos a partir de mutações, as bactérias Gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos devido a barreira formada pela sua membrana externa (26,27). Contudo, os antibióticos hidrofílicos atravessam a membrana externa por difusão através de porinas presentes na membrana externa (26,28). A regulação negativa da expressão de porinas ou a substituição das porinas por outros canais de transporte são uma alternativa para reduzir a permeabilidade da membrana externa, limitando a entrada de antibióticos na bactéria (29–31). Muitos antibióticos se ligam especificamente aos seus alvos com alta afinidade. Alterações na estrutura do alvo, proteção dos alvos de antibióticos, modificação direta ou inativação de antibióticos impedem a ligação eficiente destes o que pode conferir resistência (32).

Assim como a bactéria é capaz de impedir a entrada de antibióticos ou alterar seus alvos, as bactérias também são capazes de resistir aos antibióticos pela modificação ou destruição dos mesmos. A modificação dos antibióticos via enzimas é o maior mecanismo de resistência bacteriana, tendo sido relatado desde o uso do primeiro antibiótico, a penicilina (por uma  $\beta$ -lactamase), em 1940. Centenas de enzimas que são capazes de degradar e modificar diferentes classes de antibióticos têm sido identificadas, incluindo os  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicóis e macrólídeos (33). As bactérias também são capazes de usar enzimas das classes das acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferase para adicionar grupos químicos a sítios vulneráveis da molécula do antibiótico, impedindo a ligação do antibiótico ao alvo, levando à resistência (32,34).

Considerando os problemas de saúde pública causados por esta espécie, faz-se necessário conhecer sua biologia e fisiologia, para que no futuro seja possível desenvolver novas estratégias de controle das doenças causadas por ela. Recentemente, a OMS lançou uma campanha mundial para combater a resistência de bactérias a antibióticos. Tal iniciativa se dá pelo fato de que dados recentes da vigilância sobre resistência aos antibióticos revelam níveis elevados de resistência em uma série de infecções bacterianas graves em países de alta e baixa renda. Segundo o diretor-geral da OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus: “A resistência antimicrobiana é um dos mais urgentes riscos de saúde do nosso tempo e ameaça desfazer um século de progresso.”

### **1.1.3. Mecanismos de Virulência**

Nesse contexto de infecção, são conhecidos alguns fatores de virulência de *K. pneumoniae* que contribuem para interação com hospedeiros através dos seus mecanismos de patogenicidade. Dentre eles, a cápsula polissacarídica, lipopolissacarídeo, sideróforos e fímbrias.

A cápsula polissacarídica é uma estrutura formada por polissacarídeos que recobrem a superfície bacteriana, sendo considerada o fator de virulência mais importante de *K. pneumoniae*. A capsula modula a opsonização e protege a bactéria de ser fagocitada por células de defesa do hospedeiro conferindo maior persistência bacteriana, uma vez que a *K. pneumoniae* é uma bactéria tipicamente extracelular, tornando a capsula um componente importante para a infecção causada por *K. pneumoniae* (35). Essa vantagem que a cápsula proporciona à bactéria parece ser fundamental durante a infecção já que bactérias não capsuladas são mais fagocitadas do que cepas produtoras de cápsula (36). Além disso, as bactérias não encapsuladas induzem maiores níveis de produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, enquanto que bactérias com cápsula induzem uma resposta mais anti-inflamatória pela produção de IL-10 (37). Atualmente existem 79 sorotipos capsulares descritos para *Klebsiella* spp, conhecidos como antígenos K (38). Interessantemente, esse tipo capsular está relacionado à severidade das infecções, sendo os sorotipos K1 e K2 os mais virulentos (4,38) podendo causar para infecções adquiridas na comunidade, como abscessos hepáticos piogênicos (39).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são considerados importantes e necessários componentes estruturais do folheto externo da membrana externa de bactérias Gram-negativas e são conhecidos como endotoxinas (40). São compostos pelo antígeno O, um oligossacarídeo central e pelo lipídio A (41,42). Durante a infecção por *K. pneumoniae* o LPS tem um papel ambíguo, pois o LPS é um importante fator de virulência que protege a bactéria contra as defesas do hospedeiro, mas também por ser um forte ativador imunológico. A porção lipídica do LPS, o lipídio A, pode ser um ligante potente de receptores do tipo Toll 4 (TLR4), que são receptores de reconhecimento de padrões bacterianos. A ativação de receptores TLR4 leva à produção de citocinas e quimiocinas que recrutam neutrófilos e macrófagos que, por sua vez, ativam respostas celulares que irão controlar a disseminação bacteriana para outros tecidos e resolver a infecção por *K. pneumoniae* (43–45). A infecção por *K. pneumoniae* também pode levar à ativação da via complemento, e o LPS é principal meio de proteção. Cepas que contém o antígeno O são resistentes à morte mediada pelo sistema complemento, enquanto cepas em que o antígeno O é ausente se tornam mais suscetíveis à ação do sistema complemento (46).

Os sideróforos são importantes para a captação de ferro extracelular. A aquisição desse ferro é fundamental para o crescimento de várias espécies bacterianas; porém, é um recurso limitado. No hospedeiro há pouco ferro livre no plasma, pois este elemento está ligado geralmente a moléculas transportadoras de ferro, como a transferrina. Hospedeiros mamíferos são capazes de reduzir ainda mais os níveis de ferro após a infecção bacteriana, alterando a ligação do ferro à lactoferrina, uma proteína de defesa inata (47,48). Contudo, a *K. pneumoniae* consegue adquirir ferro durante a infecção em hospedeiros mamíferos devido a secreção de vários sideróforos como enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina, que apresentam maior afinidade pelo ferro do que as moléculas transportadoras de ferro presentes no hospedeiro (40,47,49,50).

As fímbrias representam outra classe de fatores de virulência presentes na superfície de *K. pneumoniae*, sendo importantes mediadores da adesão bacteriana. Em *K. pneumoniae* as fímbrias do tipo 1 e 3 são os principais apêndices envolvidos na adesão (40). As fímbrias do tipo 1 e 3 são expressas em quase todos os isolados de *K. pneumoniae* (48, 49). *K. pneumoniae* utiliza os sinais ambientais para regular a expressão das fímbrias do tipo 1. Os genes que codificam as fímbrias do tipo 1 são expressos no trato urinário, mas não no trato gastrointestinal nem nos pulmões (53,54). Já foi observado que fímbrias do tipo 1 contribuem para invasão de células da bexiga por *K. pneumoniae* e para formação de biofilme durante infecção do trato urinário em um modelo de infecção de camundongo (53,54). Assim como as fímbrias do tipo 1, as fímbrias do tipo 3 não são necessárias para a colonização no trato gastrointestinal ou virulência nos pulmões, mas podem se ligar a células epiteliais de bexiga em cultura. Porém, em um modelo de infecção em camundongo, as fímbrias do tipo 3 não parecem contribuir para infecção do trato urinário (54,55).

Estudos recentes permitiram identificar novos possíveis fatores de virulência (genes/proteínas) em *K. pneumoniae* (40). Dentre esses possíveis fatores de virulência de *K. pneumoniae* estão proteínas de membrana externa (denominadas OMPs, do inglês *outer-membrane proteins*), bombas de efluxo, sistemas de transporte de íons e sistemas de secreção de proteínas. As OMPs de bactérias Gram-negativas servem como um canal para regular o influxo e efluxo de substâncias como íons, nutrientes e antibióticos (56). A OmpA de *K. pneumoniae*, por exemplo, auxilia na virulência através da proteção contra a resposta imune inata (57). As bombas de efluxo estão envolvidas na virulência por mediar a resistência contra peptídeos antimicrobianos presentes no pulmão.

Apesar da resistência a antibióticos não ser por si só um fator de virulência, em algumas circunstâncias a resistência é um fator chave no desenvolvimento da infecção e pode ser considerada um fator semelhante à virulência em nichos ecológicos específicos onde bactérias resistentes são capazes de colonizar. Isso é observado em ambientes hospitalares, onde um patógeno oportunista é resistente a antibióticos e consegue causar doenças mais facilmente (58). Um exemplo é a família de proteínas de resistência à acriflavina (*Acriflavine resistance protein Family - AcrAB*) em *K. pneumoniae*, que gera um fenótipo de resistência a múltiplas drogas e também é importante para resistir aos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro (59).

Além disso, os sistemas de secreção também são descritos por estarem envolvidos na virulência de diversas espécies bacterianas (60–62). Basicamente, os sistemas de secreção são mecanismos de transporte de moléculas (proteínas, enzimas, toxinas, DNA) do meio intracelular para o meio extracelular ou para o interior de células alvo (63). No genoma de *K. pneumoniae* 52.145 foram identificados genes que codificam quatro tipos de sistemas de secreção (64). Como este tema é o tema central do estudo aqui apresentado, o conhecimento atual sobre sistemas de secreção bacterianos será apresentado na seção a seguir.

## **1.2. Sistemas de Secreção**

### **1.2.1. Aspectos gerais**

Os sistemas de secreção são complexos macromoleculares e dinâmicos que possibilitam o transporte de diversas moléculas do citoplasma bacteriano para o meio extracelular ou para o interior de determinadas células. Alguns desses sistemas funcionam em duas etapas, sendo formados por um complexo inserido na membrana interna (transloca o substrato do citoplasma para o periplasma) e outro na membrana externa (transloca o substrato do periplasma para o meio extracelular). Outros sistemas são capazes de formar tubos contínuos que atravessam ambas as membranas da célula bacteriana, translocando seus substratos em uma única etapa. Alguns desses sistemas que formam tubos ainda são capazes de atravessar uma terceira membrana (membrana da célula alvo), translocando moléculas do citoplasma bacteriano diretamente para o interior da célula alvo. Por todas essas formas, os sistemas de secreção atuam na interação da bactéria que o possui com o ambiente em que ela está e com outras células, procarióticas ou eucarióticas, que habitam o mesmo nicho.

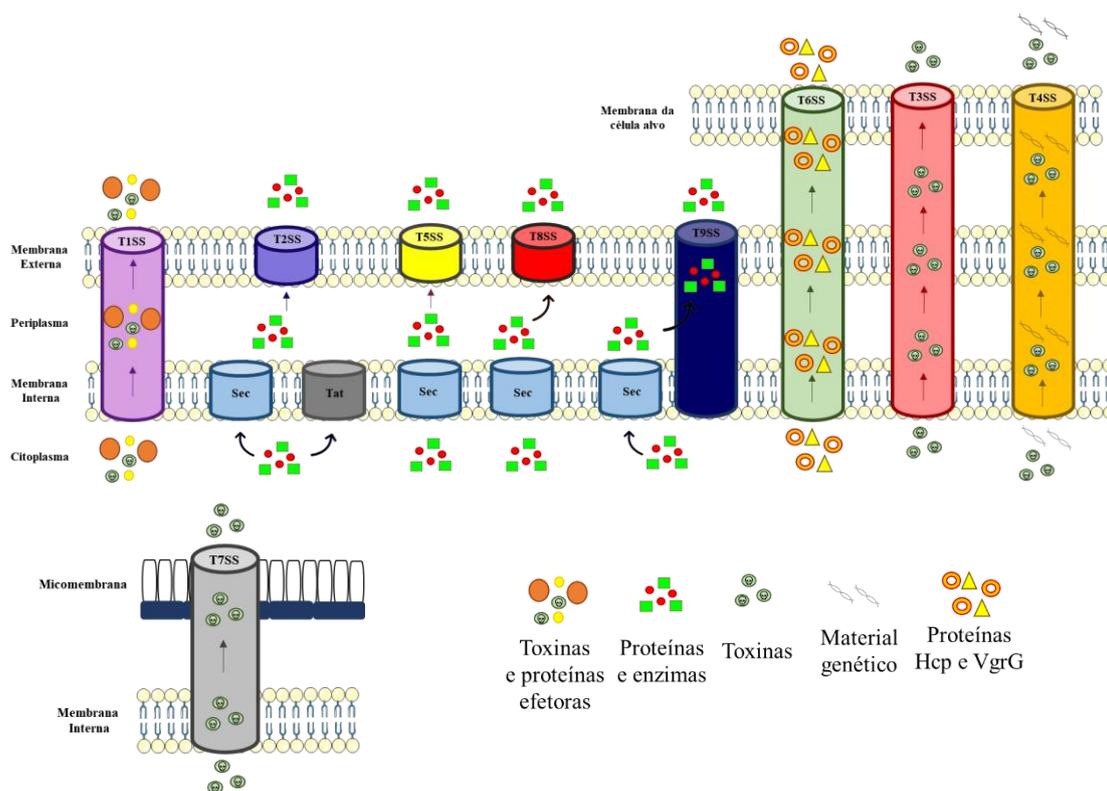
Atualmente, são descritos nove tipos de sistemas de secreção (Figura 1). Alguns deles não formam tubos e, portanto, não são capazes de translocar diretamente proteínas do citoplasma bacteriano para o meio extracelular, sendo essa translocação feita em duas etapas. Esses tipos de sistemas de secreção são dependentes de outros dois sistemas de translocação, como os sistemas Sec e Tat. Em bactérias, proteínas secretadas atravessam a membrana citoplasmática tanto pela via de secreção geral (Sec) quanto pela translocação de arginina dupla (Tat). O sistema Sec catalisa a translocação transmembranar de proteínas em sua conformação desenovelada; já o sistema Tat catalisa a translocação de proteínas em seu estado enovelado (65).

O Sistema de Secreção do Tipo I (T1SS) é comum em bactérias Gram-negativas patogênicas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* ou *Bordetella pertussis*, secretando várias moléculas como carboidratos, drogas e proteínas. As moléculas que esse sistema é capaz de translocar podem variar de tamanho, como o peptídeo colicina V de *E. coli*, de 10 kDa, até a proteína de adesão celular LapA de *Pseudomonas fluorescences*, de 520 kDa (66,67). O Sistema de Secreção do Tipo II (T2SS) está localizado tanto na membrana interna quanto na membrana externa e é usado para translocar uma variedade de proteínas do periplasma para o meio extracelular, sendo importante para espécies patogênicas e não patogênicas. Esse tipo de sistema é dependente dos sistemas Sec ou Tat para a secreção inicial dentro da célula bacteriana, e atuam a partir do periplasma para secretar proteínas para fora da célula. Patógenos com T2SS incluem *V. cholerae*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Klebsiella*, *Legionella pneumophila* e *Yersinia enterocolitica* (68). O sistema de Secreção do Tipo V (T5SS), por sua vez, é um pouco diferente dos outros sistemas de secreção pois é capaz de se auto translocar e é responsável pela translocação de enzimas, toxinas e outros fatores de virulência com tamanhos e estruturas variadas. Esse sistema é dependente do sistema Sec e envolve apenas a membrana externa bacteriana. Ele é encontrado em *B. pertussis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, entre outros (69,70). O Sistema de Secreção do Tipo VII (T7SS) é encontrado apenas em micobactérias e em bactérias Gram-positivas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Streptomyces coelicolor* e *Staphylococcus aureus* e é requerido para o transporte de fatores de virulência (71).

Já os sistemas de secreção do tipo VIII (T8SS) e do tipo IX (T9SS), ao contrário dos demais, são pouco estudados, mas o que já se sabe é que o T8SS é usado por *Enterobacteriaceae* para secretar fibras amiloides (curli) que constituem o principal componente proteico dos biofilmes. Esse tipo de sistema também é dependente do sistema

Sec (72). Já o T9SS foi recentemente caracterizado em *Porphyromonas gingivalis* (73) e é encontrado no superfilo Fibrobacteres-Chlorobi-Bacteroidetes. Apesar de ser um sistema ainda pouco estudado, já foi visto que ele está envolvido na motilidade, no direcionamento de fatores de virulência para a superfície celular e na degradação de biopolímeros, sendo dependente do sistema Sec também (74).

Além dos sistemas descritos acima, ainda existem os sistemas de secreção do tipo III, IV e VI que formam tubos conhecidos como injectissomas, sendo capazes de translocar proteínas através de três membranas, se necessário. O Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) é estruturalmente semelhante e relacionado ao corpo basal de flagelos bacterianos (75). É encontrado em muitas espécies patogênicas como *Salmonella enterica*, *E. coli*, espécies de *Yersinia* e *P. aeruginosa*, translocando proteínas efetoras diretamente para o citoplasma de células hospedeiras (76). Os T4SS são transportadores com multicomponentes presentes em espécies como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* adaptados para funções diversas tais como transferência de DNA na conjugação bacteriana ou entrega de proteínas únicas ou de complexos DNA-proteína em células recipientes (77). Já foi demonstrado que *Xanthomonas citri* utiliza o T4SS para secretar efetores que são letais para outras espécies bacterianas (78). E por último, o T6SS é uma máquina macromolecular dinâmica multicomponente que tem uma importante função na ecologia de muitas bactérias Gram-negativas. O T6SS é responsável pela translocação de uma grande variedade de moléculas efetoras, permitindo a células predatórias matar células presas, tanto eucarióticas quanto procarióticas (79).

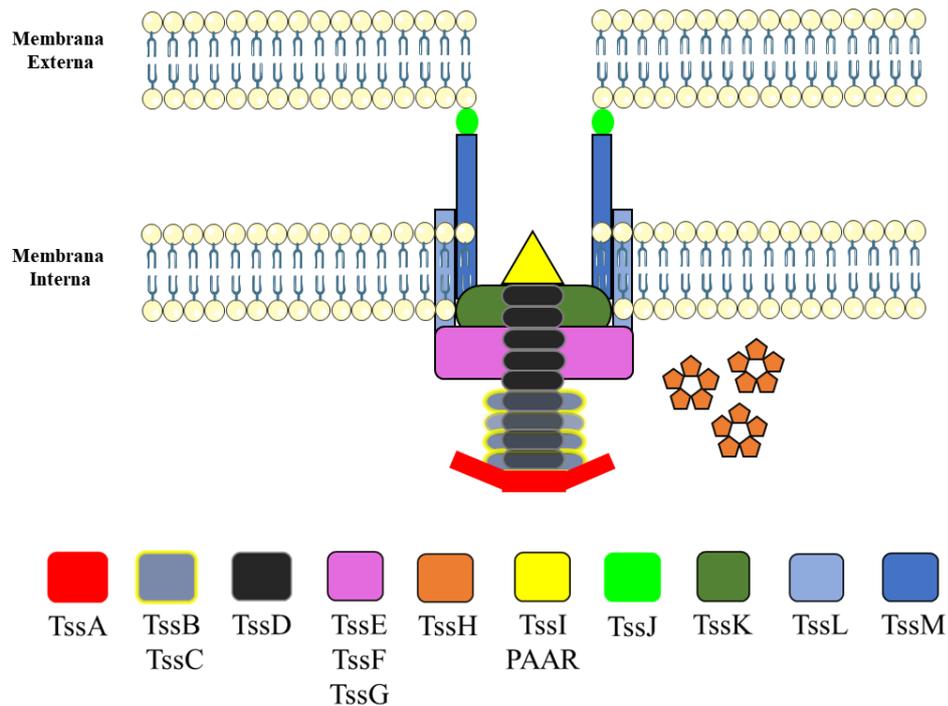


**Figura 1: Esquema representativo dos 9 tipos de sistemas de secreção.** Na imagem são mostrados os sistemas de secreção presentes em diversas espécies bacterianas, desde os sistemas que formam tubo através das duas membranas bacterianas (T1SS - roxo, T3SS - rosa, T4SS - laranja, T6SS- verde), os dependentes dos sistemas Tat e Sec (T2SS - azul escuro, T5SS- amarelo, T8SS - vermelho, T9SS - azul marinho) e o sistema encontrado em micobactérias (T7SS - cinza claro). Também são representadas as moléculas translocadas por esses sistemas: as toxinas - círculos verdes e proteínas efetoras – círculos fechados amarelos e laranjas; as proteínas e enzimas - quadrados verdes e círculos vermelhos; o material genético, e as proteínas Hcp - círculos abertos laranja e VgrG - triângulos amarelos. Imagem feita baseada no trabalho de 2009 de Tseng e colaboradores (80).

### 1.2.2. O Sistema de Secreção do tipo VI (T6SS)

Identificado em 2006 em *V. cholerae* por Pukatzki e colaboradores, o T6SS consiste em um complexo macromolecular capaz de atravessar ambas as membranas de bactérias Gram-negativas de forma a permitir a translocação de proteínas do citoplasma bacteriano (Figura 2). Além disso, esse sistema é capaz de atravessar uma terceira membrana, que pode ser a membrana da célula alvo, translocando uma diversidade de proteínas efetoras/fatores de virulência usando um mecanismo dinâmico de disparo diretamente para a célula alvo (81–83). Evidências de análises estruturais utilizando cristalografia, crio-microscopia eletrônica e resolução atômica, juntamente com análises de bioinformática, sustentam a ideia de que o aparato do T6SS é intimamente relacionado a componentes de um bacteriófago contrátil que forma um dispositivo de punção celular (84–88).

Os componentes do T6SS são codificados dentro de clusters que contém 13 genes principais conservados, denominados TssA-M (*Type six subunits*), que codificam proteínas que constituem o aparato básico de secreção (84–87). Esse complexo é formado por um tubo central (TssD) e um tubo externo (TssB e TssC), que circunda o tubo central. Em uma das extremidades desse tubo central estão as proteínas que formam a ponta do complexo (TssI e PAAR). Também compondo esse sistema, há as proteínas de ancoramento nas membranas interna e externa (TssL, TssM e TssJ) e ainda uma ATPase citoplasmática (TssH) que atua na reciclagem dos componentes do T6SS (89).



**Figura 2: Esquema representativo do T6SS.** Na imagem são mostrados os componentes do T6SS: o tubo central formado pela TssD (preto); o tubo externo formado pela TssB e TssC (azul claro com as bordas em amarelo); as proteínas que formam a ponta do complexo, TssI e PAAR (amarelo); as proteínas de ancoramento nas membranas externa e interna, TssL (azul claro), TssM (azul escuro) e TssJ (verde fluorescente); as proteínas do *baseplate*, TssE, TssF, TssG (rosa) e TssK (verde escuro); a proteína TssH com atividade ATPase citoplasmática (laranja); e a proteína TssA (vermelho). Adaptado de Zoued e colaboradores, 2017 (90).

Como ilustrado na Figura 2 acima, o T6SS é composto pelas proteínas TssJ, TssL e TssM, que formam o complexo de membrana, sendo TssJ uma lipoproteína de membrana externa e TssL e TssM proteínas ancoradas na membrana interna (87). Recentemente, foi demonstrado que TssJ é a primeira proteína a se posicionar na membrana externa, recrutando TssM e TssL a seguir (91). Além disso, o T6SS é formado por um tubo central de proteínas TssD, também conhecida com *hemolysin-coregulated protein* (Hcp), que são hexâmeros com diâmetro externo de cerca de 80 a 90 Å e 35 a 40 Å de diâmetro interno empilhados a partir

do citoplasma bacteriano, podendo comportar proteínas enoveladas e desenoveladas (92–94). Ao redor do tubo de Hcp estão as proteínas TssB e TssC, também conhecidas como *ClpV-interacting protein A* (VipA) e *ClpV-interacting protein B* (VipB), respectivamente, que formam uma bainha ao redor do tubo de Hcp. Essa bainha de proteínas VipA e VipB ao redor do tubo de Hcp apresentam uma conformação estendida. A partir de um estímulo, a estrutura formada por VipA e VipB passa para a conformação contraída o que leva a impulsão do tubo de Hcp para o meio extracelular (95).

Já na ponta desse tubo está a proteína TssI, também conhecida como *Valine Glycine repeat protein G* (VgrG) e a proteína *Pro-Ala-Ala-Arg repeats containing protein* (PAAR). Já foi mostrado que proteínas que contêm domínios PAAR se ligam à extensão C-terminal da VgrG para completar o topo da maquinaria, atuando também como uma plataforma para recrutamento de proteínas efetoras (79). Acredita-se que o recrutamento da proteína VgrG para o complexo proteico da base aumenta a eficiência de formação do tubo de Hcp (96). Ambas as proteínas Hcp e VgrG são encontradas no sobrenadante de culturas (97). Esse sistema também é composto pelas proteínas do *baseplate*, TssE, TssF, TssG e TssK. Essas subunidades formam um complexo que quando é recrutado se encaixa no complexo de membrana, funcionando como uma plataforma para a montagem da cauda (98,99). Um dos componentes essenciais desse sistema é a proteína TssA, pois participa de passos importantes da montagem do T6SS, desde o acoplamento do complexo da membrana com o *baseplate*, a contração da cauda e a extensão do tubo e seu revestimento (98).

A montagem e desmontagem desse sistema é feito pela proteína TssH, uma Clp ATPase citoplasmática que é responsável pela reciclagem dos componentes do T6SS no interior do citoplasma bacteriano após a translocação das proteínas Hcp, VgrG, PAAR e efetores no meio extracelular ou no interior de células alvo, reutilizando esses componentes para a montagem de um novo complexo de T6SS. Esse reaproveitamento dos componentes do T6SS no interior da bactéria dependerá da duração do estímulo. Sendo assim, a proteína TssH é mais importante para atividade do T6SS do que para montagem do sistema em si (100–102).

Uma das principais formas da bactéria interagir com o ambiente ou com outras bactérias ao seu redor é através de proteínas secretadas. A secreção de proteínas mediada pelos sistemas de secreção para o meio extracelular ou para o interior de células eucarióticas e procarióticas é um mecanismo que evoluiu junto com a necessidade de adaptação ao ambiente, evasão do sistema imune do hospedeiro e aquisição de nutrientes importantes

(103,104). A função melhor caracterizada do T6SS é a entrega de efetores antibacterianos, com três principais classes de efetores: as muramidases, ou as hidrolases de glicosídeo, que atacam a parede celular (105); as nucleases, que tem como alvo os ácidos nucleicos (106); e as lipases, que atuam na degradação da membrana de células procarióticas, facilitando a competição entre espécies (97). Contudo, a toxicidade desses efetores não afeta apenas as células adjacentes, mas também as próprias bactérias. Para proteger a si mesmas e as células-irmãs da intoxicação mediada por esses efetores, as bactérias geralmente expressam proteínas de imunidade cognatas com o objetivo de neutralizar a toxicidade desses efetores antibacterianos (107–109). Essas proteínas de imunidade formam pares com o seu efector correspondente e essa interação parece ser crucial durante a competição bacteriana (110).

### 1.2.3. T6SS na competição bacteriana

A capacidade do T6SS de entregar efetores a outras bactérias é extremamente importante para a competição bacteriana, uma vez que a bactéria pode utilizar esse mecanismo para promover a sua sobrevivência no contexto de competição bacteriana. Os primeiros efetores com atividade tóxica em outras bactérias foram descritos em *P. aeruginosa* em 2010 por Hood e colaboradores e nomeados *type six exported 1-3* (Tse1-3) (108). Neste trabalho foi mostrado que Tse1 e Tse3 tem atividade bacteriolítica, destruindo a parede celular via peptidoglicano amidase ou via atividade da muramidase, respectivamente. Interessantemente, os peptidoglicanos da parede celular parecem ser um alvo comum dos efetores secretados pelo T6SS (111). Dentre os efetores que tem como alvo a parede celular, aparece também a família de efetores peptidoglicano glicosídeo hidrolase, (Tge1-3) (111,112).

Além desses efetores, o domínio C-terminal da VgrG3 de *V. cholerae* também tem uma atividade de hidrolase de peptidoglicano, o que mostra que os componentes estruturais do T6SS também podem apresentar essa função antibacteriana (109). Um outro grupo de efetores secretados pelo T6SS são aqueles que têm como alvo a membrana bacteriana. Uma superfamília de efetores bacterianos são os efetores com atividade lipase / fosfolipase (Tle1-5). O Tle1, Tle2, Tle3 e Tle4 exibem um *motif* GXDXG comum em lipases, enquanto que Tle5 apresenta um *motif* HXKXXXXD associado com a enzima fosfolipase D (97). Foi visto que Tle1 e Tle2 tem atividade de fosfolipase A, enquanto que efetores tipos Tle5 (PldA e PldB) de *P. aeruginosa* são fosfolipasas D que atuam tanto contra células eucarióticas quanto contra células procarióticas (97,113,114).

Ainda há os efetores preditos de terem atividade na formação de poros na membrana, como por exemplo o VasX encontrado em *V. cholerae* e o PA14\_69520 encontrado em *P. aeruginosa*, ambas são preditas por ter similaridade estrutural com colicinas formadoras de poros, sendo importantes para ação antibacteriana (115–118). Existe também um grupo de efetores que tem como alvo os ácidos nucleicos. Em *A. tumefaciens*, o Tde apresenta uma atividade de DNase dependente de um *motif* conservado HxxD (119). Já em *P. aeruginosa*, o Tse2 é um efector com ação citoplasmática que atua como um potente inibidor de proliferação da célula alvo e é proposto atuar como ribonuclease (120).

Também no denso ecossistema microbiano do colón humano, o T6SS é usado como um mecanismo de antagonismo dependente de contato na competição bacteriana. A composição da microbiota humana é provavelmente influenciada por esses sistemas de secreção (121).

#### **1.2.4. T6SS na interação com células eucarióticas**

Como já mencionado no tópico anterior, as bactérias desenvolveram várias estratégias e mecanismos moleculares que utilizam na interação e competição bacteriana, mas também utilizam ferramentas similares para colonização e sobrevivência em diversos hospedeiros. Um desses mecanismos são os sistemas de secreção de proteínas, que exercem uma função crucial entregando uma infinidade de enzimas, toxinas e efetores ao ambiente, ao competidor ou ao hospedeiro, e que são extremamente importantes para o comportamento da bactéria durante a colonização do hospedeiro (61,119,122,123).

Genes que codificam os componentes do T6SS são encontrados em 25% das bactérias Gram-negativas, incluindo vários patógenos humanos e animais (122,124,125). Interessantemente, são encontradas várias cópias distintas do T6SS dentro de várias espécies. Em *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia thailandensis* são encontrados seis e cinco T6SSs, respectivamente, e em *P. aeruginosa* três T6SSs, por exemplo (126,127). Porém, esses clusters gênicos não apresentam uma função redundante. Em *B. thailandensis* o T6SS-1 é usado para mediar o antagonismo bacteriano, enquanto o T6SS-5 atua na disseminação intracelular em macrófagos infectados. O mesmo acontece em *P. aeruginosa*, onde o H1-T6SS é usado para morte bacteriana enquanto que o H2-T6SS tem como alvo células procarióticas e eucarióticas (108,114).

Vários estudos relataram a importância do T6SS em modelos de infecção usando linhagens de células eucarióticas, sugerindo que a subversão do hospedeiro é uma função

importante do sistema de secreção. De fato, a ausência de um T6SS funcional afeta a patogenicidade das bactérias em relação ao hospedeiro, o que foi bem resumido por Abderrahman Hachani e colaboradores em trabalho de 2016, onde os autores mostram os fenótipos mediados pelo T6SS na interação bacteriana com hospedeiros eucarióticos (122). Além disso, também já foi mostrado que o impacto na patogenicidade pode ser relacionado indiretamente à atividade do T6SS, como por exemplo mutações nos genes do T6SS que podem resultar em uma regulação negativa de outros fatores de virulência como fímbrias e flagelos ou na formação de biofilme (128–131).

Ademais, há vários trabalhos que evidenciam o papel tanto do T6SS quanto dos efetores secretados por esse sistema atuando em diversos processos celulares do hospedeiro durante a infecção. Já foi demonstrado que algumas bactérias são capazes de resistir à fagocitose ou promover sua internalização em células não fagocíticas pela manipulação direta de componentes do citoesqueleto por uma via dependente do T6SS, e essa capacidade tem sido atribuída a VgrGs evoluídas, ou seja, VgrGs que apresentam uma extensão na sua região C-terminal (122). Dentre os efetores que medeiam a resistência à fagocitose inclui-se a VgrG1 de *V. cholerae*, que apresenta em seu C-terminal um domínio de *cross-linking* de actina (ACD). Quando essa proteína é injetada no citoplasma de células eucarióticas, o domínio ACD é capaz de reticular a G-actina, levando a um acúmulo de oligômeros tóxicos de actina e à morte celular da célula hospedeira. A atividade do domínio ACD também é observada *in vivo* contribuindo significativamente para os fenótipos inflamatórios observados em modelo de infecção por camundongo (132–134). Por outro lado, a VgrG2b de *P. aeruginosa* PAO1 é capaz de promover a entrada da bactéria em células não fagocíticas. A extensão C-terminal da VgrG2b interage *in vitro* com membros do complexo do anel da G-tubulina. A inibição química da montagem do microtúbulo previne a entrada bacteriana dependente de VgrG2b, enquanto que a expressão ectópica de VgrG2b restaura a internalização de um mutante *vgrG2b* (135,136). Ainda em relação aos papéis dos efetores na interação com hospedeiro, foi visto que a deleção do gene *hcp* anula a formação de projeções de membrana mediadas por actina em macrófagos infectados, o que indica que o T6SS manipula o citoesqueleto. Outros estudos mostraram uma desregulação mediada por T6SS dos membros da família Rho GTPase, como *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42), *Ras homolog family member A* (RhoA) e *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) (137,138).

Como mencionado acima, os efetores dos sistemas de secreção têm um papel importante na manipulação de vias do hospedeiro; porém, esse papel não é exclusivo das

VgrGs evoluídas, e outros efetores têm sido caracterizados recentemente. Um exemplo são a PldA e a PldB encontradas em *P. aeruginosa*, que exibem uma atividade de fosfolipase D e são transportadas pelo T6SS-H2 e T6SS-H3, respectivamente (139). Ambas as enzimas são codificadas em duas linhas genômicas que codificam uma VgrG canônica e proteínas de imunidade, e tem como alvo as bicamadas fosfolipídicas de outras bactérias e também são translocadas em células epiteliais por *P. aeruginosa*, induzindo a ativação de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (PI3K) ao interagir com RAC-alfa serina/treonina-proteína quinase 1 e 2 (Akt1 e Akt2) (97,114). Um outro efector importante é a VasX, que é uma toxina antibacteriana importante para a resistência à predação por amebas. Foi visto que VasX é capaz de se ligar a diferentes espécies de fosfoinosítídeos *in vitro*, o que poderia causar alteração na distribuição lipídica das membranas influenciando as redes de sinalização do hospedeiro que estão envolvidas na infecção (140,141).

Um dos mecanismos mais eficientes utilizados pelas células fagocíticas para eliminar patógenos é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em *Yersinia pseudotuberculosis*, o T6SS-4 responde à produção de ROS secretando o efector *Yersinia extracellular zinc-binding protein* (YezP), que tem como função eliminar íons de zinco, protegendo o patógeno das ROS (142). Esse mecanismo se aplica a outros patógenos, como *Burkholderia cenocepacia*, que é capaz de diminuir o *pool* de Rac1 ligado a GTP de uma maneira dependente do T6SS, dificultando a montagem de NADPH oxidase na membrana do vacúolo que contém a bactéria, evitando a geração de ROS (137).

### 1.2.5. T6SS em *Klebsiella pneumoniae*

O papel do T6SS em *K. pneumoniae* é um assunto que ganhou interesse nos últimos anos, principalmente porque *K. pneumoniae* é capaz de utilizar esse sistema tanto na competição bacteriana, onde os efetores secretados pela *K. pneumoniae* são capazes de inibir o crescimento de bactérias competidoras, quanto na interação com células hospedeiras, em prol da sobrevivência bacteriana no hospedeiro.

O primeiro trabalho a pesquisar genes do T6SS em *K. pneumoniae* foi feito em 2010 por Sarris e colaboradores, onde os autores investigaram a relação filogenética de proteínas que compõem o T6SS com ortólogos de outras espécies bacterianas. Foi evidenciado a presença de três sintonias distintas e conservadas nos genomas de *Klebsiella* que contém os

genes do T6SS. Essas evidências juntamente com análises funcionais sugerem a existência de um mecanismo organizado do T6SS na interação patógeno-hospedeiro (117). Ainda, foi sugerido que patógenos poderiam utilizar o T6SS para interagir e competir contra competidores bacterianos para estabelecer infecções (126,143,144).

Em 2014, Lery e colaboradores mostraram a presença de um gene que codifica a proteína fosfolipase D (PLD 1) localizado dentro do locus do T6SS. A PLD 1 se mostrou essencial para a virulência de *K. pneumoniae* em um modelo de infecção em camundongos (64). Liu e colaboradores, em 2017, mostraram a fosfolipase Tle1 como um efetor que é secretado pelo T6SS de *K. pneumoniae* HS11286, e que a superexpressão desse efetor no periplasma causa uma inibição severa no crescimento de *E. coli*. Além disso, nesse mesmo trabalho foi visto que concentrações sub inibitórias de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estimulam a expressão e secreção dos efetores Tle1 e Hcp pelo T6SS, fazendo com que as cepas T6SS positivas sejam mais agressivas na competição por crescimento, o que também foi observado em *Acidovorax avenae* (145). Em um contexto clínico, antibióticos podem não ser capazes de inibir a proliferação bacteriana, e ainda induzir a atividade do T6SS, o que sugere que a *K. pneumoniae* HS11286 possa se tornar mais agressiva em um quadro infeccioso (146). Esse foi o primeiro trabalho a relatar a função antibacteriana do T6SS em *K. pneumoniae*.

Ainda, a cepa selvagem de *K. pneumoniae* NTUH-K2044 mostrou habilidade de matar outras bactérias e foi capaz de competir com as cepas mutantes dos genes que codificam a proteína IcmF 1 e 2 (*intracellular multiplication protein F 1 and 2*) e Hcp, mostrando que essas proteínas são importantes para o funcionamento do T6SS em NTUH-K2044. A deleção desses genes também levou à diminuição da expressão de fímbrias que são essenciais para a adesão e invasão celular em *K. pneumoniae*. Já na infecção *in vivo*, o índice de competição dos mutantes *icmF1* e *icmF2* foi reduzido quando comparado com a cepa selvagem. Além disso, a ausência desses genes foi capaz de atenuar a habilidade de colonização intestinal e disseminação sistêmica das cepas mutantes, sugerindo que a deleção de genes que codificam a maquinaria do T6SS resulta na diminuição da colonização bacteriana e restringe a disseminação bacteriana em órgãos distantes. O T6SS, então, confere uma vantagem competitiva a *K. pneumoniae* contra a microbiota intestinal, facilitando o estabelecimento da infecção no hospedeiro e consequentemente aumentando a patogenicidade (147,148).

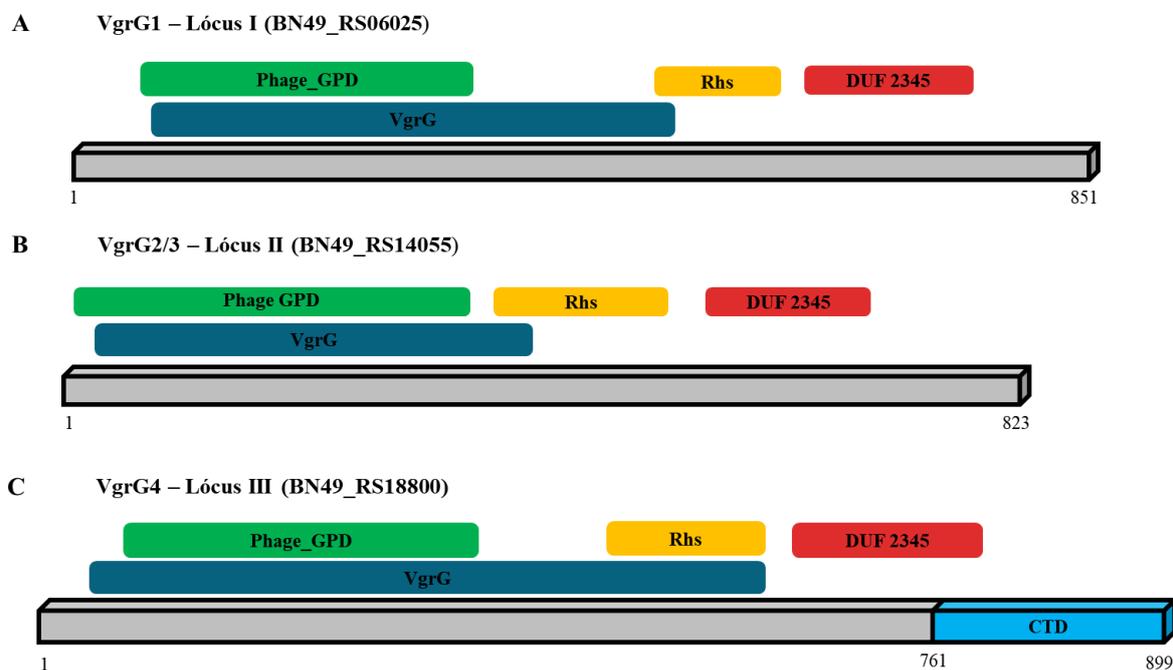
Completando, em um trabalho recente do nosso grupo, foi sugerido que o T6SS de *K. pneumoniae* pode ser regulado em resposta a sinais ambientais que podem ser sentidos pela bactéria dentro do hospedeiro humano, como temperatura, limitação de nutrientes, estresse oxidativo e osmolaridade (149). Apesar de em pouco mais de uma década os estudos sobre o funcionamento do T6SS em *K. pneumoniae* terem avançado, ainda há muito a ser explorado sobre como *K. pneumoniae* usa o T6SS para subverter mecanismos de defesa do hospedeiro assim como ter vantagem competitiva frente a outras bactérias patogênicas.

#### 1.2.6. VgrGs em *K. pneumoniae* Kp 52.145

O nosso grupo de pesquisa tem como objeto de estudo a cepa CIP 52.145 de *K. pneumoniae*, que é um isolado obtido da coleção do Instituto Pasteur derivado da cepa NCTC B 5055, que apresenta uma cápsula tipo K2 e um fenótipo mucoide, além de ser produtora do sideróforo aerobactina, que é um fator de patogenicidade essencial para *K. pneumoniae*. Todos esses fatores de virulência presentes em *K. pneumoniae* 52.145 são associados a infecções hiper virulentas (64,150–152). O sequenciamento genômico da cepa Kp52.145 revelou a presença de genes que codificam os componentes do T6SS (64) e que eles encontram-se agrupados principalmente em 3 regiões genômicas, que foram denominadas T6SS-*locus* I, II e III, sendo alguns dos genes encontrados em apenas um dos *locus* enquanto outros apresentam genes que codificam o mesmo componente do T6SS em mais de um *locus*.

Interessantemente, os 3 *loci* do T6SS presentes na cepa 52.145 de *K. pneumoniae* contém genes que codificam proteínas da família VgrG (64). O T6SS-*locus* I compreende um conjunto de 19 genes, entre os quais encontra-se o gene BN49\_RS06025, que codifica uma proteína de 851 aminoácidos com os seguintes domínios: domínio Phage GPD, um elemento Rhs e um domínio DUF 2345 (Figura 3A), sendo esses três domínios característicos dos membros da família VgrG. Já o T6SS-*locus* II possui 17 genes, incluindo o BN49\_RS14055, que apresenta similaridade de sequência com genes que codificam membros da família VgrG, e que codifica uma proteína que foi denominada VgrG2/3 (153). Inicialmente, haviam sido anotados dois genes diferentes como codificadores de proteínas VgrG, um deles codificando a porção N-terminal de proteínas VgrG e o outro correspondendo à região C-terminal. Após reanálise, houve uma correção e o gene BN49\_RS14055 codifica a proteína VgrG2/3, com 823 aminoácidos, contendo o domínio

Phage GPD, o domínio Rhs e o domínio DUF 2345 (Figura 3B). Por último, o T6SS-lócus III contém 21 genes, entre os quais o gene BN49\_RS18800, que codifica a proteína VgrG4, com uma sequência de 899 aminoácidos apresentando os domínios Phage GPD, o elemento Rhs e o domínio DUF 2345 (Figura 3C).



**Figura 3: Representação esquemática das sequências de aminoácidos das 3 VgrGs codificadas pelo genoma de *K. pneumoniae* Kp52.145 e a posição dos domínios funcionais propostos pelos *Conserved Domain Database* do NCBI.** Phage\_GPD: Proteína do gene D de controle tardio do fago (GPD); DUF 2345: proteína conservada não caracterizada; Rhs: Elemento putativo do Sistema de Secreção do Tipo VI; VgrG: Elemento Rhs da proteína VgrG; CTD: extensão C-terminal da VgrG4 de *K. pneumoniae*.

Dentre as proteínas VgrG codificadas no genoma de Kp 52.145, a VgrG4 é a mais longa, apresentando uma extensão C-terminal de 138 aminoácidos (Figura 4) que não apresenta similaridade de sequência significativa com nenhuma outra proteína do banco de dados do NCBI nem nenhum domínio funcional definido. Contudo, a presença dessa extensão C-terminal levanta o questionamento se a VgrG4 teria uma função efetora pois, como já foi mencionado nos tópicos anteriores, regiões C-terminais de proteínas VgrG geralmente apresentam um papel importante na interação patógeno-hospedeiro (109,154,155). Essa pergunta então se tornou a base dos estudos feitos durante esse projeto, com o intuito de esclarecer a função da proteína VgrG4 e do T6SS na patogênese mediada por *K. pneumoniae*.

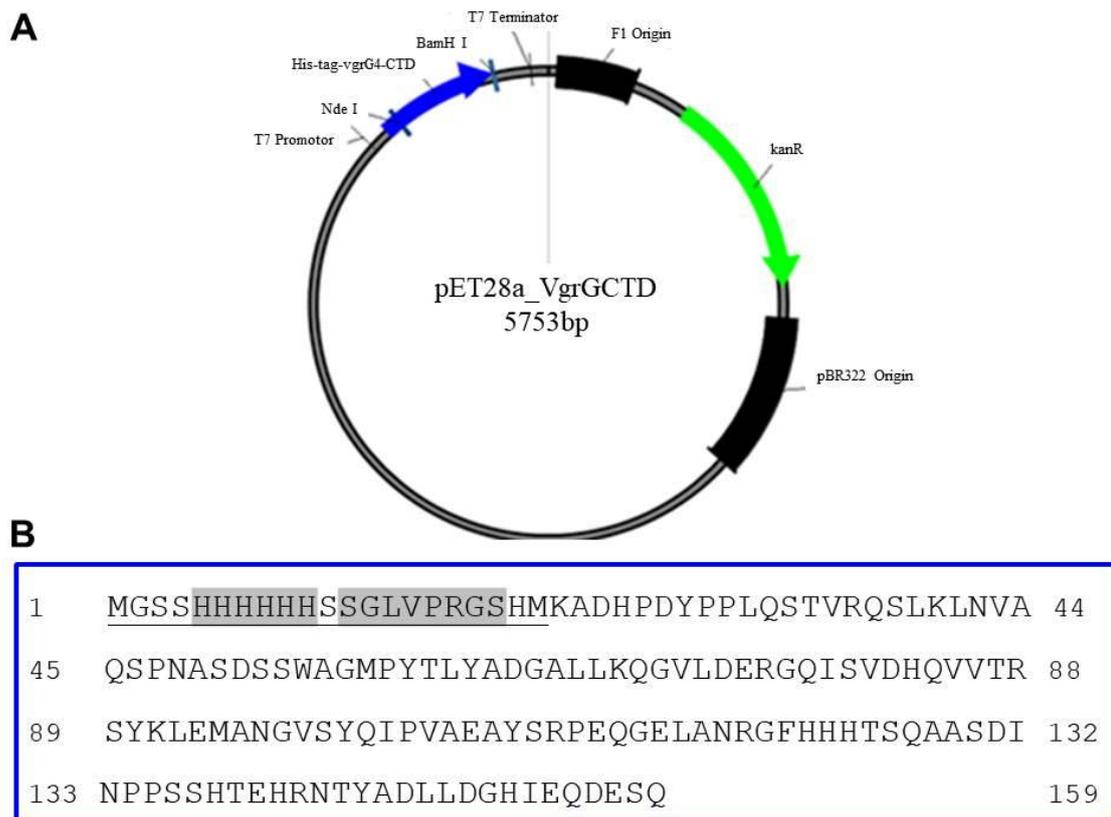
```

VgrG_4      MDTSSIITGTTLNRYQLDIE SCAASLDVZEFSGAEKLSL LYYTITFTSABKNIDAAQLL
VgrG_1      ---M-DVQNPDSHSHALKIRGLSSGVDVLSFEGKEQLSAPFRYDIQFTS SDFK IAPESVL
VgrG_2.3    MBSII-KSLFBSHLLTWRGCSALLOVLSFEGEALSEPPRYVIEFTSADKTIHQEQLM
          .: : * : . : : ** . * * * * : * * * * : * * . : *
VgrG_4      SKPAMLTMGGGALQ- ---QLADCKRVHGVITTFRRVNR SDOQSTYQITLQEP LSLDQK
VgrG_1      MQDQAFSLTAE PVQG-- IETQTELR TLYGVITGF KQLSS SROZARYEVRLEERLALLSRS
VgrG_2.3    MQDATP TLQAPADQGFGINIQQEVR TIQGVVTAPE RRLSA SROETHYSLT LQERLALLSRS
          . : . : . : * : : : ** : * * . : . : * . : * : * * : * * . :
VgrG_4      FRSHRF PVNKS VEEVVEQVLQESH- LHDWEYEFNLKQHYPRRQINQYQESDLAFIQRL
VgrG_1      H-QMAIYQNT VPQI VZKILRERHMRGQDFVFNKSDYVPRBQVMQYD EDDLTFISRL
VgrG_2.3    H-QMRIYQDMS VEDI VZHILRTRHAMRGEFVFT LAQAYPRRQVMQYGEDDLRFITRLL
          . : : : : * * : * * : * : : : * . * . * * * * : * * * * * * * *
VgrG_4      AEVGIFYPFTLQEEAQSEVVFHADAQRALMFDKTLQVNSPESGMSDSGAE SIWGLSITHNV
VgrG_1      SEVGIWFRPST DARL KIGVI EPYDDQSEYERGLT LPLRHPESGMSDSGTEAVWGLMTAY SV
VgrG_2.3    GEVGIWFRPSTADRLNIDVVEPYDDQRHYEQGLVLE SVESGQHDGGTE SVWALKSQHN
          . * * * : * : . : * : * * * . . * * * * * * * * : * * : * * . : *
VgrG_4      VEANVTTRDYNPRDAQSVLQSATADMTRGNSEGI TYGSEVYHYKLRHRERGDK- IEEQTE
VgrG_1      VRSVTRDYNPRDAMAZMTTGQFDVTE-- GDNTYGEAYHYADNFKLTKGDK- ---ATPE
VgrG_2.3    VQDSVTRDYNPRDAPESMSQ- SADVTS-- GDVTYGEAYHWADNVLASGSDGQRNPEE
          * . * * * * * * * : * : * * * : * * * * : * * * * * : * * * *
VgrG_4      TANFYARLDHREPLAHQTLITASSTAAWLAPAQVLTVD SLESTLPAAPVQDELITGTGF
VgrG_1      SGAPYARIRHE RYLNGRALLKQST SLLDMEGLEIKKVEG-N-- DAPVFRKGI LITGT TA
VgrG_2.3    SGAPYARLRHE RYLNDQTRL SGRTS BAALAPGRELKVTTGGA-- EVTEVFRQGVITGHS
          . : * * * * : * * * * : . : . : . : * . : * . : . : . : * * *
VgrG_4      TASRREALRVSLLAVPYSETLCWRPELLERSEKVTGTMTARVTSKANDIYAWQDASGLYR
VgrG_1      SAARDRBYELTPTAI PYSERYGYREPLIRREVMAGTLEARVTS TANDVYAHIDKGRYR
VgrG_2.3    RAARDRBYEVAFTAI PFSNYGFRPEQGDREVMAGTLEARVTS TKNFDIYGHIDRGRYK
          * * . : . : * : * * * : * * * * : * * * * * : * * * * : * * * *
VgrG_4      VKPDADRDEKGGQGE SMDVRLAKPYGGDVGPHFELIQGTEVAIAPHEGDEDRPYIAHAL
VgrG_1      VNLDFDRDTHKGGPE SLWVRQSRPYAGDTYGLHLELLAGTEVSIAPEDGNEDRPYIAGVK
VgrG_2.3    VNLDFDRDHWSEGE SLWVRQAREYAGDTYGLHLELLAGTEVAIAPHEGDEDRPYIAGVL
          * : : * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * *
VgrG_4      HDRRHVDPVTEKNSTRNVIRTPANNKLRME DKRGSEHIKLS TDYGGKTLNMLGHNVAQR
VgrG_1      HDBAHTDHTI QNYKRNVRTPANNKIRLDDERGKEHIKVSTYGGKSQLNLGHLVDAGK
VgrG_2.3    HDBAHTDHTI RNYKRNVRTPANNKIRLDDARGKEHIKVSTYGGKSQLNLGHLVDSEK
          * * * * * * * * : * . * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * *
VgrG_4      ELRGEPELRTDKWGAIRAGKGFITADKQSTASGKILAMQDTLDRLKQAGDEMD SLSRD
VgrG_1      QQRGSEPELRTDMWGAIRAKKGVFI BADAQSKAQGGVLDMDQAAITQLENALSIKSLBQA
VgrG_2.3    QERGSEPELRTDSYGTIRAGKGFITADAQSKAQGGVLDMDQAAI SRSALVEMQSLAAS
          : * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * *
VgrG_4      AQSAAKAPAEVQQLAPMRE QIDQLREAVA VLSAEMGVALASGKHLQL- TARRNLMLNAG
VgrG_1      AEVAKAHGADLDGHTS- LINGALSELVKAGI VLSAPEGVIVSPPQGVRLGSGES SIGLMAG
VgrG_2.3    AQQAAALAADVGRQQTLLQKIDQLQKEVLEGTAEQGVVALASGDDMLL- BAQENLTLIAG
          * : * * * * : . : . : . : * * : . : : * * * * * : * * * * * : * *
VgrG_4      ADADMGVMKRLFIGVGGESLFPVRKLGKMLIANQGPVAIQAQNDQLQLLARKELEIVST
VgrG_1      TNIDAGAMEKVTVBAGDAVSPARKGGIKLYANQKVEVEAQNE RNRILTBRHGKISSTE
VgrG_2.3    QQLDMGAQKDFTLAAGKQLSLWSON-GAKWFA SRGDIDIQAGGHTTTWSTQDTHISSBK
          : * * . : . . * . * * : : * * * * : : * * . : : * * . : * * .
VgrG_4      SEIHIVAKKKI IINAGSBIYI TLOEYRIELGTGGD VDVKAADF SYSGEASMKADHEDYRPL
VgrG_1      DVVEIEAEKELVKCGKAYIRLSEGGVVEVGGKNNLLK SANVKMBAKLEPVEMLVLEPK
VgrG_2.3    -KLVIQAQDELTLICGGGIYIKIKGNVEIGGPKLLIKNTGIKKAGSGSMQGVKSP-ES
          : * * : : : * . * * . : . : * * : : * * . : . : . : . : . :
VgrG_4      QSTVRQSLKLNVAQSENAQDSSWAGMEYTLYADGALLKQGVLDERGGQISVDHQVVTBSYK
VgrG_1      GNYD--L SLDL--R-DWDGIEIGGAKYTIAPESGAVLSGMLDDKGYALHTN- VLPEEAT
VgrG_2.3    GSPD--EKPII--RNSLTKSELANKAYSITMDGRIVSGVTDLNGSTSLNASDVIDDMT
          . : : : . : . : * : : . : . : * : * . : . : . : . : . :
VgrG_4      LEMANGVBYQIEVAEA-----YRRE---EQGELANRGEFHHTSQAASDINPESSHTEHR
VgrG_1      VEY-----EPPEPEPKSEWDEYSSLLASVDAELGADGQGA-----
VgrG_2.3    ITL-----I--KGR-----
          :
VgrG_4      NTYADLLDGHIEQDESEQ
VgrG_1      -----
VgrG_2.3    -----

```

**Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das VgrGs 1, 2/3 e 4 presentes no genoma de *K. pneumoniae* Kp52.145.** A região destacada em amarelo representa a região C-terminal da VgrG4 de *K. pneumoniae* denominada VgrG4-CTD. Alinhamento feito através do Clustal Omega. O símbolo asterisco (\*) indica as posições conservadas onde se observa o mesmo aminoácido em todas as sequências alinhadas; dois pontos (:) indicam posições que contêm uma substituição fortemente conservada; e um ponto (.) indica substituição fracamente conservada.

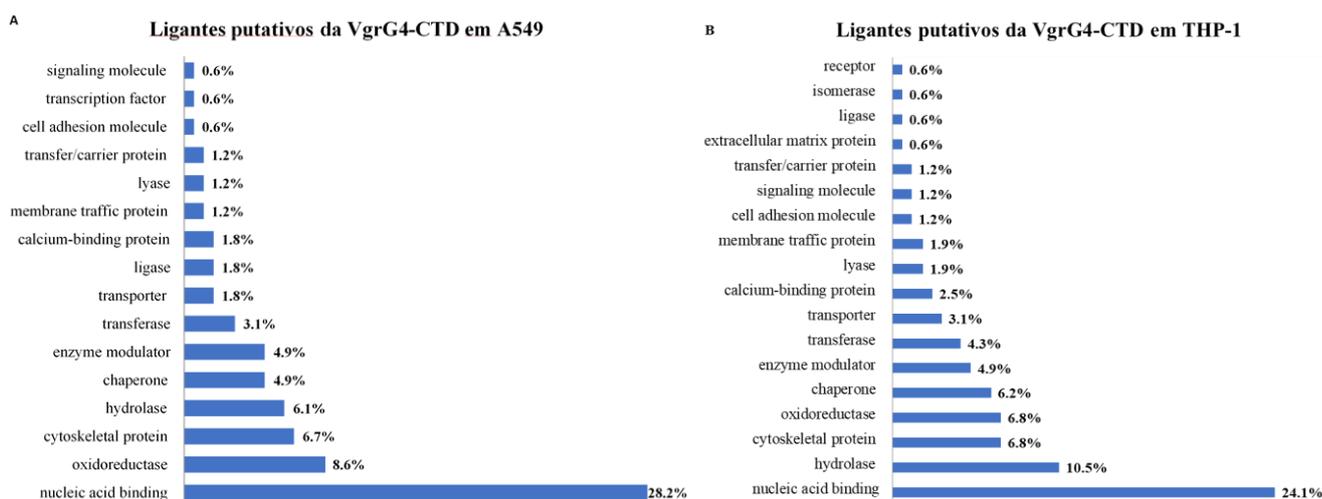
Em um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo em colaboração com a Dra. Gisele Cardoso Amorim da UFRJ, expressamos e purificamos a proteína recombinante VgrG4-CTD. A região gênica que codifica a extensão C-terminal da VgrG4 de 138 aminoácidos foi clonada no plasmídeo pET28a (Figura 5A), resultando na expressão da proteína VgrG4-CTD contendo no seu N-terminal uma cauda de 6 histidinas e um sítio de clivagem reconhecido pela enzima trombina (Figura 5B). A clivagem da cauda de histidina leva a uma instabilidade da proteína. Assim, utilizamos a proteína com a cauda para os experimentos realizados. Usando esta proteína recombinante, foram identificadas proteínas de células do hospedeiro que seriam possíveis parceiros de interação através de experimentos de co-precipitação (153).



**Figura 5: Proteína VgrG4-CTD recombinante.** A) Representação esquemática do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína recombinante. B) Sequência primária da proteína recombinante de VgrG4-CTD. Cauda de 6 histidinas e sítio de reconhecimento para enzima trombina sublinhado.

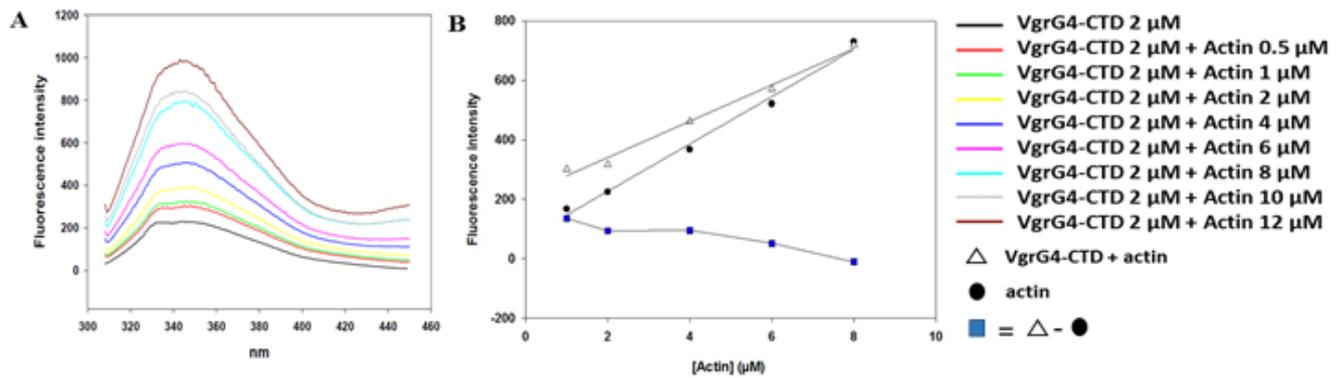
Dentre essas proteínas, nos chamou a atenção a detecção de proteínas relacionadas ao citoesqueleto, como actina, alfa e beta-tubulina, miosina, citoqueratina e vimentina. Essas proteínas pertencem aos microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, estando de alguma maneira conectados dentro das células (Figura 6). Sendo assim, essa identificação sugere que a VgrG4-CTD poderia modular o citoesqueleto do hospedeiro em prol da infecção

bacteriana (153). Já foi demonstrado que proteínas VgrG de *E. coli*, *B. cenocepacia*, *V. cholerae* e *A. hydrophila* interagem com actina com o intuito de modular o citoesqueleto facilitando a sobrevivência e/ou escape frente à resposta imune do hospedeiro (154–157). Curiosamente, nossos dados também mostraram que a VgrG4-CTD possivelmente pode se ligar a hidrolases e transferases, como a serina-treonina fosfatase 2A, que é o principal regulador da atividade dos microtúbulos e desempenha um papel essencial no controle da divisão celular (158,159). A identificação desta proteína é consistente com a identificação de outras proteínas do microtúbulo, o que reforça que a VgrG4-CTD pode ter como alvo esse filamento.



**Figura 6:** Caracterização das 246 proteínas identificadas a partir dos extratos proteicos de A549 (6A) e THP-1 (6B) de acordo com o *Gene Ontology*.

Paralelamente a esse trabalho de identificação de possíveis parceiros de interação da VgrG4-CTD realizado pelo nosso grupo, a Dr. Gisele Amorim e a B.Sc. Verônica Valadares, no Laboratório NUMPEX-Bio na Universidade Federal do Rio de Janeiro obtiveram resultados de interação direta entre a VgrG4-CTD e actina através da técnica de espectroscopia de fluorescência, onde é possível monitorar a exposição de um triptofano da amostra, mediante variações no seu ambiente químico. Neste experimento, nossas colaboradoras observaram que concentrações crescentes de VgrG4-CTD suprimem linearmente a fluorescência da actina (Figura 7), sugerindo que há uma interação entre as proteínas (160).



**Figura 7: Análise da interação da VgrG CTD com actina através de espectroscopia de fluorescência.** A) Espectro de fluorescência da amostra de VgrG CTD em função de crescentes concentrações de actina. B) Gráfico das intensidades dos picos de emissão de fluorescência da VgrG CTD na presença de actina. Triângulo branco representa a intensidade dos picos de emissão de fluorescência da VgrG CTD na presença de crescentes concentrações de actina; círculo preto representa a intensidade dos picos de emissão de fluorescência de crescentes concentrações de actina; e quadrado azul representa a subtração dos valores da intensidade de emissão dos picos de VgrG CTD pelos de actina pura, para se verificar a supressão da emissão. Reproduzida de 155.

Adicionalmente, proteínas com função de redução-oxidação como a peroxiredoxina, e subunidades de L-lactato desidrogenase e proteínas mitocondriais como flavoproteína, peróxido redutase dependente de tioredoxina e succinato desidrogenase também foram identificadas. É bem conhecido que células hospedeiras desenvolvem respostas metabólicas a infecções bacterianas e essas alterações metabólicas visam ajudar o hospedeiro a eliminar o patógeno. Uma dessas estratégias é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (161). Portanto, os possíveis ligantes de VgrG4-CTD relacionados aos processos de redução e oxidação levantaram a hipótese que *K. pneumoniae* pode usar o T6SS para restaurar a homeostase e resistir ao estresse oxidativo durante a interação com células hospedeiras.

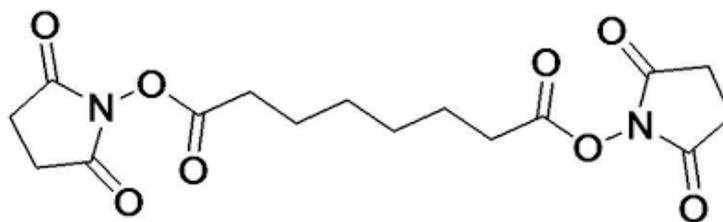
### 1.3. XL-MS

Ligações cruzadas (XL ou *crosslinkings*) de proteínas referem-se à formação de complexos moleculares usando um reagente que tenha afinidade por determinados grupamentos químicos e um tamanho definido, fazendo com que aminoácidos distantes espacialmente fiquem covalentemente ligados. Por um lado, essas ligações podem ser formadas entre aminoácidos de cadeias polipeptídicas distintas (XL entre subunidades), mas que estejam próximas no espaço tridimensional, possibilitando o mapeamento de proteínas que interagem entre si e identificação das interfaces de interação. Por outro lado, essas ligações podem ser formadas entre aminoácidos de uma mesma cadeia polipeptídica, desde

que estejam espacialmente próximos mesmo se distantes na sequência (XL intramoleculares), possibilitando a inferência de aspectos referentes à estrutura tridimensional e enovelamento da proteína. Ainda, podem ser formadas ligações terminais (*dead-end links*), que correspondem a peptídeos modificados pelo agente da ligação cruzada em apenas uma de suas extremidades - não sendo tão informativos quanto os demais XL.

Diferentes tipos de agentes de XL podem ser usados para ligações cruzadas em proteínas. Esses reagentes são moléculas que possuem duas extremidades reativas e uma região espaçadora, que define a distância máxima entre os aminoácidos que serão ligados, ou seja, um aspecto fundamental para interpretação dos dados. Essa região espaçadora funciona como uma régua molecular. Quanto maior seu tamanho, aminoácidos espacialmente mais distantes poderão ser ligados entre si, porém maior será a heterogeneidade de distância entre as ligações detectadas. Quanto menor essa região espaçadora, menos XL serão detectados e menor a distância máxima entre os aminoácidos com ligação cruzada. Assim, dependendo do objetivo do experimento e das proteínas que se pretende estudar (em especial a quantidade de grupos reativos em cada uma delas), deve-se escolher um ou outro agente de XL disponível.

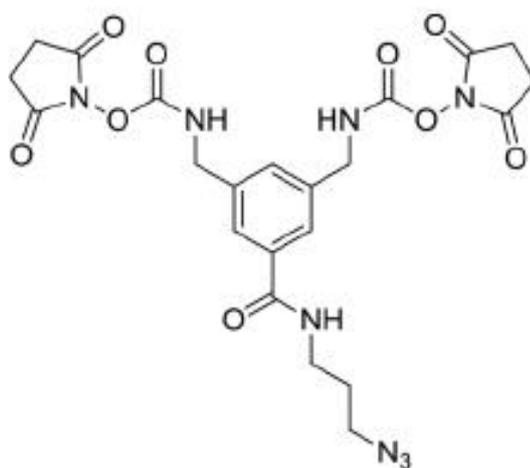
Um dos reagentes mais utilizados é o suberato de disuccinimidil (DSS) (Figura 8), que é um agente bifuncional com capacidade de reagir com aminas primárias nas cadeias laterais dos resíduos de lisina (K) e no N-terminal de cada polipeptídeo - sendo estes os alvos potenciais disponíveis para os reagentes de *crosslinker* do éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Uma desvantagem do DSS é não ser solúvel em água, o que pode ser uma limitação dependendo do tipo de amostra a ser analisada.



**Figura 8: Estrutura química do reagente de *crosslinker* DSS.**

Recentemente, têm sido desenvolvidos outros reagentes de XL, tanto reagentes que sejam reativos com cadeias laterais de mais aminoácidos - possibilitando mapear regiões

onde não se encontram lisinas - quanto que possuem grupamentos funcionais que permitem o enriquecimento de peptídeos com XL em amostras complexas. Esse é o caso, por exemplo, do reagente NNP9 (Figura 9), um reagente trifuncional que foi usado para caracterizar com alta intensidade a interface de interação entre a proteína Hsc70 e a proteína  $\alpha$ -sinucleína, sem usar nenhuma estratégia de enriquecimento específica (162). Esse *crosslinker* é baseado na reatividade dos grupos NHS-carbamato, que são mais estáveis em soluções aquosas, o que proporciona uma melhor eficiência na reação de *crosslinking*. O NNP9 também tem um grupamento azido “clivável”, que permite o enriquecimento por afinidade dos peptídeos que apresentam *crosslinkings*.



**Figura 9: Estrutura química do reagente de *crosslinker* NNP9.**

Independente do reagente utilizado, existem diferentes formas de avaliar a reação cruzada e a formação de complexos. Técnicas como a eletroforese em gel de poliacrilamida e a cromatografia líquida por exclusão de tamanho podem ser usadas para separar componentes de massa molecular distintas - assim identificando se um complexo foi formado. Em paralelo, a amostra reagida é digerida com uma protease e analisada por espectrometria de massas (MS), que consegue identificar quais peptídeos contém ligações cruzadas e a quais peptídeos estão ligados. Após a obtenção dos dados, é necessário construir um modelo tridimensional do complexo e utilizar as restrições de distância obtidas para sua modelagem.

#### **1.4. JUSTIFICATIVA**

A partir do exposto até aqui sobre a importância de se estudar a *K. pneumoniae* por ser uma espécie que apresenta altos níveis de resistência a antibióticos, o T6SS por ser um potencial fator de virulência no percurso da infecção mediada por *K. pneumoniae* secretando possíveis efetores tóxicos no interior da célula alvo, a justificativa deste trabalho tem como base usar técnicas diversas e complementares visando a melhor caracterização deste sistema e seus efetores de forma a contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o papel da proteína VgrG4 de *Klebsiella pneumoniae* na patogênese bacteriana, principalmente em relação a sua interação com proteínas do citoesqueleto de células hospedeiras e seu papel como carreadora de efetores.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Confirmar a interação da proteína recombinante VgrG4-CTD com proteínas do citoesqueleto de células eucarióticas.
- Definir se a interação entre a VgrG4-CTD e a actina é direta ou indireta.
- Avaliar se a VgrG4-CTD é capaz de induzir o remodelamento do citoesqueleto de células hospedeiras.
- Verificar o envolvimento da VgrG4-CTD/T6SS de *K. pneumoniae* na fagocitose bacteriana.
- Determinar se VgrG4-CTD é capaz de carrear outras proteínas para translocação pelo T6SS.

### 3. METODOLOGIA

Para atingir os objetivos propostos acima o projeto foi dividido em 3 partes. A primeira parte foi destinada a confirmar e caracterizar a interação da VgrG4-CTD com as proteínas do citoesqueleto através de técnicas como imunomarcagem, co-purificação e XL-MS. A segunda parte teve como foco avaliar o efeito da proteína VgrG4-CTD no fenótipo de células eucarióticas por citometria de fluxo e imunofluorescência. E por último, a terceira parte do projeto visou determinar através de experimentos de co-precipitação seguidos de espectrometria de massas (MS) se a proteína VgrG4-CTD era capaz de interagir com outras proteínas bacterianas, eventualmente carregando-as para translocação pelo T6SS (Figura 10).

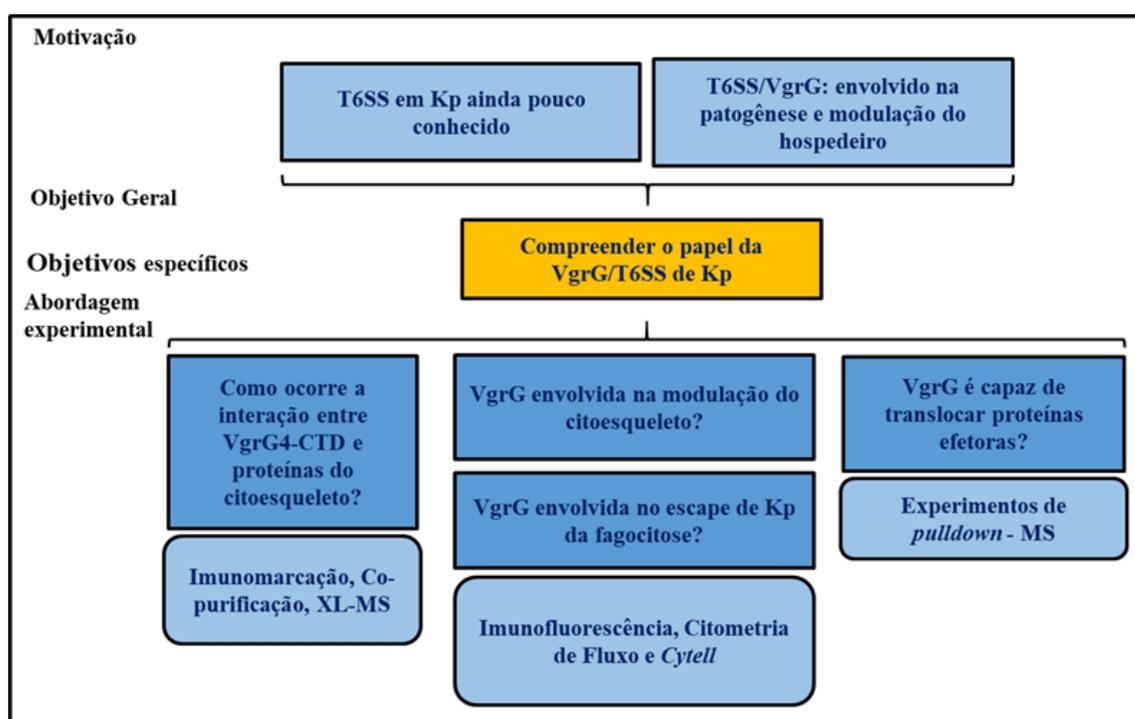


Figura 10: Esquema geral da lógica e abordagem metodológica utilizadas durante o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

A proteína VgrG4-CTD recombinante utilizada neste trabalho foi expressa e purificada em colaboração com a Profa. Dra. Gisele Cardoso Amorim, do laboratório NUMPEX-Bio da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Polo Duque de Caxias - de acordo com as informações citadas na introdução desta dissertação e métodos descritos no trabalho de conclusão de curso de Verônica Valadares (160).

### 3.1. Cultivo de THP-1 e obtenção de extratos proteicos:

Neste estudo foram utilizados extratos proteicos de macrófagos THP-1. As células de THP-1 foram mantidas e crescidas em meio RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium* - (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% SFB (Cripion) em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Para a diferenciação dos monócitos em macrófagos, as células foram tratadas com PMA 80 mM por 24 horas. Os extratos proteicos de THP-1 foram obtidos seguindo o protocolo do *ProteoExtract (R) Transmembrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem). Tal protocolo permite a extração proteica em duas frações, uma fração de proteínas solúveis e uma fração enriquecida em proteínas de membrana. A extração de proteínas foi realizada em triplicatas biológicas (culturas independentes).

### 3.2. Análise da interação da VgrG4-CTD com proteínas do citoesqueleto:

Para verificar a capacidade da proteína recombinante VgrG4-CTD de se ligar a proteínas do citoesqueleto, 50 µL de uma solução a 1 µg/mL da proteína VgrG4-CTD diluída em tampão carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6 foram adicionados por poço de uma placa de 96 poços tratada para alta ligação de proteínas a 4°C, por aproximadamente 16 horas. Após esse período os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de Tampão Fosfato Salino (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 e os sítios vazios foram bloqueados com 5% de albumina (BSA: *Bovine serum albumin* – Inlab Confiança) diluída em PBS, a 4°C, por 1 hora. Os poços foram lavados novamente, 3 vezes, com 200 µL de PBS contendo 0,05% de Tween-20 e em seguida incubados com 100 µL do extrato proteico de macrófagos THP-1 diluído 1:50 em tampão carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, a 4°C, por 3 horas. Alternativamente, nesta etapa foram usadas as concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL do extrato proteico de THP-1 a 4°C, por 3 horas. Os poços foram lavados novamente, por 3 vezes, com 200 µL de PBS contendo 0,05% de Tween-20 e incubados com os anticorpos anti-actina (Abcam), anti-vimentina (*Biocare Medical*), anti-citoqueratina (Santa Cruz *Biotechnology*) ou anti-tubulina (Santa Cruz *Biotechnology*) na diluição 1:300, a 4°C, por 1 hora. Os poços foram lavados novamente, 3 vezes, com 200 µL de PBS contendo 0,05% de Tween-20 e incubados com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase IgG de coelho anti-*mouse* da Bio-Rad (1:10.000), a 4°C, por 1 hora. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e foram utilizados 50 µL por poço. A atividade da peroxidase foi revelada com 50 µL do substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

(TMB) 0,004% por aproximadamente 30 min. A reação foi parada com a adição de 50  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 2,5 N. Os valores de absorbância a 450 nm foram lidos no leitor de microplacas (Eon Biotek). Como controles, foram avaliados poços que não receberam a VgrG4-CTD para cobrir o fundo do poço. Os dados plotados representam os valores de OD 450 nm obtidos para cada amostra experimental subtraída de seu respectivo controle (BSA).

### **3.3. Interação proteína-proteína por cromatografia de afinidade a Ni<sup>2+</sup>:**

Ensaio de interação entre actina e VgrG4-CTD foram realizados utilizando a resina *Niquel Sepharose Fast Flow* (Pharmacia). A resina foi lavada com cinco volumes de água, e então carregada com 2 volumes de 500 mM de NiCl<sub>2</sub>, lavada com 5 volumes de água e equilibrada com 5 volumes do tampão de reação (20 mM Tris pH 7,5 a 500 mM NaCl). 5  $\mu$ g de cada proteína foram misturados em 1 volume do tampão de reação. Em seguida, a mistura de proteínas foi adicionada na resina e incubada à temperatura ambiente. As reações foram centrifugadas para coletar a resina, o sobrenadante foi removido e analisado como fração “não ligada”. A resina foi lavada duas vezes com 5 volumes do tampão de reação Tris 20 mM NaCl 0,5 M pH 7,5. A suspensão foi centrifugada para coletar a resina e o sobrenadante foi removido e analisado como frações “lavagem 1” e “lavagem 2”. Proteínas ligadas à resina foram eluídas com o tampão de reação suplementado Tris 20 mM NaCl 0,5 M Ureia 6 M pH 7,5 suplementado com 250 mM de imidazol. A suspensão foi centrifugada a 1000 x g por 1 minuto para coletar a resina e o sobrenadante foi removido e analisado como fração “ligada”. Todas as frações (não ligada, lavagem 1, lavagem 2 e ligada) foram analisadas por SDS-PAGE 12,5% e coradas com *Coomassie brilliant blue R-250*.

### **3.4. Reação de interação com reagente de *crosslinker* DSS:**

O reagente de *crosslinker* DSS foi diluído em dimetilformamida (DMF) na concentração de 10 mg/mL. 1  $\mu$ L dessa solução foi adicionada à solução 2,5  $\mu$ g (reação 1) e 7,18  $\mu$ M (reação 2) de ambas proteínas VgrG4-CTD e actina (100x de excesso molar do DSS em relação à proteína). A reação foi feita em tampão de reação 2-(N-morfolino) ácido etanossulfônico (MES) pH 7 a 27°C por duas horas, com agitação. A amostra foi submetida a um gel SDS-PAGE 12,5%, por 2 horas a 100 V, 400 mA.

### 3.5. Cultivo celular:

As células utilizadas foram da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, da linhagem de células do epitélio pulmonar A549 e da linhagem de células de Schwann ST8814. As células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em meio contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Cripion Biotecnologia LTDA) e 10% de DMSO (Dimetil Sulfoxido – Sigma Aldrich) que tem papel crioprotetor. O descongelamento foi feito em banho maria a 37°C e, em seguida, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 4 mL de meio DMEM *High Glucose* (RAW 264.7), meio DMEM F12 (A549), meio RPMI 1640 (ST8814), suplementado com SFB inativado. Após centrifugação a 300 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de meio, 10 µL foram retirados e diluídos 1:1 em azul de tripan (Sigma-Aldrich) e foi feita a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Foram transferidas 10<sup>6</sup> células para uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) com 4 mL de meio DMEM *High Glucose*, DMEM F12, RPMI 1640 suplementado com 10% SFB. As culturas foram então mantidas em estufas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a utilização nos experimentos. Quando as células atingiram 70% de confluência foram repicadas ou plaqueadas para os experimentos descritos a seguir.

### 3.6. Crescimento bacteriano:

A cepa Kp52.145 selvagem foi mantida congeladas em meio LB - Luria Bertani (KASVI) - com 10% de glicerol em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, foi realizada a raspagem de uma pequena quantidade do conteúdo do criotubo com o auxílio de uma alça estéril. Os cristais contendo bactérias foram depositados em tubos contendo meio LB e a cultura foi mantida no agitador a 400 x g, 37°C, *overnight*. As bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB ágar e mantidas em estufa a 37°C, *overnight*. As placas contendo colônias bacterianas foram mantidas a 4°C por cerca de dois meses.

Em um tubo cônico contendo 5 mL de meio LB (KASVI), foi inoculada uma colônia isolada da cepa Kp52.145 de *K. pneumoniae* com auxílio de uma alça estéril. O tubo foi vortexado por 5 segundos e a cultura bacteriana foi mantida no agitador a 180 RPM, 37°C, *overnight*. Após esse período a cultura foi repicada 1:100. A cultura repicada foi mantida no agitador a 400 x g, a 37°C, por cerca de 2 horas e a DO 600 nm foi lida a cada 30 minutos

até que atingisse um valor de próximo a 0,7. Nessa densidade a cultura tem cerca de  $8 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).

### **3.7. Estímulo com o reagente de entrega de proteína PULSin:**

PULSin é um reagente que possibilita a entrega de peptídeos, anticorpos e proteínas no interior de uma grande variedade de linhagens celulares eucarióticas. Através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, este reagente forma complexos com a molécula de interesse. O complexo proteína/reagente interage com a superfície celular por ligação aos proteoglicanos de sulfato de heparano (163). Os complexos são internalizados por endocitose e, então, o reagente catiônico anfifílico induz a fuga dos endossomas, seguido da desmontagem dos complexos. O mecanismo de entrega usando esses reagentes é semelhante ao da entrega de genes (164,165).

Devido a essa capacidade de entrega do reagente PULSin, este foi utilizado para entregar a proteína VgrG4-CTD de *K. pneumoniae* no interior das células das linhagens RAW 264.7 e A549. Essa entrega é feita em placas de 24 poços, onde as células são estimuladas por 4 horas com 1  $\mu$ g da proteína VgrG4-CTD e 1  $\mu$ g da proteína *R-Phycoerythrin* (R-PE) (controle positivo da entrega feita pelo PULSin) e 4  $\mu$ L do reagente de entrega PULSin. Após o período de estímulo, as células são infectadas ou não com *K. pneumoniae* (MOI 50:1) por uma hora e, então, processadas para análise da alteração morfológica e da alteração da taxa de internalização bacteriana.

### **3.8. Conjugação da proteína VgrG4-CTD a um *crosslinker* e a um fluoróforo:**

Para encontrar a melhor condição de ligação entre a proteína VgrG4-CTD, o *crosslinker* D1P3 e o corante 6-carboxifluoresceína (6-FAM), alguns testes foram realizados. As condições testadas variaram desde a concentração da proteína (1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g e 10  $\mu$ g), variação da ordem de incubação dos componentes do complexo (VgrG4-CTD+6-FAM+D1P3; VgrG4-CTD+D1P3+6-FAM), da exposição ou não à luz ultravioleta por 10 minutos e da centrifugação ou não do complexo VgrG4-CTD+D1P3+6-FAM com filtro de 3 kDa para remoção do excesso do corante. A melhor condição encontrada foi usando 1  $\mu$ g de proteína seguida da incubação com o *crosslinker* D1P3 e consequente incubação com o corante 6-FAM, e, por último, centrifugação com filtro de 3 kDa para remoção do excesso

de corante. A eficiência da reação foi monitorada por gel SDS-PAGE seguido da leitura de fluorescência das bandas pelo *GE Healthcare Typhoon scanner*.

### **3.9. Análise da entrega do complexo VgrG4-CTD+D1P3+6-FAM através do PULSin em células A549 por microscopia de fluorescência:**

Para análise por imunofluorescência, as células A549 foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro em uma placa de 24 poços e foram mantidas em meio DMEM High Glucose com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período, as células foram estimuladas ou não por 4 horas com o reagente de entrega PULSin complexado à proteína, ao *crosslinker* e ao corante, VgrG4-CTD+D1P3+6-FAM. As células foram fixadas com paraformaldeído 4%. Os filamentos de actina foram marcados com Faloidina/Rodamina e o núcleo foi marcado com DAPI. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência através do Microscópio ZEISS ApoTome invertido.

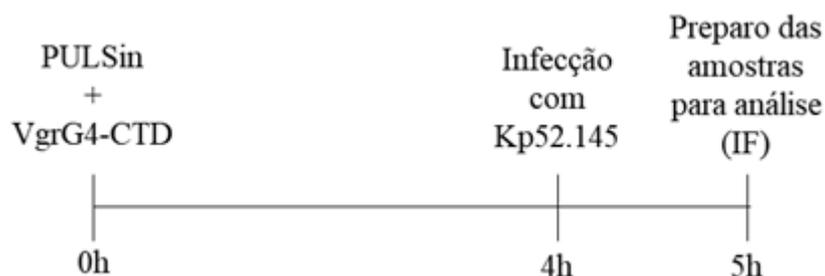
### **3.10. Análise da citotoxicidade do reagente PULSin nas células por ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo):**

Para análise da citotoxicidade do reagente PULSin, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e foram mantidas em meio DMEM High Glucose ou DMEM F12 com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período, as células foram estimuladas ou não por 4 e 16 horas com o reagente de entrega PULSin complexado à proteína VgrG4-CTD. 30% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle de morte celular. Após esse período, foram adicionados 10 µL da solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo (5 mg/mL) nos poços. A placa foi incubada em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, por 4 horas. Foram adicionados 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio) para solubilização dos cristais e em seguida foi realizada a leitura em um leitor de microplacas a 590 nm (Eon Biotek).

### **3.11. Análise de alteração da morfologia celular após estímulo com PULSin + VgrG4-CTD seguido de infecção com *K. pneumoniae* por imunofluorescência:**

Para análise por imunofluorescência, as células RAW 264.7 foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro em uma placa de 24 poços e foram mantidas em meio DMEM High

Glucose com 10% de SFB em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período, as células foram estimuladas ou não por 4 horas com o reagente de entrega PULSin complexado com a proteína VgrG4-CTD e infectadas ou não com *K. pneumoniae* corada com PKH 67 *Green Fluorescent* e incubadas por 1 hora na MOI 50:1. As células foram fixadas com paraformaldeído 4%. Os filamentos de actina foram marcados com Faloidina e o núcleo foi marcado com DAPI. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência através do Microscópio Colibri Zeiss Axio Observer (Figura 11).



**Figura 11: Representação temporal do estímulo com a proteína VgrG4-CTD e infecção com Kp52.145.** Após estímulo e infecção foi realizada a análise por imunofluorescência.

### **3.12. Análise da taxa de internalização bacteriana após tratamento com Citocalasina D por citometria de fluxo:**

Para análise por citometria de fluxo, as células RAW 264.7 foram plaqueadas em uma placa de 48 poços e foram mantidas em meio DMEM High Glucose com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, por 4 horas. Após esse período, as células foram tratadas ou não com Citocalasina D (inibidor da polimerização da actina) e infectadas ou não com *K. pneumoniae* por 1 hora na MOI 50:1. A bactéria foi corada com PKH26 *red fluorescent*. As células foram raspadas, coletadas e passadas para um microtubo, centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos, ressuspensas em PBS 1x contendo 2% de Soro Fetal Bovino, novamente centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos e fixadas em paraformaldeído 4%. As células foram analisadas através do Citômetro BD Accuri C6.

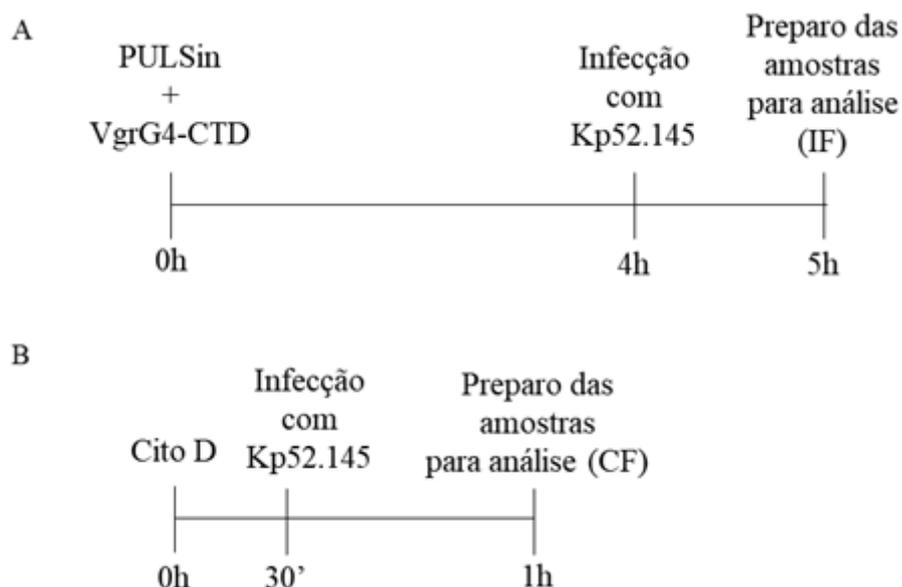
### **3.13. Análise do papel da proteína VgrG4-CTD na internalização bacteriana por citometria de fluxo:**

Para análise por citometria de fluxo, as células RAW 264.7 foram plaqueadas em uma placa de 24 poços e foram mantidas em meio DMEM High Glucose com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período, as células foram

estimuladas ou não com a proteína VgrG4-CTD complexada ao reagente de entrega PULSin por 4 horas e infectadas ou não com *K. pneumoniae* por 1 hora na MOI 50:1. A bactéria foi corada com PKH26 *red fluorescent*. As células foram raspadas, coletadas e passadas para um microtubo, centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos, ressuspensas em PBS 1x contendo 2% de Soro Fetal Bovino, novamente centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos e fixadas em paraformaldeído 4%. As células foram analisadas através do Citômetro BD Accuri C6.

### **3.14. Análise da taxa de internalização bacteriana após estímulo com PULSin + VgrG4-CTD e tratamento com Citocalasina D por citometria de fluxo:**

Para análise por citometria de fluxo, células A549 foram plaqueadas em uma placa de 24 poços e foram mantidas em meio DMEM F12 com 10% de Soro Fetal Bovino em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período, as células foram estimuladas ou não por 4 horas com o reagente de entrega PULSin complexado à proteína VgrG4-CTD. Paralelamente, as células foram tratadas ou não com Citocalasina D (5 µg/mL) por 30 minutos e infectadas ou não com *K. pneumoniae* por 1 hora na MOI 50:1. A bactéria foi corada com PKH26 *red fluorescent*. As células foram coletadas e passadas para um microtubo, centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos, ressuspensas em PBS 1x contendo 2% de Soro Fetal Bovino, novamente centrifugadas a uma velocidade de 400 x g por 5 minutos e ressuspensas em paraformaldeído 4%. Os dados foram adquiridos através do Citômetro *BD Biosciences FacsCalibur* e analisados no programa FlowJo X (Figura 12).



**Figura 12:** Representação temporal do estímulo com a proteína VgrG4-CTD, tratamento com citocalasina D e infecção com Kp52.145. Após estímulo, tratamento e infecção foi feita a análise por citometria de fluxo (A e B).

### 3.15. Análise do efeito da Citocalasina D em células ST 8814:

Para análise do efeito da Citocalasina D, células de *Schwann* ST 8814 foram plaqueadas em placas de 24 poços e foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, *overnight*. Após esse período as células foram tratadas com 1 µg, 2 µg e 5 µg/mL de Citocalasina D por 30 minutos. A despolimerização da actina foi observada no Microscópio Óptico Nikon Eclipse TS100.

### 3.16. Obtenção dos lisados proteicos de *K. pneumoniae* Kp52.145:

Para obtenção do extrato proteico bacteriano, 10 mL da cultura de *K. pneumoniae* Kp52.145 foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 200 µL de H<sub>2</sub>O e incubados por 20 minutos a 90°C. Essa amostra foi centrifugada novamente a 5000 x g à temperatura ambiente e o sobrenadante contendo o extrato proteico foi transferido para um novo microtubo. A quantificação proteica foi feita usando um fluorímetro Qubit®, de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies*).

### **3.17. *Beads* e revestimento com a proteína VgrG4-CTD:**

*Beads* de látex estéreis, na concentração de  $2 \times 10^{10}$ , de 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Sigma) foram utilizadas como “suporte” para a ligação da proteína VgrG4-CTD. As *beads* foram incubadas com 250  $\mu\text{g}$  da proteína VgrG4-CTD na presença de tampão MES 50 mM pH 6,1 seguida de incubação por 3 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação de 15 minutos a 5000 x g a 4°C. As *beads* foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de solução de glicina em MES 50 mM pH 6,1 por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação, para bloquear os sítios nas *beads* que não estavam recobertos pela proteína VgrG4-CTD. As *beads* foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 5000 x g à temperatura ambiente e utilizadas para os experimentos de co-precipitação. Alternativamente, como controle, foram preparadas “*beads* vazias” que passaram por todo o procedimento descrito acima, porém com a solução da proteína VgrG4-CTD substituída por tampão MES 50 mM pH 6,1.

### **3.18. Experimento de co-precipitação:**

Para identificação dos possíveis ligantes da VgrG4-CTD, cerca de  $1,4 \times 10^6$  *beads* recobertas ou não com a proteína VgrG4-CTD foram incubadas com 125  $\mu\text{g}$  do extrato proteico de *K. pneumoniae* Kp52.145 em tampão MES 50 mM pH 6,1. Os microtubos foram incubados por 3 horas sob agitação à temperatura ambiente e armazenados a 4°C, *overnight*. Após esse período, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 5000 x g à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS para remoção das proteínas que não se ligaram à proteína VgrG4-CTD, sendo coletadas por centrifugação por 15 minutos a 5000 x g à temperatura ambiente. As amostras foram processadas imediatamente como descrito abaixo.

### **3.19. Análise proteômica:**

A abordagem proteômica *bottom-up* foi utilizada para identificação dos ligantes da proteína VgrG4-CTD. As *beads* e as proteínas ligadas foram ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e a mistura foi aquecida por 10 minutos a 80°C para desnaturação proteica. Em seguida, as proteínas foram tratadas com Di-tio-tritol (DTT) 100 mM por 30 minutos

para redução das pontes de dissulfeto e, em seguida, com IodoAcetoAmida (IAA) 300 mM por 30 minutos sob proteção da luz à temperatura ambiente para alquilação das cisteínas. As proteínas foram digeridas com 0,2 mg/mL de tripsina *Trypsin Gold MS-grade* (Promega) a 37°C, *overnight*. Após esse período, foi adicionado 5% de ácido fórmico (AF) para interromper a ação da tripsina. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 x g, à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo os peptídeos solúveis foi coletado e seco no *Speed Vac System* (Thermo Savant's ISS110) por 50 minutos. Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e dessalinizados em ponteiros ziptip C18 (Millipore), de acordo com o protocolo do fabricante. Os peptídeos foram submetidos à secagem novamente no *Speed Vac System* (Thermo Savant's ISS110) por 20 minutos. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de acetonitrila (ACN) 3% + TFA 0,1%.

### **3.20. Espectrometria de Massas:**

Os peptídeos foram analisados em LC-MS/MS para atribuir sequências peptídicas únicas e realizar a identificação proteica na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Brasil. As amostras foram injetadas automaticamente no Sistema *Waters Nano Acquity* (*Waters*) e os peptídeos foram dessalinizados e separados ao longo de um gradiente de ACN 0-50% em uma coluna C18. O espectrômetro de massas ESI-Q-TOF (*Q-TOF Micro-Waters Corporation*) foi utilizado para aquisição dos dados. O controle do instrumento foi realizado no programa *MassLynx* (versão 4.1, *Waters*). Todos os dados foram processados usando o servidor *Protein Lynx Global* (versão 2.5, *Waters*), onde o valor de  $m/z$  de cada íon precursor (MS) e íon fragmento (MS/MS) foi determinado a partir de espectros de massas dos cromatogramas usando o sistema *Q-TOF LockSpray™* (*Waters, Milford, MA*).

### **3.21. Identificação de proteínas do extrato de *K. pneumoniae* que interagem com a VgrG4-CTD:**

A qualidade dos espectros de massa foi analisada manualmente no programa *MassLynx* (*Waters*), e a lista de massas foi gerada pelo programa *ProteinLynx Global Server* (*Waters*). Proteínas foram identificadas usando *MASCOT Server* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), considerando os seguintes parâmetros: Banco de dados: *SwissProt* versão Setembro de 2017;

Taxonomia: *Klebsiella pneumoniae* Kp52.145; Enzima: tripsina; Modificação fixa: carbamidometilação de cisteínas; Modificações variáveis: oxidação de metionina; Tolerância peptídica:  $\pm 0.2$ ; Tolerância do MS/MS:  $\pm 0.2$ ; Carga do peptídeo: +2, +3, +4; Formato do dado: *Micromass* (.PKL); Instrumento: ESI-QUAD-TOF. Categorização proteica foi realizada de acordo com o *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>) e *Panther* (<http://pantherdb.org>).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa identificou possíveis ligantes da proteína VgrG4-CTD de *K. pneumoniae* em extratos proteicos de células do epitélio pulmonar A549 e de monócitos diferenciados em macrófagos humanos (THP-1) por proteômica. Nesses experimentos, *beads* de látex foram recobertas com a VgrG4-CTD, os sítios vazios foram bloqueados com solução de glicina 200 mM e incubadas com os extratos proteicos das células eucarióticas. As proteínas não ligadas foram lavadas. Os ligantes diretos e indiretos da VgrG4-CTD foram digeridos com tripsina e os peptídeos identificados por MS. Foram identificadas 254 proteínas de citoesqueleto em células THP1 e A549 como possíveis ligantes da proteína VgrG4-CTD. Dentre os possíveis ligantes, proteínas relacionadas ao citoesqueleto e proteínas relacionadas aos processos de redução e oxidação foram identificadas, levantando hipóteses sobre o possível papel da VgrG4-CTD (153). Neste trabalho, apresentamos validações dessas interações visando melhor compreender o envolvimento desta proteína na patogênese bacteriana.

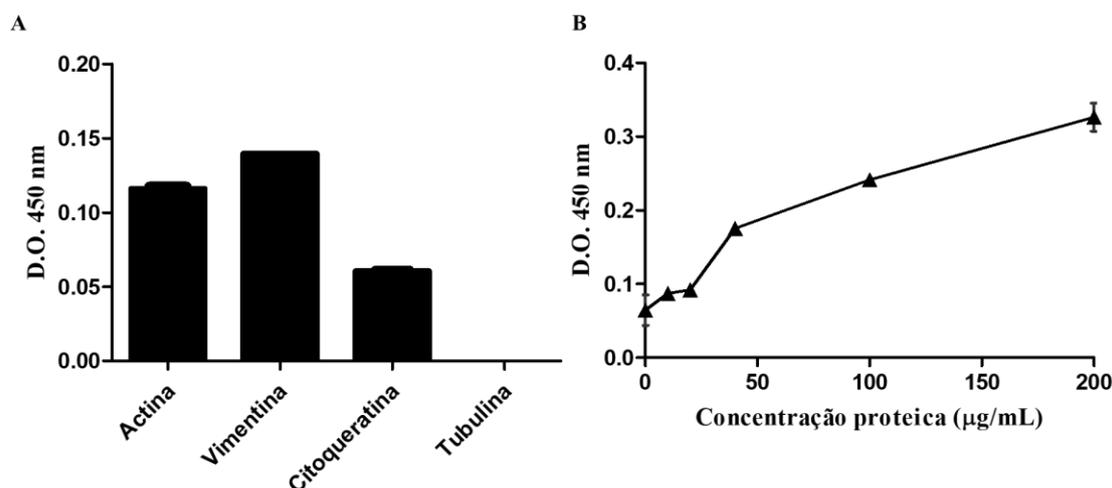
##### **4.1. Interação entre VgrG4-CTD e proteínas do citoesqueleto:**

###### **4.1.1. VgrG4-CTD é capaz de se ligar à actina, vimentina e citoqueratina:**

Para validar os dados obtidos nos experimentos de co-precipitação, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína em microplacas, onde a proteína VgrG4-CTD recombinante foi utilizada para revestir os poços, que foram subsequentemente incubados com extratos proteicos obtidos de células A549 e THP-1. As proteínas não ligadas foram removidas por lavagens e as proteínas ligadas foram detectadas pela incubação com anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse e anticorpos secundários conjugados à peroxidase. De certa forma, esse ensaio é parecido com o experimento de co-precipitação-MS feito anteriormente. Contudo, há duas principais diferenças que o justificam: I - o uso de outro método de detecção (imunomarcação), que pode corroborar os dados prévios; II - neste experimento foi possível realizar a etapa de bloqueio dos sítios vazios com a proteína BSA, minimizando a chance de detectar ligantes inespecíficos. Apesar da utilização de BSA ser um dos métodos mais usados e eficientes para bloqueio de sítios vazios e ligações inespecíficas, para a detecção dos ligantes por MS não é possível sua utilização, pois seus peptídeos apresentariam sinais tão altos que inibiriam os sinais dos

peptídeos biologicamente relevantes no experimento. Assim, nos experimentos de co-precipitação-MS utilizamos glicina como agente de bloqueio.

Usando esta abordagem, testamos a interação entre VgrG4-CTD e 4 proteínas que estavam na lista de proteínas identificadas por MS: actina, vimentina, citoqueratina e tubulina. Actina, vimentina e citoqueratina foram detectadas ligadas a VgrG4-CTD, conforme descrito na sessão de metodologia (Figura 13). Os resultados obtidos confirmam que a VgrG4-CTD possivelmente interage com três das quatro proteínas analisadas (Figura 13A). Em seguida testamos se essa interação com vimentina ocorria de maneira concentração-dependente do extrato proteico adicionado aos poços (Figura 13B). Nesse caso, o experimento foi realizado recobrando os poços com VgrG4-CTD, e em seguida adicionando 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g}$  do extrato de células THP-1. Interessantemente, a detecção de vimentina foi linearmente proporcional à quantidade de extrato de proteína adicionado ao poço, e bastante intensa, o que indica uma interação específica.



**Figura 13: VrgG4-CTD interage com proteínas do citoesqueleto.** VgrG4-CTD foi adsorvida em poços de microplacas. Sítios vazios foram bloqueados com BSA. Extratos proteicos de THP-1 foram incubados como fonte de ligantes. Proteínas não ligadas foram lavadas. Anticorpos primários para actina, vimentina, citoqueratina e tubulina foram usados para detecção das proteínas ligadas a VgrG4-CTD. Anticorpo secundário conjugado à peroxidase e o substrato TMB foram adicionados. Como controle, os poços não foram incubados com a proteína VgrG4-CTD. Os valores apresentados são uma subtração da ligação das proteínas testadas em comparação com o seu respectivo controle feito com BSA. Valores foram obtidos a 450 nm. Dados representam dois experimentos realizados em duplicata biológica (n=2).

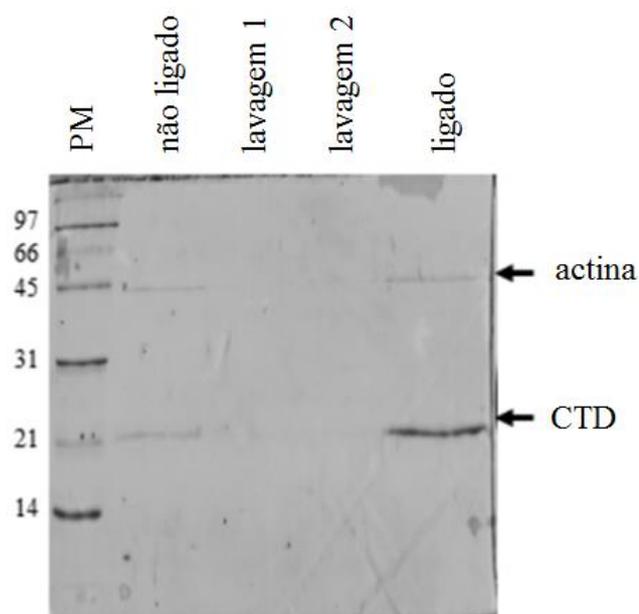
Sabe-se que a vimentina é uma proteína filamentosa intermediária, atuando na forma e integridade celular, mas também envolvida na ancoragem e tráfico de organelas intracelulares. Curiosamente, ela é encontrada tanto na superfície celular quanto no citoplasma (166). Componentes bacterianos de espécies como *E. coli* se ligam à vimentina

na membrana eucariótica, disparando vias de sinalização que modulam o NF- $\kappa$ B e a resposta imune frente à infecção (167,168). Por outro lado, patógenos como *S. enterica* usam um efetor do T3SS para fosforilar a vimentina citosólica, afetando sua complexação a MAP quinases, inibindo sinais pró-inflamatórios (169,170). Até o momento, não há estudos que envolvam a vimentina na infecção por *K. pneumoniae*. Portanto, nossos resultados preliminares sugerem que esta espécie pode modular a tolerância do hospedeiro a infecção, através da interação com a vimentina.

#### **4.1.2. VgrG4-CTD é capaz de interagir diretamente com actina:**

Apesar do resultado acima, de forma geral, corroborar que a proteína VgrG4-CTD existe uma interação com as proteínas actina, vimentina e citoqueratina, ele não mostra ainda se a interação entre VgrG4-CTD e as proteínas de citoesqueleto é uma interação direta. Para confirmar a interação direta entre VgrG4-CTD e actina foram realizados os experimentos descritos a seguir, utilizando a VgrG4-CTD recombinante e actina purificada de músculo de galinha.

Inicialmente foi realizado um experimento de co-purificação conforme descrito por Diner e colaboradores em 2012 (171). O princípio deste experimento é que as duas proteínas purificadas são misturadas, podendo formar um complexo ou não. Considerando que a VgrG4-CTD contém uma cauda 6x-His, essa proteína possui afinidade por resina de níquel. Assim, a mistura das duas proteínas foi incubada na resina *Nickel Sepharose Fast Flow*. A resina foi lavada para remoção de proteínas não-ligadas. Proteínas ligadas foram eluídas com imidazol 20 mM. Análise por SDS-PAGE das frações ligada e não ligada revelou que a actina foi retida com a VgrG4-CTD na resina de Ni<sup>2+</sup>, sugerindo uma interação física direta entre as duas proteínas (Figura 14).



**Figura 14: Co-purificação da VgrG4-CTD-Actina.** A actina purificada foi misturada com a VgrG4-CTD e submetida à cromatografia de afinidade a  $\text{Ni}^{2+}$ . As amostras de “não ligado”, “lavagem 1”, “lavagem 2” e “ligado” foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%. O peso molecular de baixo alcance (Biorad) é mostrado.

Em 2017, Valadares e colaboradores utilizaram a técnica de espectroscopia de fluorescência para verificar justamente a interação da VgrG4-CTD com a actina. Resumidamente, tal técnica permite monitorar a exposição de um triptofano da amostra, mediante a variações no seu ambiente químico. Neste trabalho, os autores viram que concentrações crescentes de VgrG4-CTD suprimem linearmente a fluorescência da actina. Os espectros de fluorescência da interação da VgrG4-CTD com actina foram comparados com o espectro da actina pura em concentrações crescentes. Não foi observado um deslocamento do pico máximo de emissão de fluorescência da VgrG4-CTD. Entretanto, se não ocorresse interação entre ambas as proteínas, esperava-se que o aumento da intensidade da emissão de fluorescência da VgrG4-CTD na presença de actina acontecesse de forma paralela ao aumento da intensidade dos espectros de emissão da actina pura. Porém, o que foi observado é que o aumento não acontece de forma paralela. Foi visto que ocorre uma supressão da emissão de fluorescência, o que sugere interação entre VgrG4-CTD e actina (Figura 7) (160).

Uma outra abordagem para estudar a interação entre a proteína VgrG4-CTD e a actina é utilizando reações de *cross-linking* entre as proteínas purificadas. *Crosslinking* (XL) é uma reação cruzada na qual se utiliza uma molécula (o agente de XL) contendo grupamentos reativos em ambas as extremidades. Esses grupamentos podem, por exemplo, se ligar especificamente a determinados aminoácidos. Considerando o tamanho desta molécula, utilizando reações de XL pode-se obter informações sobre a estrutura de proteínas e complexos, mapeando a posição relativa de dois resíduos de aminoácidos que reagiram com a mesma molécula do agente de XL. Os XL obtidos podem ser intramoleculares ou intermoleculares. O mapeamento dessas interações proteicas pode ser feito através da técnica de XL-MS. Como já mencionado anteriormente, no XL-MS as proteínas são tratadas no seu estado nativo, gerando informações sobre as estruturas terciárias e quaternárias (172). Um reagente de XL muito utilizado é o DSS, capaz de formar interações entre resíduos de lisinas. Inicialmente, analisamos as sequências primárias da actina e VgrG4-CTD a fim de avaliar a quantidade e localização das lisinas (Figura 15). Foram observadas 19 lisinas na actina e 4 na VgrG4-CTD. Embora 4 lisinas seja um número pequeno para fazer um mapeamento abrangente da possível superfície de interação, decidimos tentar fazer a reação de XL com o DSS, seguida de uma análise inicial por eletroforese em gel de poliacrilamida.

#### Actina

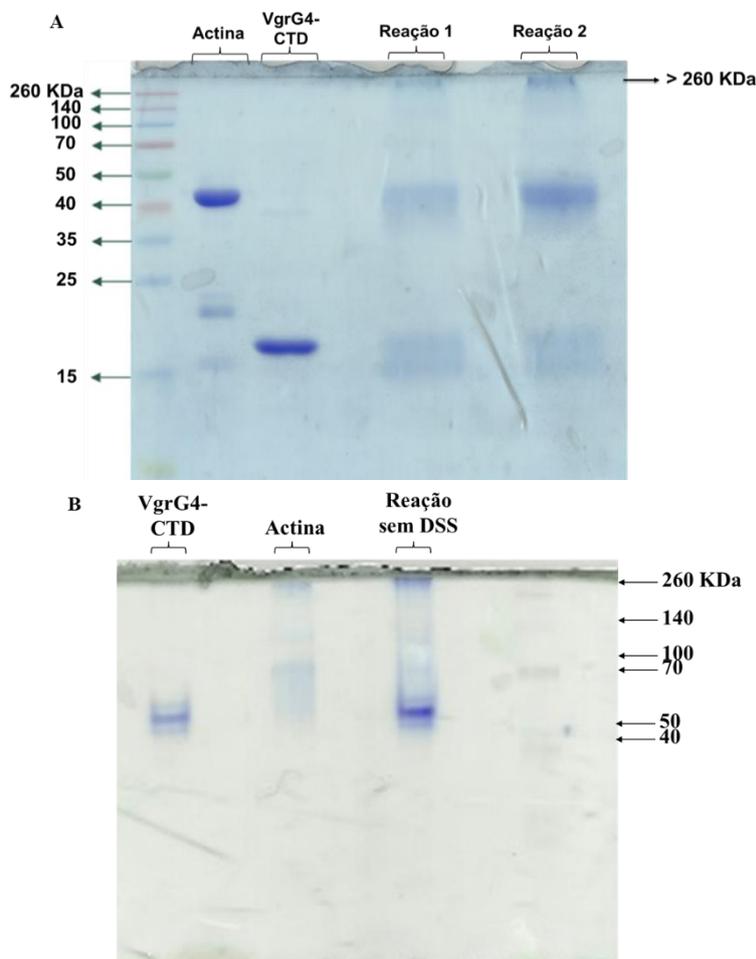
DDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSTVGRPRHQGVGMGMGQKDS  
 YVGDEAQS~~K~~RGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLT  
 EAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGV  
 THTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKE  
 KLCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGM  
 ESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPS  
 TMKIKIAPP~~K~~YSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF

#### VgrG4-CTD

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKADHPDYPPLQSTVQRSLKLNVAQSPNASD  
 SSWAGMPYTLYADGALLKQGVLDERGGQISVDHQVVTRSYKLEMANGVSYQI  
 PVAEAYS~~R~~PEQGE~~L~~ANRGFHHHTSQAASDINPPSSHTEHRNTYADLLDGHIEQ  
 DESQ

**Figura 15:** Mapeamento das lisinas presentes nas sequências de aminoácidos das proteínas actina de galinha (número de acesso: P60711) e proteína recombinante VgrG4-CTD. Os resíduos do aminoácido lisina (K) estão destacados em vermelho em ambas as sequências proteicas. A cauda de 6 histidinas é mostrada em negrito e o sítio de reconhecimento para a enzima trombina sublinhado na proteína VgrG4-CTD.

Na Figura 16A podemos observar que, em condições desnaturantes, o monômero de actina migra a ~41 kDa e o de VgrG4-CTD a ~17 kDa. Ao realizar a reação de DSS, observamos um padrão de bandas difusas/arrastadas. É possível observar essas bandas difusas em 3 regiões do gel - que correspondem a aproximadamente os monômeros de actina e VgrG4-CTD, bem como uma banda no topo das linhas (>200 kDa). A formação dessas bandas difusas é característica da reação de XL e indica a formação de espécies moleculares que contém o agente de XL ligado por um dos seus terminais. Assim, a observação dessas bandas indica que a reação de XL em si funcionou e as lisinas foram reativas ao DSS nas condições testadas. Inicialmente imaginamos que iríamos observar uma banda de ~60 kDa nas amostras com o XL. Contudo, a banda observada apresenta >260 kDa. Assim, hipotetizamos que possa estar sendo formado um complexo de alto peso molecular entre VgrG4-CTD e actina, composto por diversas subunidades dessas proteínas.



**Figura 16: Reação de *cross-linking* entre actina e VgrG4-CTD.** A actina e a VgrG4-CTD foram submetidas a reação de *crosslinking* com o agente *crosslinker* DSS. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12,5% (A). Além disso, as proteínas actina e VgrG4-CTD foram analisadas em uma condição não-desnaturante e sem adição do agente *crosslinker* DSS em um gel SDS-PAGE 10% (B).

Como um controle, analisamos a VgrG4-CTD, a actina e o possível complexo das duas proteínas (mistura das proteínas em tampão MES, sem reagente de XL) por eletroforese em gel não desnaturante. Nesta análise pudemos observar que a VgrG4-CTD pura migrou aproximadamente assim como a banda que corresponde a proteína de ~ 60 kDa do padrão de peso molecular, sugerindo que talvez corresponda a um trímero. Curiosamente, é sabido que VgrGs completas, quando arranjadas no T6SS, são triméricas. Também pudemos observar que a actina tende a formar complexos de alta massa molecular em condições não-desnaturantes - o que não é uma surpresa, pois a actina é uma proteína que forma polímeros. A amostra que continha a mistura de ambas proteínas apresentou uma banda que migrou como a amostra de VgrG4-CTD pura (possivelmente um trímero) e uma banda no topo do gel - que pode corresponder ao complexo VgrG4-CTD + actina (Figura 16B). Em breve, essas bandas de alto peso molecular serão processadas para MS - visando identificar se de fato contém ambas as proteínas.

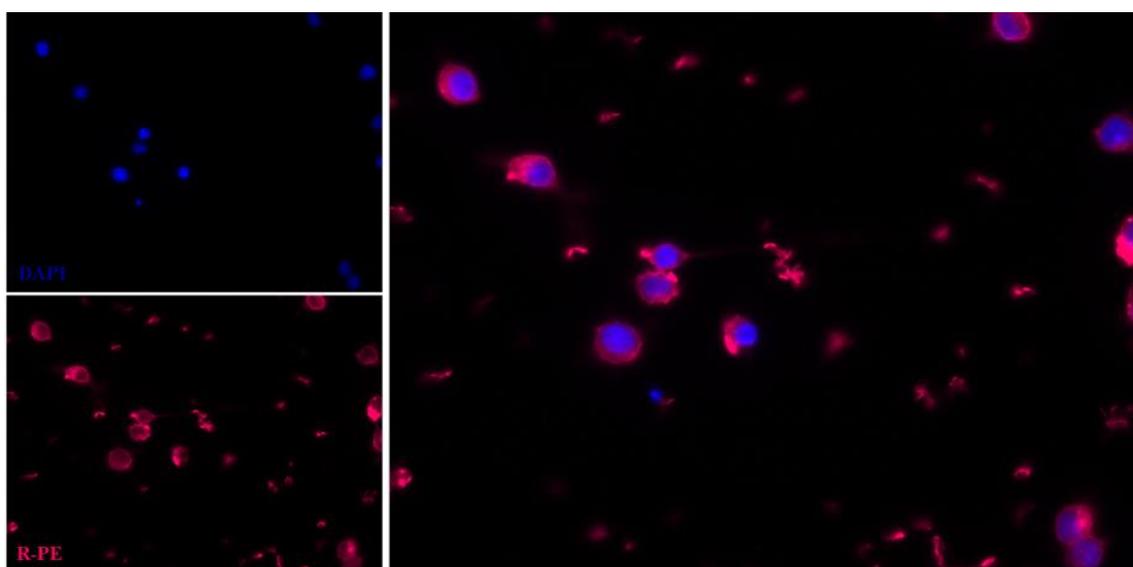
O fato da interação entre VgrG4-CTD de *K. pneumoniae* e actina já ter sido mostrada em trabalhos anteriores reforça a linha de raciocínio de que a interação entre VgrG4-CTD e proteínas do citoesqueleto, como a actina, é de alguma forma importante para a *K. pneumoniae*. Como já mencionado anteriormente, a interação entre VgrGs de outras espécies bacterianas com proteínas do citoesqueleto, como actina, se mostrou de grande valia na interação patógeno-hospedeiro (89,134,154,155,173). Devido a essas evidências, tanto presentes na literatura científica quanto obtidas neste trabalho, nos perguntamos se a interação entre a VgrG4-CTD e actina teria alguma relevância biológica para *K. pneumoniae* em um contexto de infecção.

## **4.2. Interação entre VgrG4-CTD e actina é importante para a interação patógeno-hospedeiro:**

### **4.2.1. Entrega da VgrG4-CTD no citoplasma de células eucarióticas:**

Como mostrado anteriormente, VgrG4-CTD é capaz de interagir com actina, e esse achado levantou a hipótese de que esse efector bacteriano poderia ter algum efeito na regulação do citoesqueleto do hospedeiro. A partir disso, foi realizado um ensaio de entrega da proteína recombinante VgrG4-CTD com o auxílio do reagente de entrega PULSin. Tal reagente é capaz de entregar proteínas no citoplasma de diversas células eucarióticas através

da ligação do complexo ‘PULSin + proteína de interesse’ com os proteoglicanos presentes na membrana das células; assim que o complexo é entregue no citoplasma, a proteína de interesse é descomplexada do reagente PULSin, podendo desempenhar sua função. Como controle positivo da eficiência de entrega do reagente PULSin, foi realizado um ensaio da entrega da proteína vermelho fluorescente *R-Phycoerythrin* (R-PE) (Figura 17). A eficiência de entrega da proteína R-PE pelo reagente de entrega PULSin já é bem estabelecida em células HeLa (174), além de possuir uma taxa de eficiência de entrega de 98%, segundo informações do fabricante. Tal estratégia foi adotada no intuito de simular a entrega desse efetor no interior da célula alvo feita pelo T6SS e com isso atribuir algum possível fenótipo induzido pela VgrG4-CTD.

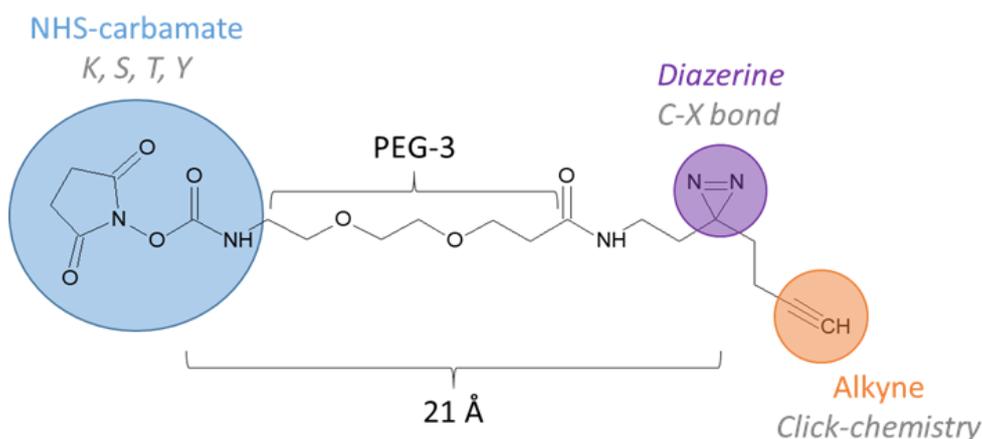


**Figura 17: Entrega intracelular da proteína *R-Phycoerythrin* (R-PE).** Células foram tratadas com o reagente PULSin carreando a proteína vermelho fluorescente (R-PE) por 4 horas. Núcleos marcados com DAPI (azul). Dados representam três experimentos realizados em triplicata biológica (n=3).

#### 4.2.2. VgrG4-CTD é entregue no citoplasma de células alvo pelo PULSin:

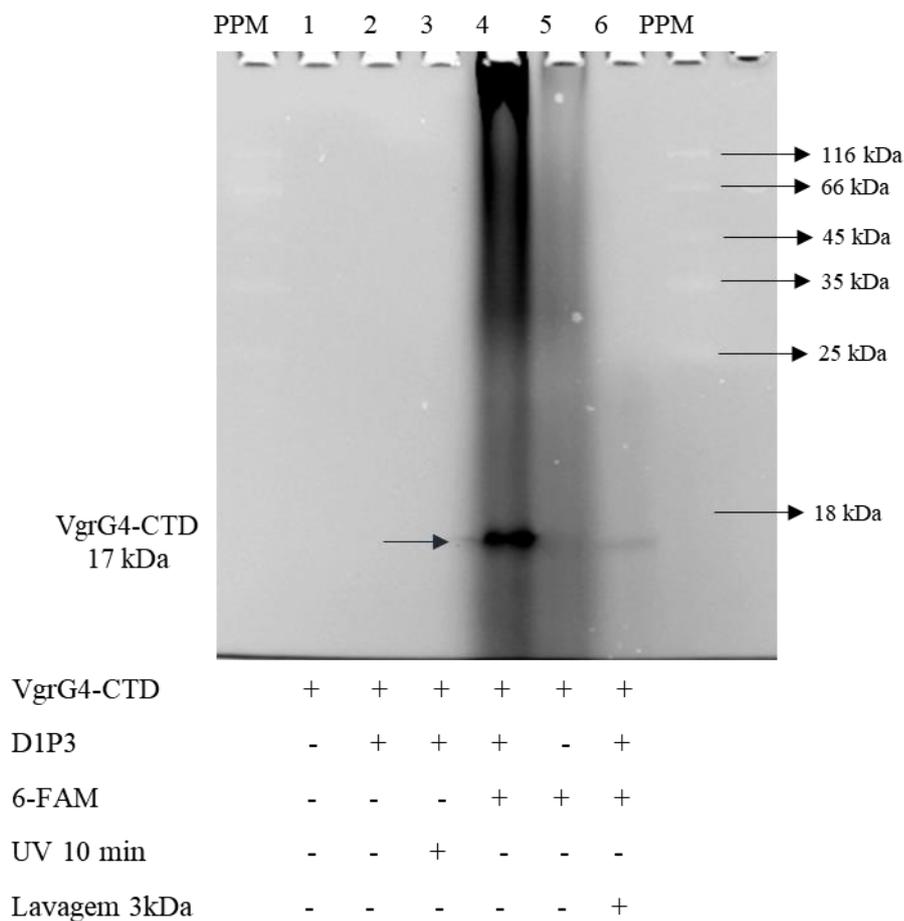
Mesmo o reagente PULSin se mostrando eficiente na entrega de proteínas no citoplasma de células alvos, nos perguntamos se a proteína VgrG4-CTD estaria de fato sendo entregue no interior da célula. Para responder esse questionamento, nós realizamos uma reação de *crosslinking* em colaboração com a Dra. Julia Chamot-Rooke, Dr. Martial Rey e Dr. Regis Tournebize no laboratório *Mass Spectrometry for Biology* (UTechS MSBio) no Instituto Pasteur (Paris – França). Tal reação nos permitiu conjugar a proteína VgrG4-CTD com um agente *crosslinker*, o D1P3, que contém 3 grupamentos reativos: o grupo *NHS-*

*carbamate*, que permite uma ligação específica aos aminoácidos lisina (K), serina (S), treonina (T), tirosina (Y); o grupo *Diazerine*, que permite a reação de *crosslinking* mais diversa, com capacidade de se ligar a todos os aminoácidos; e por último, o grupo *Alkyne*, que é utilizado para a purificação da amostra, além de ser capaz de atravessar membranas (Figura 18), e o corante 6-FAM, que facilitou a visualização da proteína VgrG4-CTD no interior da célula.



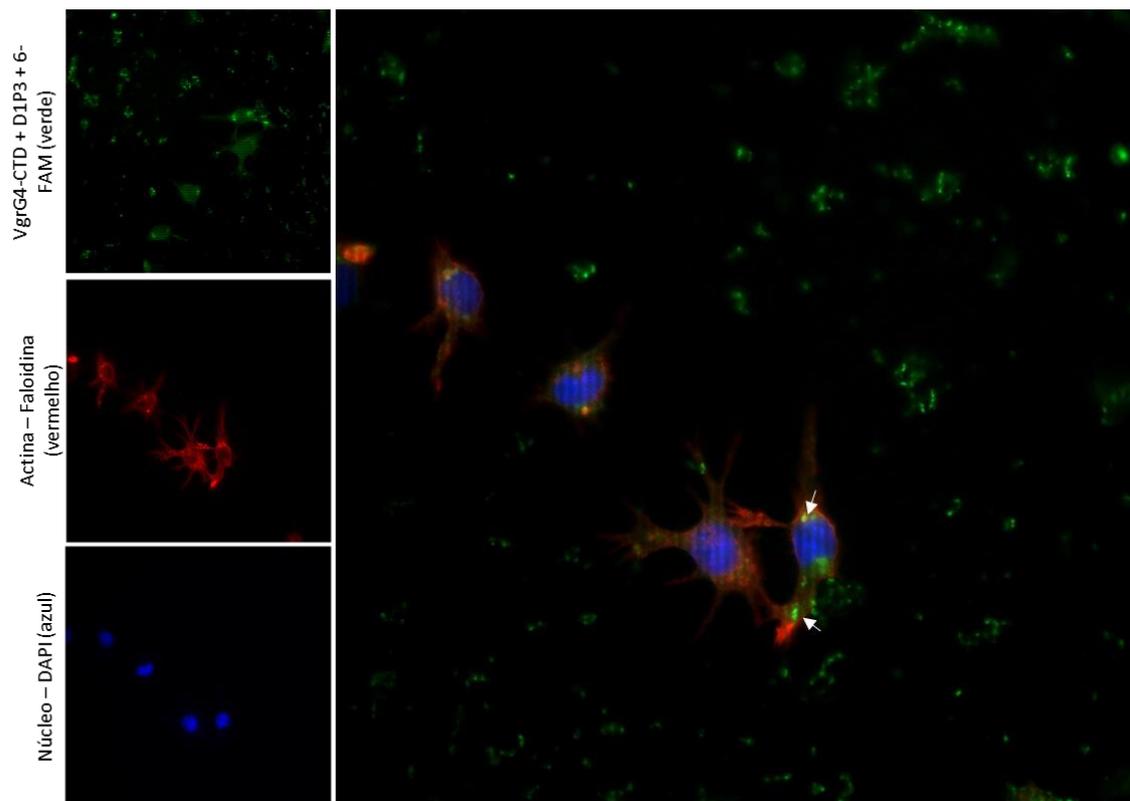
**Figura 18: Estrutura química e grupamentos reativos presentes no agente *crosslinker* D1P3.** O grupo *NHS-carbamate* encontra-se no círculo azul; o grupo *Diazerine* no círculo roxo; e o grupo *Alkyne* no círculo laranja.

Inicialmente, nós realizamos alguns experimentos para otimizar a reação de *crosslinking* para encontrar a melhor condição para a reação entre a proteína VgrG4-CTD, o *crosslinker* D1P3 e o corante 6-FAM. As condições testadas variaram em relação à concentração da proteína, exposição ou não à luz ultravioleta e etapas de lavagem para remoção do excesso de corante. A eficiência da reação foi monitorada em um gel SDS-PAGE e leitura da fluorescência das bandas proteicas. Após os testes, foi possível observar que usando 1 µg da proteína VgrG4-CTD para 5 nmol do *crosslinker* D1P3 para 125 nmol do corante 6-FAM a reação de *crosslinking* ocorria de maneira específica e eficiente (Figura 19).



**Figura 19: Complexo VgrG4-CTD-D1P3-6-FAM.** Para esse experimento 1  $\mu\text{g}$  da proteína VgrG4-CTD, 5 nmol do *crosslinker* D1P3 e 125 nmol de corante 6-FAM foram usados. Amostras foram submetidas à eletroforese em um gel 15% por 40 minutos a 150V, 400 mA. PM: peso molecular.

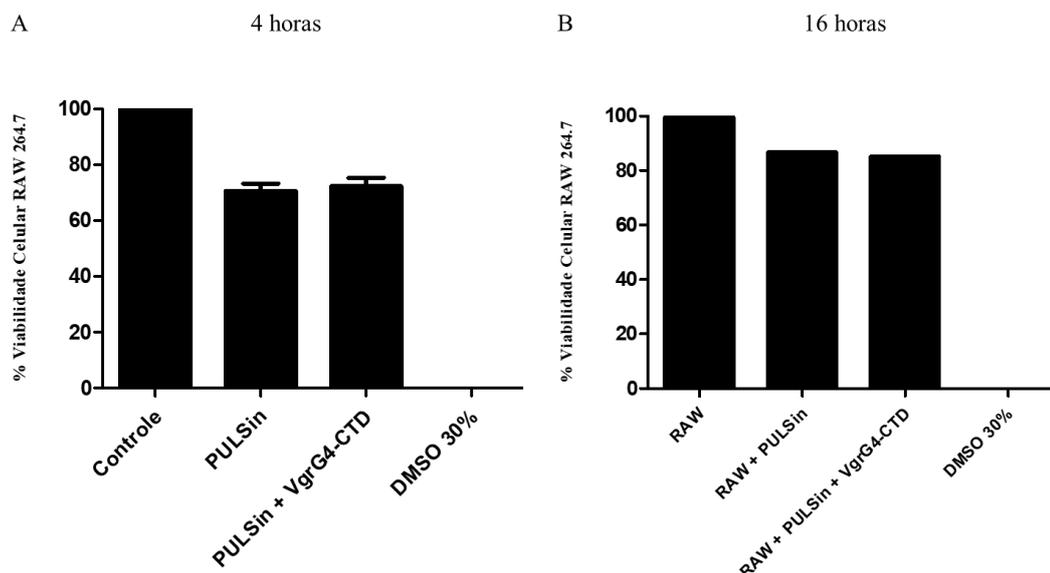
Em seguida, nós usamos o reagente de entrega de proteínas PULSin para estimular células do epitélio pulmonar A549 com o complexo da proteína VgrG4-CTD, o *crosslinker* D1P3 e o corante 6-FAM. A eficiência de entrega foi monitorada por microscopia de fluorescência. Na Figura 20 é possível observar a coloração verde (6-FAM) dentro das células, confirmando que o complexo VgrG4-CTD-D1P3-6-FAM é entregue no citoplasma de células A549, comprovando a eficiência do reagente PULSin na entrega da proteína VgrG4-CTD no interior da célula alvo.



**Figura 20: Entrega do complexo VgrG4-CTD – D1P3 - 6-FAM no citoplasma de células A549.** O complexo VgrG4-CTD-D1P3-6-FAM foi entregue no citoplasma de células A549 via reagente de entrega PULSin. Após 4 horas de estímulo, o núcleo foi corado com DAPI (azul) e os filamentos de actina com faloidina (vermelho). Setas brancas indicam a localização do complexo VgrG4-CTD-D1P3-6-FAM. Lâminas foram analisadas usando o Microscópio Invertido ZEISS ApoTome e as imagens foram obtidas usando o software Zen. Dados representam dois experimentos realizados em duplicata biológica (n=2).

#### 4.2.3. Estímulo com VgrG4-CTD não é citotóxico em macrófagos:

Inicialmente foi realizado um ensaio de citotoxicidade a fim de avaliar se o reagente PULSin e/ou a proteína VgrG4-CTD apresentam algum efeito citotóxico a macrófagos murinos RAW 264.7. É possível notar na Figura 21 que após 4h (21A) ou 16h (21B) de estímulo com o reagente PULSin sozinho ou complexado com a proteína VgrG4-CTD não foi observada uma alta taxa de citotoxicidade aos macrófagos RAW 264.7 quando comparada com o controle positivo de morte celular (DMSO 30%). Esse resultado indica que a proteína recombinante VgrG4-CTD não tem efeito citotóxico para essas células e sua ação deve ser devido a modulações que não levem à morte das células. Por outro lado, esse dado também mostra que essa estratégia de entrega pode ser utilizada para os demais ensaios de estímulo com a proteína VgrG4-CTD.



**Figura 21: Reagente PULSin e VgrG4-CTD não apresenta citotoxicidade a macrófagos.** Viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7 após estímulo com o reagente PULSin complexoado ou não com a VgrG4-CTD por 4 horas (A) e 16 horas (B). Controle de morte foi realizado com a adição de 30% de DMSO nas células não estimuladas. Os dados foram plotados em forma percentual e representam três experimentos realizados em triplicata biológica (n=3).

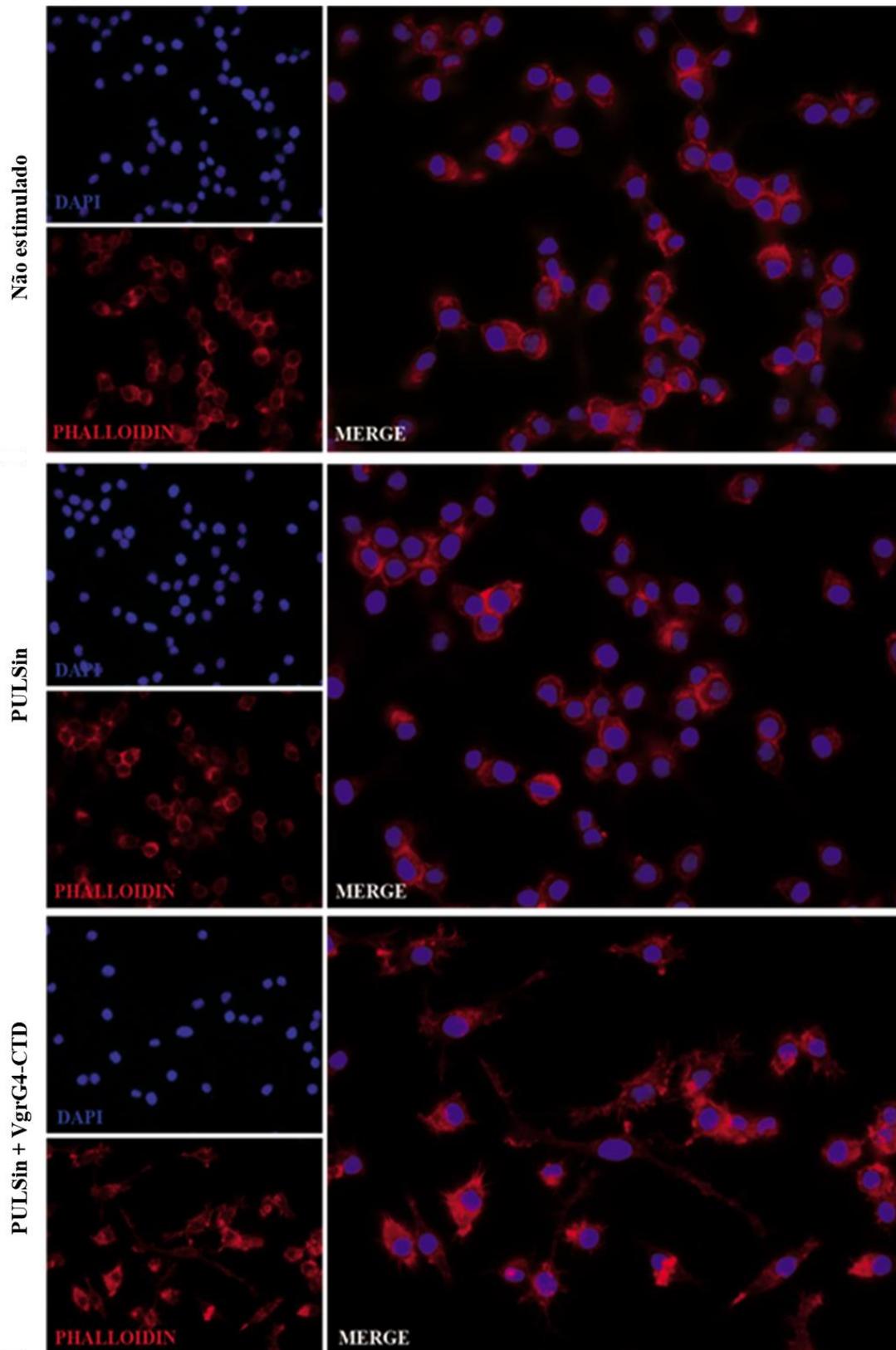
#### 4.2.4. A proteína VgrG4-CTD recombinante induz alterações na organização dos filamentos de actina de macrófagos, mas essa interação parece não mediar a associação bacteriana em células fagocíticas:

Para compreender o papel da interação entre a VgrG4-CTD e a actina na interação bactéria-hospedeiro, inicialmente avaliamos se o estímulo com a VgrG4-CTD induz alterações morfológicas em macrófagos RAW 264.7 e na organização dos microfilamentos. Para isso, a VgrG4-CTD foi entregue no citoplasma das células através do PULSin. Após 4 horas de estímulo, as células foram marcadas com faloidina para visualização dos filamentos de actina e imageadas por microscopia de fluorescência. Como pode ser observado na Figura 22, as células RAW 264.7 não estimuladas apresentam formato bem uniforme e uma marcação densa dos filamentos de actina por todo o citoplasma celular. As células tratadas com o reagente PULSin puro apresentaram-se com este mesmo perfil. Porém, as células estimuladas com a VgrG4-CTD encontram-se mais espaiadas e com diversos prolongamentos. Assim, concluímos que a VgrG4-CTD induz alterações nos microfilamentos, através da sua interação direta com a actina.

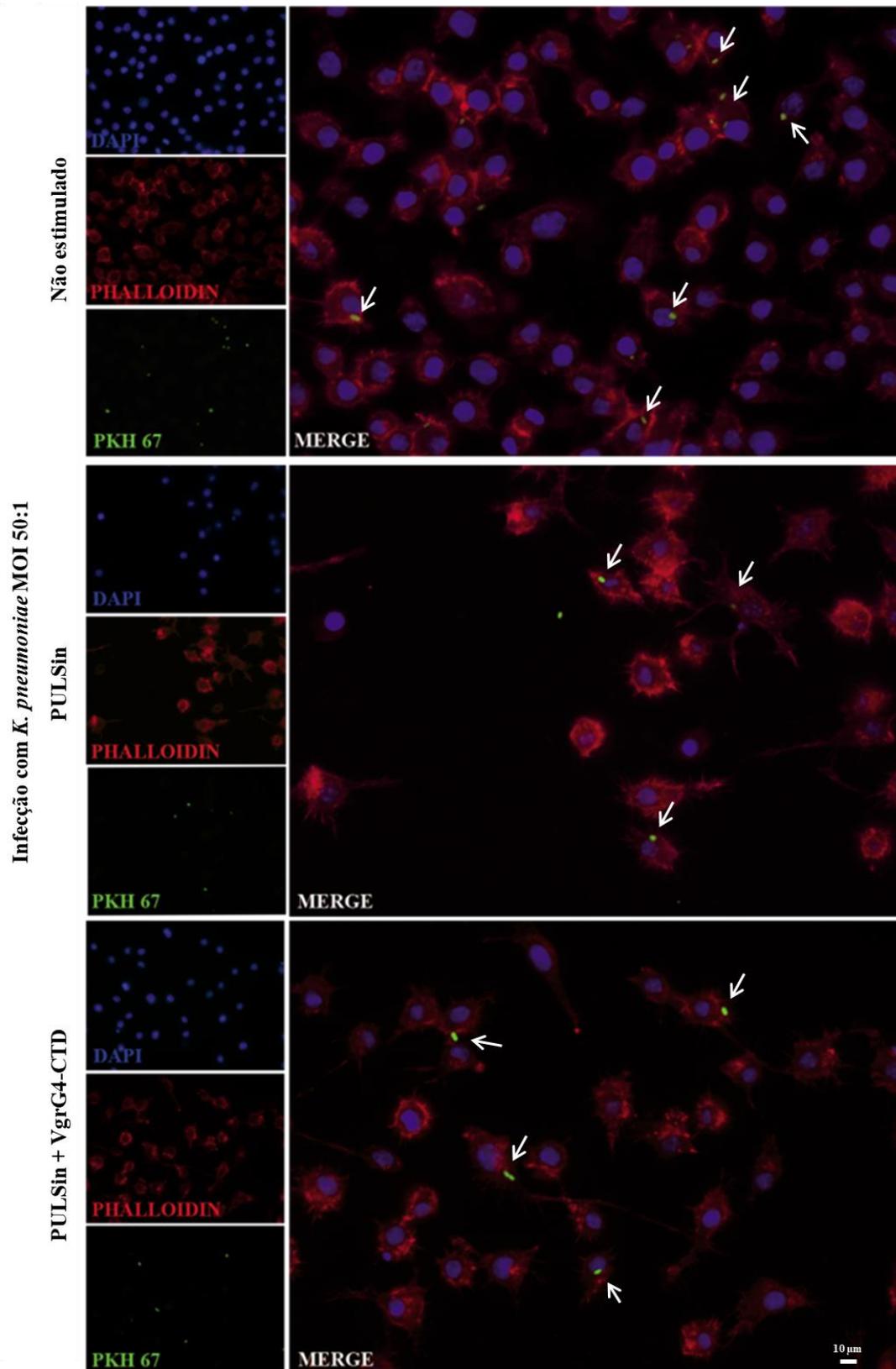
Em seguida, realizamos um experimento similar, no qual, após o tratamento, as células foram infectadas por 1 h com *K. pneumoniae* na MOI 50:1. Com esse experimento

esperamos verificar se: I - a bactéria *K. pneumoniae*, que possui o T6SS ativo e supostamente entrega a VgrG4-CTD em células eucarióticas, induz o mesmo tipo de remodelamento dos filamentos de actina que a VgrG4-CTD purificada; II - a modulação do citoesqueleto de actina induzida pela VgrG4-CTD afeta a internalização de *K. pneumoniae*. Neste experimento, as bactérias foram marcadas com PKH *green fluorescent* para visualização por microscopia de fluorescência. Os dados gerados (Figura 23) mostram que, independente do estímulo com a VgrG4-CTD, as células infectadas apresentam o mesmo perfil das células não infectadas estimuladas com a VgrG4-CTD: espalhadas e com prolongamentos.

Tendo em vista estes dados, hipotetizamos que a manipulação do citoesqueleto de actina pela proteína VgrG4-CTD ou pela *K. pneumoniae* possa ser um mecanismo para controlar a internalização de *K. pneumoniae* em células fagocíticas, visto que a *K. pneumoniae* é tipicamente uma bactéria extracelular.



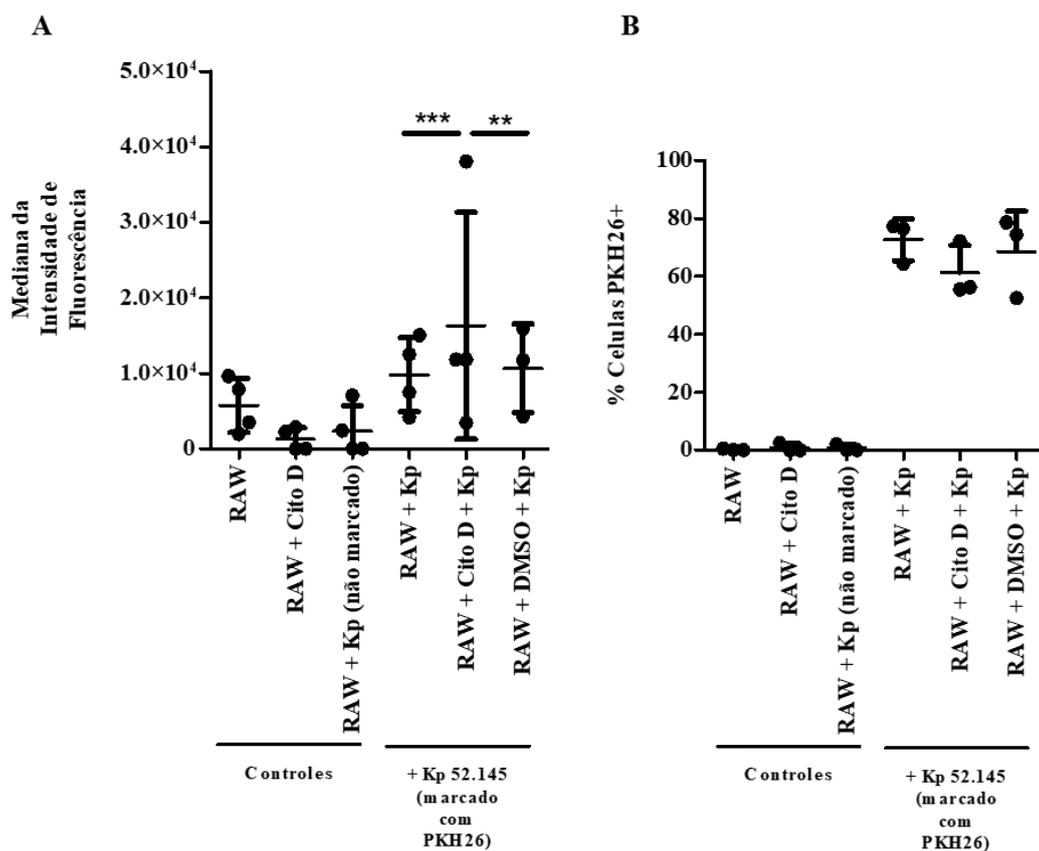
**Figura 22: Entrega intracelular de VgrG4-CTD causa alteração nos filamentos de actina em macrófagos murinos RAW 264.7.** Células foram tratadas com o reagente PULSin carreando ou não a VgrG4-CTD, por 4 horas. Células foram fixadas e analisadas por microscopia de fluorescência. Filamentos de actina foram marcados com Faloidina (vermelho) e núcleos marcados com DAPI (azul). As imagens são representativas de três experimentos realizados em triplicata biológica (n=3).



**Figura 23: Infecção com *K. pneumoniae* após entrega intracelular de VgrG4-CTD em macrófagos murinos RAW 264.7.** Células foram tratadas com o reagente PULSin carregando ou não a VgrG4-CTD por 4 horas. Culturas de células foram infectadas com *K. pneumoniae* Kp52.145 marcada com PKH67 (verde) na MOI 50:1 por 1 hora. Células foram fixadas e analisadas por microscopia de fluorescência. Setas indicam a localização da bactéria. Filamentos de actina foram marcados com Faloidina (vermelho) e o núcleo marcado com DAPI (azul). As imagens são representativas de três experimentos realizados em triplicata biológica (n=3).

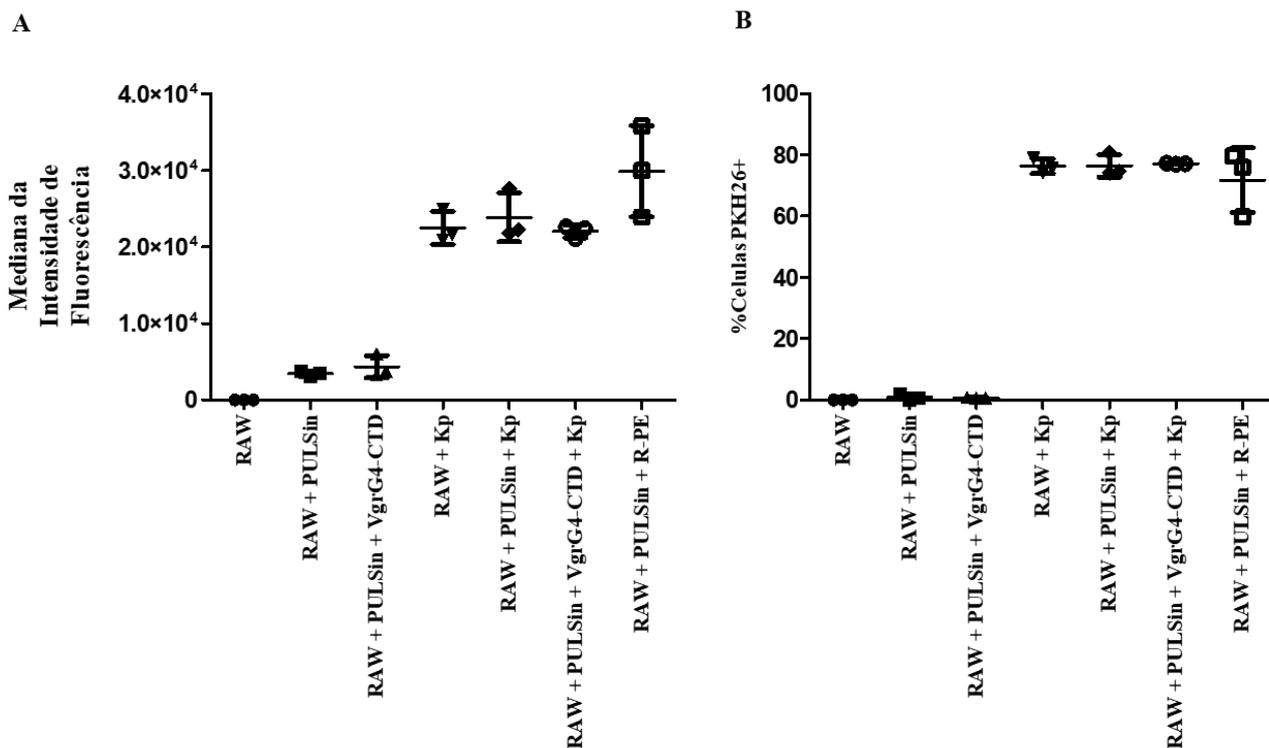
Interessantemente, Cano e colaboradores, em 2015, mostraram que o engolfamento da *K. pneumoniae* Kp43816 em macrófagos murinos da linhagem MH-S foi diminuído quando essas células foram tratadas com inibidores de funções celulares do hospedeiro, como a citocalasina D e o nocodazol, que atuam interferindo na polimerização de actina e de microtúbulos, respectivamente. Tal dado sugere que a fagocitose de Kp43816 requer de alguma forma a montagem dos filamentos de actina e a rede de microtúbulos do hospedeiro. Porém, nenhuma alteração morfológica foi observada nas culturas celulares de macrófagos MH-S após infecção por Kp43816. Resultados similares também foram observados em células THP-1(175).

Baseado nessas evidências sobre a internalização de *K. pneumoniae* em células fagocíticas, nos perguntamos se a *K. pneumoniae* Kp52.145 estaria sendo fagocitada por células RAW 264.7. Para responder essa pergunta, células RAW 264.7 foram tratadas ou não com citocalasina D por 30 minutos, infectadas com *K. pneumoniae* Kp52.145 por 1 hora e a taxa de associação entre bactérias e células foi analisada por citometria de fluxo. Interessantemente, a mediana da intensidade de fluorescência de células PKH26+ (Figura 24A) foi maior em células tratadas do que em células não tratadas (Figura 24A), correspondendo a quantidade de bactérias por célula. No entanto, a porcentagem de células infectas (Figura 24B) que corresponde ao número de células com bactérias associadas não foi significativamente alterado.



**Figura 24: Envolvimento da actina na fagocitose de *K. pneumoniae*.** RAW 264.7 foram tratadas, ou não, com citocalasina D (um inibidor do remodelamento de actina). Então, as células foram infectadas com Kp52.145 marcada com PKH26 na MOI 50:1. Células foram analisadas por citometria de fluxo e tanto a mediana da intensidade de fluorescência (A) quanto a porcentagem de células PKH+ (B) são mostradas. Dados representam 4 experimentos realizados em triplicata biológica. Teste estatístico Anova: \*\* indica  $p < 0.001$  e \*\*\*  $p < 0.0001$  ( $n=4$ ).

Assim, observamos que a associação de *K. pneumoniae* a células RAW 264.7 é afetada pelo bloqueio da polimerização de actina. Diante disso, fomos analisar se a VgrG4-CTD teria algum papel nessa associação entre *K. pneumoniae* e células RAW 264.7. Para isso, células RAW 264.7 foram estimuladas ou não com a proteína VgrG4-CTD complexada com o reagente de entrega PULSin e infectadas com *K. pneumoniae* Kp52.145 por 1 hora e a taxa de associação entre *K. pneumoniae* e células RAW 264.7 foi analisada por citometria de fluxo. Curiosamente, a proteína VgrG4-CTD, parece não afetar a taxa de associação bactéria-célula (Figura 25), tanto na mediana de intensidade de fluorescência de células PKH 26+ (Figura 25A) quanto no percentual de células PKH+ (% células infectadas) (Figura 25B).



**Figura 25: Envolvimento da proteína VgrG4-CTD de *K. pneumoniae* na associação bactéria-célula.** RAW 264.7 foram estimuladas, ou não, com a proteína VgrG4-CTD complexada ao reagente de entrega PULSin. Então, as células foram infectadas com Kp52.145 marcada com PKH26 na MOI 50:1. Células foram analisadas por citometria de fluxo e tanto a mediana da intensidade de fluorescência (A) quanto a porcentagem de células PKH+ (B) são mostradas. Dados representam um experimento realizado em triplicata técnica (n=1).

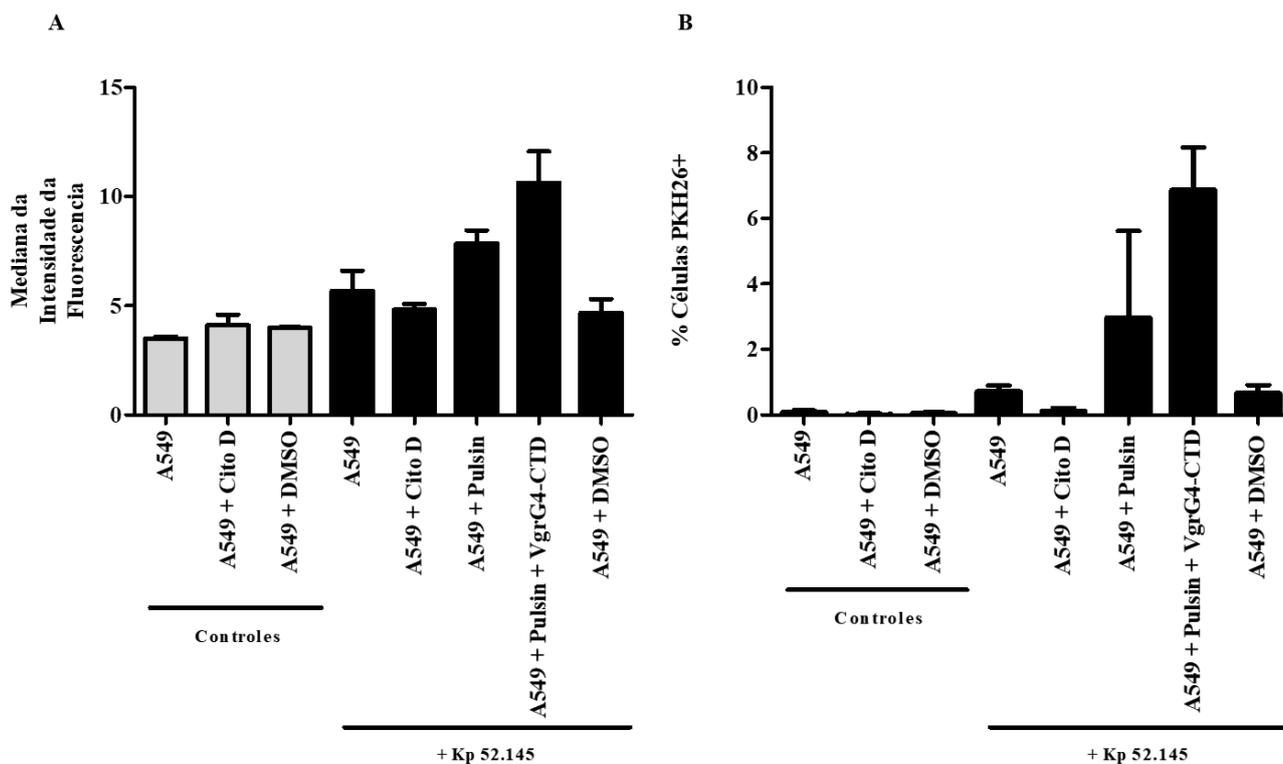
Até o momento nossos dados mostram que proteína recombinante VgrG4-CTD interage com actina e modula a organização de filamentos de actina de macrófagos RAW 264.7 de forma similar às alterações induzidas na infecção pela bactéria. Até o momento não observamos diferença na associação de *K. pneumoniae* com células RAW 264.7 mediante o estímulo com a VgrG4-CTD recombinante. Contudo, este experimento foi realizado apenas uma vez, em triplicata técnica e não nos permitiu diferenciar bactérias aderidas de bactérias internalizadas. Assim, experimentos adicionais ainda são necessários para definir se a modulação dos filamentos de actina por VgrG4-CTD influencia a internalização e sobrevivência de *K. pneumoniae* em macrófagos em cultura. A modulação do citoesqueleto por proteínas da família VgrG é bem descrita na literatura. Em *V. cholerae* V52, por exemplo, já foi mostrado que a proteína VgrG1 é entregue no citoplasma de células de macrófagos murinos RAW 264.7 e J776 de uma maneira dependente do T6SS. A proteína VgrG1 de *V. cholerae* apresenta na sua extensão C-terminal de 446 resíduos de aminoácidos um domínio ACD. Esse domínio é capaz de induzir um *crosslinking* de actina massivo em células J774,

o que não foi observado quando as células J774 foram infectadas com cepas mutantes para o gene *vgrG1*. A entrega da proteína VgrG1 e a infecção mediada por *V. cholerae* está relacionada com acúmulo de fluidos, infiltração celular e expressão gênica alterada no hospedeiro, levando a uma diarreia inflamatória que é bastante comum em casos de infecção por *V. cholerae* (134,173). Diante disso, acreditamos que possa haver benefícios para *K. pneumoniae*, ainda não explorados, da manipulação do citoesqueleto do hospedeiro que não envolvam a internalização bacteriana.

#### **4.2.5. VgrG4-CTD é importante para associação bactéria-célula em células não fagocíticas:**

Visto que a *K. pneumoniae* é uma bactéria extracelular, a entrega da proteína VgrG4-CTD no citoplasma de células hospedeiras pode ter um papel importante para a adesão e/ou entrada da bactéria na célula. A nossa hipótese é que a bactéria usa o seu arsenal de efetores juntamente com as proteínas que compõem o T6SS com o intuito de facilitar sua entrada em células não fagocíticas. Com o intuito de verificar essa hipótese, células A549 foram estimuladas ou não com a proteína VgrG4-CTD utilizando o reagente PULSin para mediar a entrega da proteína no interior da célula alvo. Após 4 horas de estímulo, as células A549 foram infectadas por 1 hora com *K. pneumoniae*. Em paralelo, as células A549 foram tratadas ou não com um inibidor da polimerização da actina, a citocalasina D por 30 minutos, com posterior infecção com *K. pneumoniae* marcadas com PHK *red fluorescent*. A taxa de associação entre *K. pneumoniae* com células A549 foi medida por citometria de fluxo.

Nós observamos que após estímulo com a proteína VgrG4-CTD em células A549 houve uma tendência de aumento na associação de *K. pneumoniae* (Figura 26A), tanto na mediana da intensidade de fluorescência (MFI) quanto no percentual de células PKH positivas, o que sugere que a proteína VgrG4-CTD estaria facilitando de alguma forma a adesão e/ou entrada da bactéria em células não fagocíticas. Esse achado é bastante interessante, já que A549 é uma célula do epitélio pulmonar, sendo esse tipo celular um alvo de infecção de *K. pneumoniae*.



**Figura 26: Envolvimento da VgrG4-CTD de *K. pneumoniae* 52.145 na internalização bacteriana.** Células A549 foram estimuladas com o reagente PULSin complexado ou não com a proteína 1 µg de VgrG4-CTD por 4 horas e infectados ou não com *K. pneumoniae* 52.145 coradas com PKH26 por 1 hora na MOI 50:1. Células foram analisadas por citometria de fluxo e tanto a mediana da intensidade de fluorescência (A) e a porcentagem de células PKH+ (B) são mostradas. Dados representam dois experimentos realizados em duplicata biológica (n=2).

Curiosamente, nesse modelo experimental, a citocalasina D não aumentou a taxa de associação bactéria-célula, como tinha sido observado em macrófagos. Visando certificar que a citocalasina D utilizada estava funcional, avaliamos o efeito de diferentes concentrações da citocalasina D em células A549, bem como células de Schwann ST 8814 por microscopia ótica. Em todas as concentrações testadas, a citocalasina D induziu alterações no citoesqueleto, evidenciadas pelo arredondamento das células (dados não mostrados).

Esse tipo de ensaio já é bem definido e é mostrado que após o tratamento com diferentes concentrações de citocalasina D a internalização de *K. pneumoniae* Ca0438 diminui de maneira dose dependente em células Caco-2 (176). Quando células de epitélio humano da bexiga T24 e 5637 foram tratadas com citocalasina D, a entrada celular de *K. pneumoniae* 3019 foi diminuída. Foi sugerido que o mecanismo de internalização de Kp 3091 é diferente do mecanismo de invasão dependente de microfilamentos que é visto em muitas bactérias entéricas (177). Curiosamente, já foi descrito que *K. pneumoniae* 33 é capaz de

aumentar a sua internalização em células A549 através da regulação da expressão da integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Neste trabalho os autores mostraram que essa internalização foi dependente do nocaute para a proteína *High mobility group nucleosomal binding domain 2* (HMGN2) (178). HMGN2 é uma proteína nuclear, não-histona, que está presente de forma ubíqua em células eucarióticas. Já foi mostrado que a HMGN2 afeta a cromatina e modula a expressão de peptídeos antibacterianos em células A549 expostas a lipopolissacarídeos, indicando uma função crítica da proteína HMGN2 na resposta imune (179). Baseado nisso, Wang e colaboradores mostraram, em 2015, que o nocaute de HMGN2 levou a um aumento na expressão de integrina  $\alpha 5\beta 1$  na membrana celular, resultando em um aumento significativo da internalização de *K. pneumoniae* (178). Dadas as diferenças entre as cepas de *K. pneumoniae*, as características dos diferentes tipos celulares e os mecanismos envolvidos na internalização bacteriana, ainda são necessários mais estudos para melhor compreender a contribuição de cada fator neste processo bem como o possível papel da VgrG4-CTD.

### **4.3. VgrG4-CTD pode carrear outras proteínas para translocação pelo T6SS:**

#### **4.3.1. Identificação de ligantes da VgrG4-CTD em extratos proteicos da própria bactéria:**

Já foi demonstrado na literatura que algumas VgrGs contêm domínios para acoplamento de outras proteínas, podendo assim carrear outros efetores bacterianos para translocação pelo T6SS (180). Assim, esta parte do projeto dedica-se a compreender se a extensão C-terminal da VgrG4 poderia ser também um sítio para ligação de outras proteínas bacterianas, que seriam translocadas pelo T6SS de forma mediada pela VgrG4. Para testar essa hipótese, nós realizamos experimentos de co-precipitação para identificação de ligantes da VgrG4-CTD em extratos proteicos de *K. pneumoniae*. *Beads* de látex foram recobertas com VgrG4-CTD, os sítios vazios foram bloqueados, e incubadas com lisado proteico de *K. pneumoniae* como uma fonte de possíveis ligantes. No total, nós identificamos 59 proteínas que interagem direta ou indiretamente com VgrG4-CTD (Tabela 1). Nove proteínas apresentaram o emPAI (Índice de Abundância de Proteína)  $> 1$ , o que sugere que essas proteínas estavam enriquecidas de alguma forma na amostra (Tabela 1). O Índice de Abundância de Proteína é calculado pela relação do número de peptídeos identificados e a abundância proteica em experimentos proteômicos baseados em espectrometria de massas.

Entre as proteínas com um emPAI>1, podemos observar proteínas ribossomais e relacionadas ao metabolismo. Interessantemente, quatro proteínas (EF-TU, P<sub>gk</sub>, OmpA e DeoC) apresentam funções moleculares que podem estar relacionadas ao T6SS de *K. pneumoniae* e/ou virulência.

*Elongation Factor Thermo Unstable* (EF-TU) é uma proteína altamente conservada envolvida na síntese proteica. No entanto, pode apresentar várias funções adicionais, sendo considerada uma proteína *moonlighting* multifuncional (181). É bem descrito que EF-TUs bacterianos são Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), encontrados na superfície bacteriana ou secretados (182). A identificação de EF-TU como um ligante de VgrG4 sugere um novo mecanismo de translocação de proteínas EF-TU, através da translocação pelo T6SS.

Em *K. pneumoniae*, o aumento da expressão da proteína EF-TU foi correlacionada à leucopenia causada por *K. pneumoniae* (183). Além disso, EF-TU se liga a várias moléculas do hospedeiro, estruturalmente e quimicamente não relacionadas, tais como proteínas do citoesqueleto, componentes da matriz extracelular e DNA. Assim, EF-TU é envolvida na formação de biofilme, adesão bacteriana e patogênese de diversas espécies (184,185). Curiosamente, foi mostrado recentemente que EF-TU de *Mycoplasma pneumoniae* se liga fortemente à actina de células epiteliais A549 (186). EF-TUs de *K. pneumoniae* e *M. pneumoniae* compartilham 70% de identidade a 82% de similaridade. Como elas são bastante conservadas, nossos resultados sugerem que EF-TU de *K. pneumoniae* pode se ligar também à actina e modular o citoesqueleto do hospedeiro para favorecer a infecção bacteriana.

Além disso, outra proteína identificada como ligante de VgrG4-CTD é a enzima glicolítica fosfoglicerato quinase (P<sub>gk</sub>). Embora seu papel canônico seja desempenhado no citoplasma, a P<sub>gk</sub> também é encontrada na superfície bacteriana. Sabe-se que P<sub>gk</sub> é capaz de romper o citoesqueleto de actina do hospedeiro e contribui para a virulência estreptocócica (187). É bastante impressionante que a própria VgrG4, assim como seus parceiros de interação EF-TU e P<sub>gk</sub>, sejam capazes de ligar à actina. Tal congruência reforça que T6SS de *K. pneumoniae* tem como alvo o citoesqueleto do hospedeiro.

OmpA é uma proteína de membrana externa composta de um domínio barril-beta incorporado na membrana e um domínio periplasmático de ligação a peptidoglicano. Além disso, OmpA de *K. pneumoniae* confere resistência a peptídeos microbianos e contribui para a atenuação de respostas das células epiteliais das vias aéreas, facilitando a sobrevivência da bactéria no pulmão (57,188). Curiosamente, vários genes da família da OmpA localizam-se perto das ilhas genômicas do T6SS e são necessárias proteínas contendo domínios de ligação

a peptidoglicano para a secreção de T6SS em algumas espécies. Hipotetizou-se que os domínios de ligação de peptidoglicano poderiam atuar como um fator de localização para a montagem de T6SS e essencial para estabilizar/ancorar o complexo T6SS no envelope celular, principalmente para permitir que grandes mudanças conformacionais ocorram. Portanto, a identificação de OmpA como um ligante de VgrG4-CTD reforça a ideia de que o T6SS pode estar ancorado na proteína OmpA em *K. pneumoniae*.

Finalmente, a desoxirribose-fosfato aldolase (DeoC) é uma enzima envolvida no metabolismo de nucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. DeoC de *K. pneumoniae* foi identificada como um locus associado à patogenicidade, e uma mutação na região intergênica *deoR-deoC* desencadeia a ativação de NF- $\kappa$ B (189,190). DeoC de *Streptococcus mutans* apresenta atividade de nuclease que degrada as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (191). NETs são estruturas de DNA revestidas de histona e protease liberadas por neutrófilos para capturar patógenos, como parte de uma resposta imune à infecção. De fato, foi demonstrado que *K. pneumoniae* induz a formação de NET, mas algumas cepas virulentas escapam das NETs por um mecanismo até então não caracterizado (192,193). Curiosamente, várias nucleases foram descritas como efetores bacterianos do T6SS (194). Nosso resultado mostra que o DeoC pode interagir com VgrG4-CTD, sugerindo que o DeoC pode ser um efetor do T6SS de *K. pneumoniae* envolvido na degradação de NET.

**Tabela 1: Os principais *hits* identificados como possíveis parceiros de interação da VgrG4-CTD. emPAI se refere aos parâmetros de identificação no banco de dados MASCOT.**

<b>Família</b>	<b>Descrição</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Massa (Da)</b>	<b>Número de correspondências significativas</b>	<b>Número de sequências significativas</b>	<b>emPAI</b>
1	<b>RplI (50S ribosomal protein L9 GenerplI)</b>	CDO16561.1	136	15783	6	6	2.76
2	<b>DeoC (Deoxyribose-phosphate aldolase)</b>	CDO14568.1	492	27398	14	8	2.21
3	<b>RplJ (50S ribosomal protein L10)</b>	CDO16220.1	314	17846	8	5	1.66
4	<b>OmpA (Outer membrane protein A)</b>	CDO13836.1	722	40299	17	9	1.44
5	<b>SodA (Superoxide dismutase)</b>	CDO14843.1	226	21192	7	5	1.3
6	<b>Pgk (Phosphoglycerate kinase)</b>	CDO12497.1	294	41279	10	8	1.19
7	<b>AcpP (Acyl carrier protein)</b>	CDO13935.1	59	8634	3	2	1.16
8	<b>Ef-tu (Elongation factor Tu)</b>	CDO16225.1	469	43390	12	7	1.11
9	<b>GapA (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)</b>	CDO14085.1	334	35620	9	7	1.02

## 5. CONCLUSÕES:

A partir dos dados expostos aqui, conseguimos obter informações relevantes sobre o papel da VgrG4-CTD e do T6SS de *K. pneumoniae*. Foi mostrado que VgrG4-CTD é capaz de interagir com proteínas do citoesqueleto, possibilitando à bactéria modular o citoesqueleto de macrófagos. Além disso, VgrG4-CTD se mostrou importante na interação com células do epitélio pulmonar, facilitando a associação da bactéria em células não fagocíticas, o pode ser uma vantagem importante pois já foi mostrado que *K. pneumoniae* é capaz de migrar através do epitélio (176). Por último, a capacidade da VgrG4-CTD de interagir com possíveis proteínas efetoras bacterianas mostra um papel adicional de carrear outras moléculas que podem atuar em conjunto com a VgrG4-CTD na modulação de vias importantes do hospedeiro. Esses dados em conjunto reforçam a hipótese de que *K. pneumoniae* usa o T6SS e as proteínas que o compõem e que são secretadas por ele para interagir e manipular proteínas do hospedeiro em prol do estabelecimento da infecção.

## 6. PERSPECTIVAS

Visando complementar os dados acima, estamos realizando e pretendemos realizar experimentos adicionais num futuro próximo. Entre outubro e dezembro de 2019, numa colaboração com a Dra. Julia Chamot-Rooke e o Dr. Martial Rey do Laboratório *Mass Spectrometry for Biology (UTechS MSBio)* no Instituto Pasteur realizei ensaios de *crosslinking* acoplados a espectrometria de massas, usandoo reagente DIP3 e a proteína VgrG4-CTD. Nesses experimentos, visamos levantar informações sobre aspectos da estrutura tridimensional da VgrG4-CTD relevantes para sua função, bem como mapear a interface de interação de VgrG4-CTD e actina e ainda, identificar ligantes da VgrG4-CTD em ensaios de *crosslinking in vivo* com células A549. As amostras para estes experimentos já foram preparadas durante minha estadia no Instituto Pasteur, porém os dados ainda estão sendo analisados.

Além disso, pretendemos repetir os ensaios já feitos com a extensão C-terminal da proteína VgrG4, porém utilizando a proteína recombinante VgrG4 inteira, que foi recentemente obtida pelo nosso grupo. O estudo da VgrG4-CTD tem sido importante, pois a Vgr4 é uma proteína muito grande, o que dificulta a realização de diversos ensaios experimentais. Ainda, essa região C-terminal que temos estudado é específica de *K. pneumoniae*, o que também reforça a importância de seu estudo. Contudo, a estrutura e função de um domínio proteico pode ser afetada por interações com outros domínios da mesma proteína e os sítios de interação disponíveis para ligantes também podem ser afetados quando analisamos apenas um domínio de uma proteína. Assim, a partir de agora também iremos realizar ensaios com a VgrG4 completa, possibilitando uma visão mais abrangente sobre interações que possam acontecer *in vivo*. Ainda, avaliaremos a interação da VgrG4-CTD e VgrG4 com outros componentes do T6SS, como as proteínas Hcp, PAAR e Pld, assim como avaliaremos se essas outras proteínas também apresentam algum fenótipo específico na interação com células eucarióticas.

## Referências Bibliográficas:

1. Brisse S, Grimont F, Grimont P a D. The Genus *Klebsiella* Taxonomic History and Structure. **Prokaryotes**. 2006;159–96.
2. Bagley ST. *Klebsiella* Species Habitat Association. **Cambridge Univ Press**. 1985;6(2):52–8.
3. Carramaschi Isabel ZV. Dípteros Muscoides como Veiculadores de Bactérias Resistentes aos Antimicrobianos ISABEL NOGUEIRA CARRAMASCHI Rio de Janeiro Setembro de 2019. Tese Doutorado (Biodiversidade e Saude) - Fiocruz. 2019;
4. Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clin Microbiol Rev**. 1998;11(4):589–603.
5. Bengoechea A, Pessoa JS. *Klebsiella pneumoniae* Infection Biology: Living to Counteract Host Defences. **FEMS Microbiol Rev**. 2019;(September 2018):123–44.
6. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. **Virulence**. 2013;4(2):107–18.
7. A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos JTW and DLM. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions. **J Bacteriol**. 2011;10.
8. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. **Front Public Heal**. 2019;7(JUN):1–25.
9. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol**. 2017;7(NOV).
10. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. **N Engl J**

- Med.** 2014;370(13):1198–208.
11. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-Associated Pneumonia in the ICU. **Crit Care.** 2014;18(2):1–8.
  12. ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20: Avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018 [Internet]. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria.** 2018 [cited 2020 Feb 7]. p. 9. Available from: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjojODkzMzNiYmQtYWWRkYi00NzRmLWI1ZGQtYjI5NGEzNjk1YTE0IiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>
  13. Yinnon AM, Butnaru A, Raveh D, Jerassy Z, Rudensky B. *Klebsiella* bacteraemia: Community versus nosocomial infection. **QJM - Mon J Assoc Physicians.** 1996;89(12):933–41.
  14. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JDD, Laupland KB. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **Am J Med.** 2009;122(9):866–73.
  15. Montgomerie JZ, Ota JK. *Klebsiella* Bacteremia. **Arch Intern Med.** 1980;140(4):525–7.
  16. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted Into The Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. **Infect Immun.** 2013;81(8):3009–17.
  17. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front Cell Infect Microbiol.** 2018;8(JAN):1–15.
  18. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic Analysis of Diversity, Population Structure, Virulence, and Antimicrobial Resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an Urgent Threat to Public Health. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2015;112(27):E3574–81.
  19. Henson SP, Boinett CJ, Ellington MJ, Kagia N, Mwarumba S, Nyongesa S, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Invasive Infections Over a Decade at Kilifi County Hospital in Kenya. **Int J Med Microbiol.** 2017;307(7):422–

- 9.
20. Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, et al. Complete Genome Sequence of the N<sub>2</sub>-Fixing Broad Host Range Endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and Virulence Predictions Verified in Mice. **PLoS Genet.** 2008;4(7).
  21. Bi D, Jiang X, Sheng ZK, Ngmenterebo D, Tai C, Wang M, et al. Mapping the Resistance-Associated Mobilome of a Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Reveals Insights Into Factors Shaping These Regions and Facilitates Generation of a “Resistance-Disarmed” Model Organism. **J Antimicrob Chemother.** 2015;70(10):2770–4.
  22. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. **Trends Microbiol.** 2016;xx:1–13.
  23. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: the WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. **Lancet Infect Dis.** 2017;3099(17):1–10.
  24. Bönemann G, Pietrosiuk A, Mogk A. Tubules and Donuts: A Type VI Secretion Story: MicroReview. **Mol Microbiol.** 2010;76(4):815–21.
  25. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the Epidemiology and the Threat of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC) Resistance. **Infect Drug Resist.** 2012;5(1):133–41.
  26. Kojima S, Nikaido H. Permeation Rates of Penicillins Indicate that *Escherichia coli* Porins Function Principally as Nonspecific Channels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013;110(28):2629–34.
  27. Vargiu A V., Nikaido H. Multidrug Binding Properties of the AcrB Efflux Pump Characterized by Molecular Dynamics Simulations. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012;109(50):20637–42.
  28. Tran QT, Williams S, Farid R, Erdemli G, Pearlstein R. The Translocation Kinetics of Antibiotics Through Porin OmpC: Insights From Structure-Based Solvation Mapping Using WaterMap. **Proteins Struct Funct Bioinforma.** 2013;81(2):291–9.

29. Tamber S, Hancock REW. On the Mechanism of Solute Uptake in *Pseudomonas*. **Front Biosci.** 2003;8, s472-48:472–83.
30. Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Pagès JM, Davin-Regli A. An Adaptive Response of *Enterobacter aerogenes* to Imipenem: Regulation of Porin Balance in Clinical Isolates. **Int J Antimicrob Agents.** 2013;41(2):130–6.
31. Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and Conjugative Elements: Mosaic Mobile Genetic Elements Enabling Dynamic Lateral Gene Flow. **Nat Rev Microbiol.** 2010;8(8):552–63.
32. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nat Rev Microbiol.** 2015;13(1):42–51.
33. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative Bacteria: The Role of High-Risk Clones in the Dissemination of Antibiotic Resistance. **FEMS Microbiol Rev.** 2011;35(5):736–55.
34. Wright GD. Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification. **Adv Drug Deliv Rev.** 2005;57(10):1451–70.
35. Ko KS. The Contribution of Capsule Polysaccharide Genes to Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence.** 2016;0(0):1–7.
36. Pan YJ, Lin TL, Chen YH, Hsu CR, Hsieh PF, Wu MC, et al. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by *wzc* Sequencing. **PLoS One.** 2013;8(12).
37. Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, Uchida K, Tsujimoto S, Yamaguchi K. Induction of Interleukin-10 and Down-Regulation of Cytokine Production by *Klebsiella pneumoniae* Capsule in Mice with Pulmonary Infection. **J Med Microbiol.** 2001;50(5):456–61.
38. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters in 79 Capsular Types of *Klebsiella* spp. **Sci Rep.** 2015;5(October 2014):1–10.
39. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: A New Invasive Syndrome. **Lancet Infect Dis.** 2012;12(11):881–7.
40. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong

- Defense. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2016;80(3):629–61.
41. Frirdich E, Whitfield C. Lipopolysaccharide Inner Core Oligosaccharide Structure and Outer Membrane Stability in Human Pathogens Belonging to the Enterobacteriaceae. **J Endotoxin Res.** 2005;11(3):133–44.
  42. Raetz CRH, Guan Z, Ingram BO, Six DA, Song F, Wang X, et al. Discovery of New Biosynthetic Pathways: The Lipid A Story. **J Lipid Res.** 2009;50(SUPPL.):103–8.
  43. Cai S, Batra S, Shen L, Wakamatsu N, Jeyaseelan S. Both TRIF- and MyD88-Dependent Signaling Contribute to Host Defense against Pulmonary *Klebsiella* Infection . **J Immunol.** 2009;183(10):6629–38.
  44. Standiford LR, Standiford TJ, Newstead MJ, Zeng X, Ballinger MN, Kovach MA, et al. TLR4-Dependent GM-CSF Protects Against Lung Injury in Gram-negative Bacterial Pneumonia. **Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.** 2012;302(5).
  45. Branger J, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, et al. Role of Toll-Like Receptor 4 in Gram-Positive and Gram-Negative Pneumonia in Mice. **Infect Immun.** 2004;72(2):788–94.
  46. Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Resistance to Complement-Mediated Killing. **Infect Immun.** 1992;60(6):2529–35.
  47. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2007;71(3):413–51.
  48. Bullen JJ, Rogers HJ GE. Iron Binding Proteins and Infection. **Br J Haematol.** 1972;(1968):1969–72.
  49. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: A Long Way to Go Towards Understanding This Enigmatic Jet-Setter. **F1000Prime Rep.** 2014;6(August).
  50. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* During Pneumonia. **MBio.** 2012;3(6):1–8.
  51. Klemm P, Schembri MA. Fimbrial Surface Display Systems in Bacteria: From Vaccines to Random Libraries. **Microbiology.** 2000;146(12):3025–32.

52. Schurtz Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of The Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* Strains. **Infect Immun.** 1998;66(6):2887–94.
53. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation During Colonization and Infection and Impact on Virulence. **Infect Immun.** 2008;76(9):4055–65.
54. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of The Role of Fimbriae in Pathogenicity. **Infect Immun.** 2009;77(11):5016–24.
55. Würker M, Beuth J, Ko HL, Przondo-Mordarska A, Pulverer G. Type of Fimbriation Determines Adherence of *Klebsiella* Bacteria to Human Epithelial Cells. **Zentralblatt fur Bakteriolog.** 1990;274(2):239–45.
56. Chen JH, Siu LK, Fung CP, Lin JC, Yeh KM, Chen TL, et al. Contribution of Outer Membrane Protein K36 to Antimicrobial Resistance and Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** 2010;65(5):986–90.
57. March C, Moranta D, Regueiro V, Llobet E, Tomas A, Garmendia J, et al. *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Protein A is Required to Prevent the Activation of Airway Epithelial Cells. **J Biol Chem.** 2011;286(12):9956–67.
58. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clin Microbiol Rev.** 2013;26(2):185–230.
59. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010;54(1):177–83.
60. Riquelme S, Varas M, Valenzuela C, Velozo P, Chahin N, Aguilera P, et al. Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for *Salmonella Typhimurium* to Survive Intracellularly in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. **Front Microbiol.** 2016;7(August):1–10.
61. Russell AB, Wexler AG, Harding BN, Whitney JC, Bohn AJ, Goo YA, et al. A Type

- VI Secretion-Related Pathway in Bacteroidetes Mediates Interbacterial Antagonism. **Cell Host Microbe**. 2014;16(2):227–36.
62. Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. **Front Cell Infect Microbiol**. 2016;6(June).
63. Green ER, Meccas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. **Microbiol Spectr**. 2016;4(1):1–32.
64. Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Genomes Identifies a Phospholipase D Family Protein as a Novel Virulence Factor. **BMC Biol**. 2014;12(1):41.
65. Natale P, Brüser T, Driessen AJM. Sec- and Tat-Mediated Protein Secretion Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane-Distinct Translocases and Mechanisms. **Biochim Biophys Acta - Biomembr**. 2008;1778(9):1735–56.
66. Thomas S, Holland IB, Schmitt L. The Type 1 Secretion Pathway - The Hemolysin System and Beyond. **Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res**. 2014;1843(8):1629–41.
67. Boyd CD, Smith TJ, El-kirat-chatel S, Newell PD. Structural Features of the *Pseudomonas fluorescens* Biofilm Adhesin LapA Required for LapG-Dependent Cleavage, Biofilm Formation, and Cell Surface Localization. **J Bacteriol**. 2014;196(15):2775–88.
68. Konstantin V. Korotkov, Maria Sandkvist and WGJH. The Type II Secretion System: Biogenesis, Molecular Architecture. **Nat Rev Microbiol**. 2010;462(7274):745–56.
69. Gawarzewski I, Smits SHJ, Schmitt L, Jose J. Structural Comparison of the Transport Units of Type V Secretion Systems. **Biol Chem**. 2013;394(11):1385–98.
70. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, et al. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. **Front Microbiol**. 2019;10(JUN).
71. Houben ENG, Bestebroer J, Ummels R, Wilson L, Piersma SR, Jiménez CR, et al. Composition of The Type VII Secretion System Membrane Complex. **Mol**

- Microbiol.** 2012;86(2):472–84.
72. Burdette LA, Leach SA, Wong HT, Ercek DT. Developing Gram - negative Bacteria for the Secretion of Heterologous Proteins. **Microb Cell Fact.** 2018;1–16.
  73. de Diego I, Ksiazek M, Mizgalska D, Koneru L, Golik P, Szmigielski B, et al. The Outer-Membrane Export Signal of *Porphyromonas gingivalis* Type IX Secretion System (T9SS) is a Conserved C-terminal Beta-Sandwich Domain. **Sci Rep.** 2016;6(October 2015):23123.
  74. Veith PD, Glew MD, Gorasia DG, Reynolds EC. Micro Review Type IX Secretion : The Generation of Bacterial Cell Surface Coatings Involved in Virulence, Gliding Motility and the Degradation of Complex Biopolymers. **Mol Microbiol.** 2017;106(August):35–53.
  75. Büttner D. Protein Export According to Schedule: Architecture , Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2012;76(2):262–310.
  76. Brianne J. Burkinshaw NCJS. Assembly and Structure of the T3SS. **BBA - Mol Cell Res.** 2014;1843(1):2–12.
  77. Seubert A, Hiestand R, De La Cruz F, Dehio C. A Bacterial Conjugation Machinery Recruited for Pathogenesis. **Mol Microbiol.** 2003;49(5):1253–66.
  78. Souza DP, Oka GU, Alvarez-martinez CE, Bisson-filho AW, Dunger G, Hobeika L, et al. Bacterial Killing Via a Type IV Secretion System. **Nat Commun.** 2015;1–9.
  79. Shneider MM, Buth SA, Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ, Leiman PG. PAAR- Repeat Proteins Sharpen and Diversify the Type VI Secretion System Spike. **Nature.** 2013;500(7462):350–3.
  80. Tseng T, Tyler BM, Setubal JC. Protein Secretion Systems in Bacterial-Host Associations, and Their Description in the Gene Ontology. **BMC Microbiol.** 2009;9:1–9.
  81. Mobley CJA and HLT. The Versatile Type VI Secretion System. **Microbiol Spectr.** 2015;4(2):37–54.
  82. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, et al.

- Identification of a Conserved Bacterial Protein Secretion System in *Vibrio cholerae* Using the Dictyostelium Host Model System. **Proc Natl Acad Sci.** 2006;103(5):1528–33.
83. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion Systems in Gram-negative Bacteria: Structural and Mechanistic Insights. **Nat Rev Microbiol.** 2015;13(6):343–59.
84. Silverman J, Brunet Y. Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. **Annu Rev Microbiol.** 2012;453–72.
85. Nazarov S, Schneider JP, Brackmann M, Goldie KN, Stahlberg H, Basler M. Cryo-EM Reconstruction of Type VI Secretion System Baseplate and Sheath Distal End. **EMBO J.** 2017;e201797103.
86. Kudryashev M, Wang RYR, Brackmann M, Scherer S, Maier T, Baker D, et al. Structure of the Type VI Secretion System Contractile Sheath. **Cell.** 2015;160(5):952–62.
87. Durand E, Nguyen VS, Zoued A, Logger L, Péhau-Arnaudet G, Aschtgen M-S, et al. Biogenesis and Structure of a Type VI Secretion Membrane Core Complex. **Nature.** 2015;25–8.
88. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, Pukatzki S, et al. Type VI Secretion Apparatus and Phage Tail-Associated Protein Complexes Share a Common Evolutionary Origin. **Proc Natl Acad Sci.** 2009;106(11):4154–9.
89. Durand E, Derrez E, Audoly G, Spinelli S, Ortiz-Lombardia M, Raoult D, et al. Crystal Structure of the VgrG1 Actin Cross-Linking Domain of the *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System. **J Biol Chem.** 2012;287(45):38190–9.
90. Zoued A. TssA: The Cap Protein of the Type VI Secretion System Tail. **Insights Perspect.** 2017;1600262:1–9.
91. Rapisarda C, Cherrak Y, Kooger R, Schmidt V, Pellarin R, Logger L, et al. In Situ and High-Resolution Cryo-EM Structure of a Bacterial Type VI Secretion System Membrane Complex. **EMBO J.** 2019;1–18.
92. Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, Davidson AR. The Phage Lambda Major Tail Protein Structure Reveals a Common Evolution for Long-Tailed Phages

- and the Type VI Bacterial Secretion System. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009;106(11):4160–5.
93. Surfaces SSN, Lee CS, Au FCK, Tong SY, Lee ST, Series N. A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. **Am Assoc Adv Sci.** 2015;299(5614):1874–7.
  94. Lim YT, Jobichen C, Wong J, Limmathurotsakul D, Li S, Chen Y, et al. Extended Loop Region of Hcp1 is Critical for the Assembly and Function of Type VI Secretion System in *Burkholderia pseudomallei*. **Sci Rep.** 2015;1–10.
  95. Kube S, Kapitein N, Zimniak T, Herzog F, Mogk A, Wendler P. Structure of the VipA / B Type VI Secretion Complex Suggests a Contraction-State-Specific Recycling Mechanism. **CellReports.** 2014;8(1):20–30.
  96. Cascales E, Cambillau C. Structural Biology of Type VI Secretion Systems. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2012;367(1592):1102–11.
  97. Russell AB, Leroux M, Hathazi K, Agnello DM, Wiggins PA, Wai SN, et al. Diverse Type VI Secretion Phospholipases Are Functionally Plastic Antibacterial Effectors. **Nature.** 2013;496(7446):508–12.
  98. Brunet YR, Zoued A, Boyer F, Douzi B, Cascales E. The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. **PLoS Genet.** 2015;11(10):1–21.
  99. Cherrak Y, Rapisarda C, Pellarin R, Bouvier G, Bardiaux B, Allain F, et al. Biogenesis and Structure of a Type VI Secretion Baseplate. **Nat Microbiol.** 2018;
  100. 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. **EMBO J.** 2009;28(4):315–25.
  101. Mekalanos MB and JJ. Type 6 Secretion Dynamics Within and Between Bacterial Cells. **Science** (80- ). 2012;(August):2115.
  102. Kapitein N, Bönemann G, Pietrosiuk A, Seyffer F, Hausser I, Locker JK, et al. ClpV Recycles VipA/VipB Tubules and Prevents Non-Productive Tubule Formation to Ensure Efficient Type VI Protein Secretion. **Mol Microbiol.** 2013;87(5):1013–28.

103. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A View to a Kill: The Bacterial Type 6 Secretion System. **Cell Host Microbe**. 2014;15(1):9–21.
104. Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. **Trends Microbiol**. 2016;24(1):51–62.
105. Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, Desvaux M. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. **Front Microbiol**. 2019;10(FEB).
106. Koskiniemi S, Lamoureux JG, Nikolakakis KC, De Roodenbeke CTK, Kaplan MD, Low DA, et al. Rhs Proteins From Diverse Bacteria Mediate Intercellular Competition. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013;110(17):7032–7.
107. Dong TG, Ho BT, Yoder-himes DR, Mekalanos JJ. Identification of T6SS-Dependent Effector and Immunity Proteins by Tn-Seq in *Vibrio cholerae*. **PNAS**. 2013;110(7).
108. Hood RD, Singh P, Hsu F, Güvener T, Carl MA, Trinidad RS, et al. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. **Cell Host Microbe**. 2010;7(1):25–37.
109. Brooks TM, 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. **J Biol Chem**. 2013;288(11):7618–25.
110. Yang X, Long M, Shen X. Effector–Immunity Pairs Provide the T6SS Nanomachine its Offensive and Defensive Capabilities. **Molecules**. 2018;23(5).
111. Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Mougous JD. Type VI Secretion Delivers Bacteriolytic Effectors to Target Cells. **Nature**. 2012;475(7356):343–7.
112. Whitney JC, Chou S, Russell AB, Biboy J, Gardiner TE, Ferrin MA, et al. Identification, Structure, and Function of a Novel Type VI Secretion Peptidoglycan Glycoside Hydrolase. **J Biol Chem VOL**. 2013;288(37):26616–24.
113. Liang X, Moore R, Wilton M, Wong MJQ, Lam L, Dong TG. Identification of Divergent Type VI Secretion Effectors Using a Conserved Chaperone Domain. **Proc Natl Acad Sci**. 2015;201505317.

114. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. **Cell Host Microbe**. 2014;15(5):600–10.
115. Miyata ST, Unterweger D, Rudko SP, Pukatzki S. Dual Expression Profile of Type VI Secretion System Immunity Genes Protects Pandemic *Vibrio cholerae*. **PLoS Pathog**. 2013;9(12).
116. Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y, Filloux A. The VgrG Proteins Are “à la carte” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effectors. **J Biol Chem**. 2014;289(25):17872–84.
117. Sarris PF, Zoumadakis C, Panopoulos NJ, Scoulica E V. Distribution of The Putative Type VI Secretion System Core Genes in *Klebsiella* spp. **Infect Genet Evol**. 2011;11(1):157–66.
118. Durand E, Cambillau C, Cascales E, Journet L. VgrG, Tae, Tle, and Beyond: The Versatile Arsenal of Type VI Secretion Effectors. **Trends Microbiol**. 2014;22(9):498–507.
119. Ma L, Hachani A, Lin J, Filloux A, Lai E. *Agrobacterium tumefaciens* Deploys a Superfamily of Type VI Secretion DNase Effectors as Weapons for Interbacterial Competition In Planta. **Cell Host Microbe**. 2014;16(1):94–104.
120. Zhang J, Zhang H, Gao Z, Hu H, Dong C, Dong YH. Structural Basis for Recognition of the Type VI Spike Protein VgrG3 by a Cognate Immunity Protein. **FEBS Lett**. 2014;588(10):1891–8.
121. Coyne MJ, Comstock LE. Type VI Secretion Systems and the Gut Microbiota. **Microbiol Spectr**. 2019;7(2):1–7.
122. Hachani A, Wood TE, Filloux A. Type VI Secretion and Anti-Host Effectors. **Curr Opin Microbiol**. 2016;29:81–93.
123. Yang Fu, Matthew K. Waldor JJM. Tn-Seq Analysis of *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization Reveals a Role for T6SS-Mediated Antibacterial Activity in the Host. **Cell Host Microbe**. 2014;14(6):652–63.
124. Wang M, Cao H, Wang Q, Xu T, Guo X. The Roles of Two Type VI Secretion Systems in *Cronobacter sakazakii*. **Front Cell Infect Microbiol**.

- 2018;9(October):1–8.
125. Shrivastava S, Mande SS. Identification and Functional Characterization of Gene Components of Type VI Secretion System in Bacterial Genomes. **PLoS One**. 2008;3(8).
  126. Chiang W, Carl MA, Hood RD, Schwarz S, West TE. *Burkholderia* Type VI Secretion Systems Have Distinct Roles in Eukaryotic and Bacterial Cell Interactions. **PLoS Pathog**. 2010;6(8).
  127. Filloux A, Hachani A, Bleves S. The Bacterial Type VI Secretion Machine: Yet Another Player for Protein Transport Across Membranes. **Microbiology**. 2008;1570–83.
  128. Pace F De, Nakazato G, Pacheco A, Paiva JB De, Sperandio V, Dias W. The Type VI Secretion System Plays a Role in Type 1 Fimbria Expression and Pathogenesis of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain □ †. **Infect Immun**. 2010;78(12):4990–8.
  129. Liu L, Hao S, Lan R, Wang G, Xiao D, Sun H. The Type VI Secretion System Modulates Flagellar Gene Expression and Secretion in *Citrobacter freundii* and Contributes to Adhesion and Cytotoxicity to Host Cells. **Infect Immun**. 2015;83(7):2596–604.
  130. Bernard CS, Bentzmann S De, Cascales E. SciN Is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enteroaggregative *Escherichia coli* □. **J Bacteriol**. 2008;190(22):7523–31.
  131. Ma J, Bao Y, Sun M, Dong W, Pan Z, Zhang W, et al. Two Functional Type VI Secretion Systems in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Are Involved in Different Pathogenic Pathways. **Infect Immun**. 2014;82(9):3867–79.
  132. Amy T. Ma, Stevem McAuley SP and JJM. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. **Cell**. 2010;48(Suppl 2):1–6.
  133. Heisler DB, Kudryashova E, Grinevich DO, Suarez C, Winkelman JD, Birukov KG, et al. ACD Toxin-Produced Actin Oligomers Poison Formin-Controlled Actin. **Science** (80- ). 2015;349(6247):535–9.

134. Ma AT, Mekalanos JJ. In Vivo Actin Cross-Linking Induced by *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System is Associated With Intestinal Inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010;107(9):4365–70.
135. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, Termine E, et al. The Second Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells. **J Biol Chem**. 2012;287(32):27095–105.
136. Sana TG, Baumann C, Merdes A, Soscia C, Rattei T, Hachani A, et al. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. **MBio**. 2015;6(3):1–11.
137. Rosales-reyes R, Skeldon AM, Aubert DF, Valvano MA. The Type VI Secretion System of *Burkholderia cenocepacia* Affects Multiple Rho Family GTPases Disrupting the Actin Cytoskeleton and the Assembly of NADPH Oxidase Complex in Macrophages. **Cell Microbiol**. 2012;14(November 2011):255–73.
138. Aubert DF, Flannagan RS, Valvano MA. A Novel Sensor Kinase-Response Regulator Hybrid Controls Biofilm Formation and Type VI Secretion System Activity in *Burkholderia cenocepacia* □. **Infect Immun**. 2008;76(5):1979–91.
139. Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. Genetic and Biochemical Analyses of a Eukaryotic-Like Phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* Suggest Horizontal Acquisition and a Role for Persistence in a Chronic Pulmonary Infection Model. **Mol Microbiol**. 2001;3939(2), 2.
140. Miyata ST, Kitaoka M, Brooks TM, McAuley SB, Pukatzki S. *Vibrio cholerae* Requires the Type VI Secretion System Virulence Factor VasX to Kill *Dictyostelium discoideum*. **Infect Immun**. 2011;79(7):2941–9.
141. Zheng J, Ho B, Mekalanos JJ. Genetic Analysis of Anti-Amoebae and Anti-Bacterial Activities of the Type VI Secretion System in *Vibrio cholerae*. **PLoS One**. 2011;6(8).
142. Wang T, Si M, Song Y, Zhu W, Gao F, Wang Y. Type VI Secretion System Transports Zn<sup>2+</sup> to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. **PLoS Pathog**. 2015;1–25.

143. Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-For-Tat: Type VI Secretion System Counterattack During Bacterial Cell-Cell Interactions. **Cell**. 2013;152(4):884–94.
144. Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, Lam LH, Jacobson A, Baylot V, et al. *Salmonella typhimurium* Utilizes a T6SS-Mediated Antibacterial Weapon to Establish in The Host Gut. **Proc Natl Acad Sci**. 2016;201608858.
145. Li B, Ge M, Zhang Y, Wang L, Ibrahim M, Wang Y, et al. New Insights Into Virulence Mechanisms of Rice Pathogen *Acidovorax avenae subsp. avenae* Strain RS-1 Following Exposure to  $\beta$ -lactam Antibiotics. **Nat Publ Gr**. 2016;(February):1–12.
146. Liu L, Ye M, Li X, Li J, Deng Z, Yao Y-F, et al. Identification and Characterization of an Antibacterial Type VI Secretion System in the Carbapenem-Resistant Strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. **Front Cell Infect Microbiol**. 2017;7(October):1–8.
147. Hsieh P-F, Lu Y-R, Lin T-L, Lai L-Y, Wang J-T. *Klebsiella pneumoniae* Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and In Vivo Colonization. **J Infect Dis**. 2018;
148. Vanrheenen SM, Dume G, Isberg RR. IcmF and DotU Are Required for Optimal Effector Translocation and Trafficking of the *Legionella pneumophila* Vacuole. **Infect Immun**. 2004;72(10):5972–82.
149. Augusto V, Barbosa A, Miranda L, Lery S. Insights Into *Klebsiella pneumoniae* Type VI Secretion System Transcriptional Regulation. **BMC Genomics**. 2019;1–12.
150. Nassif X, Sansonetti PJ. Correlation of The Virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 With the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. **Infect Immun**. 1986;54(3):603–8.
151. Riottot M. Direct Evidence for the Involvement of Capsular Polysaccharide in the Immunoprotective Activity of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**. 1981;31(1):71–7.
152. Nassif X, Fournier JM, Arondel J, Sansonetti PJ. Mucoid Phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a Plasmid-Encoded Virulence Factor. **Infect Immun**. 1989;57(2):546–52.

153. Soares T do N, Lery L. Identificação de Ligantes da Proteína VgrG de *Klebsiella pneumoniae*: Hipóteses Sobre a Atividade do Sistema de Secreção do Tipo VI. Monogr Ciencias Biol - UERJ - Rio Janeiro. 2017;
154. Flaugnatti N, Le TTH, Canaan S, Aschtgen MS, Nguyen VS, 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.** 2016;99(6):1099–118.
155. Suarez G, Sierra JC, Erova TE, Sha J, Horneman AJ, Chopra AK. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, From *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. **J Bacteriol.** 2010;192(1):155–68.
156. Zheng J, Shin OS, Cameron DE, Mekalanos JJ. Quorum Sensing and a Global Regulator TsrA Control Expression of Type VI Secretion and Virulence in *Vibrio cholerae*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010;107(49):21128–33.
157. Aubert DF, Hu S, Valvano MA. Quantification of Type VI Secretion System Activity in Macrophages Infected With *Burkholderia cenocepacia*. **Microbiol (United Kingdom).** 2015;161(11):2161–73.
158. Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, et al. Raf-1-Associated Protein phosphatase 2A as a Positive Regulator of Kinase Activation. **J Biol Chem.** 2000;275(29):22300–4.
159. Watkins GR, Wang N, Mazaloukas MD, Gomez RJ, Guthrie CR, Kraemer BC, et al. Monoubiquitination Promotes Calpain Cleavage of the Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulatory Subunit 4, Altering PP2A Stability and Microtubule-Associated Protein Phosphorylation. **J Biol Chem.** 2012;287(29):24207–15.
160. Valadares VS. Caracterização Estrutural da Região Intrinsecamente Desordenada da Proteína VgrG do Sistema de Secreção Tipo VI de *Klebsiella pneumoniae*. Monogr Ciencias Biol. 2017;
161. Eisenreich W, Heesemann J, Rudel T, Goebel W. Metabolic Host Responses to Infection by Intracellular Bacterial Pathogens. In: Metabolic Interaction in Infection. 2013. p. 1–22.

162. Nury C, Redeker V, Dautrey S, Romieu A, Rest V Der, Renard P, et al. A Novel Bio-Orthogonal Cross-Linker for Improved Protein / Protein Interaction Analysis. **Anal Chem.** 2014;
163. Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the Role of Proteoglycans in Cation-Mediated Gene Transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1996;93(October):12349–54.
164. Dalkara D, Guerin K, Kolstad KD, Visel M, Hoffmann N, Schaffer D V, et al. Changes in Adeno-Associated Virus-Mediated Gene. **Hum Gene Ther.** 2010;578(May):571–8.
165. Zelphati O, Wang Y, Kitada S, Reed JC, Felgner PL, Corbeil J. Intracellular Delivery of Proteins with a New Lipid-mediated Delivery System. **J Biol Chem.** 2001;276(37):35103–10.
166. Mak T, Brüggemann H. Vimentin in Bacterial Infections. **Cells.** 2016;5(2):18.
167. Chi F, Jong TD, Wang L, Ouyang Y, Wu C, Li W, et al. Vimentin-Mediated Signalling is Required for IbeA+ *E. coli* K1 Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Vimentin-Mediated Signalling is Required for IbeA+ *E. coli* K1 Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **Biochem J.** 2010;427(1):79–90.
168. Zou Y, He L, Huang SH. Identification of a Surface Protein on Human Brain Microvascular Endothelial Cells as Vimentin Interacting With *Escherichia coli* Invasion Protein IbeA. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006;351(3):625–30.
169. Murli S, Watson RO, Gala JE. Role of Tyrosine Kinases and the Tyrosine Phosphatase SptP in the Interaction of *Salmonella* With Host Cells. **Cell Microbiol.** 2001;3.
170. Guignot J, Servin AL. Maintenance of the Salmonella-Containing Vacuole in the Juxtannuclear Area: A Role for Intermediate Filaments. **Microb Pathog.** 2008;45(5–6):415–22.
171. Diner EJ, Beck CM, Webb JS, Low DA, Hayes CS. Identification of a Target Cell Permissive Factor Required for Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI). **Genes Dev.** 2012;(Cdi):515–25.
172. Srinivasa S, Ding X, Kast J. Formaldehyde Cross-Linking and Structural

- Proteomics: Bridging the Gap. **METHODS**. 2015;
173. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007;104(39):15508–13.
  174. Weill CO, Biri S, Adib A, Erbacher P. A Practical Approach For Intracellular Protein Delivery. **Cytotechnology**. 2008;56(1):41–8.
  175. Cano V, March C, Insua JL, Aguiló N, Llobet E, Moranta D, et al. *Klebsiella pneumoniae* Survives Within Macrophages by Avoiding Delivery to Lysosomes. **Cell Microbiol**. 2015;17(11):1537–60.
  176. Hsu CR, Pan YJ, Liu JY, Chen CT, Lin TL, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* Translocates Across the Intestinal Epithelium Via Rho GTPase-and Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-Dependent Cell Invasion. **Infect Immun**. 2015;83(2):769–79.
  177. Oelschlaeger TA, Tall BD. Invasion of Cultured Human Epithelial Cells by *Klebsiella pneumoniae* Isolated From the Urinary Tract. **Infect Immun**. 1997;65(7):2950–8.
  178. Wang X, Li J, Chen S, Shen X, Yang X, Teng Y, et al. Knockdown of HMGN2 Increases the Internalization of *Klebsiella pneumoniae* by Respiratory Epithelial Cells Through the Regulation of  $\alpha 5\beta 1$  Integrin expression. **Int J Mol Med**. 2016;38(3):737–46.
  179. Deng LX, Wu GX, Cao Y, Fan B, Gao X, Luo L, et al. The Chromosomal Protein HMGN2 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Expression of  $\beta$ -defensins in A549 Cells. **FEBS J**. 2011;278(12):2152–66.
  180. Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST. The Type VI Secretion System: Translocation of Effectors and Effector-Domains. **Curr Opin Microbiol**. 2009;12(1):11–7.
  181. Henderson B, Martin A. Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins are Virulence Determinants in Infectious Disease. **Infect Immun**. 2011;79(9):3476–91.
  182. Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, et al. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-

- Mediated Transformation. **Cell**. 2006;125(4):749–60.
183. Liu H, Cheng Z, Song W, Wu W, Zhou Z. Immunoproteomic to Analysis the Pathogenicity Factors in Leukopenia Caused by *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **PLoS One**. 2014;9(10):1–5.
  184. Chiu KH, Wang LH, Tsai TT, Lei HY, Liao PC. Secretomic Analysis of Host-Pathogen Interactions Reveals That Elongation Factor-Tu Is a Potential Adherence Factor of *Helicobacter pylori* during Pathogenesis. **J Proteome Res**. 2017;16(1):264–73.
  185. He Y, Wang H, Chen L. Comparative Secretomics Reveals Novel Virulence-Associated Factors of *Vibrio parahaemolyticus*. **Front Microbiol**. 2015;6(JUN):1–9.
  186. Widjaja M, Harvey KL, Hagemann L, Berry IJ, Jarocki VM, Raymond BBA, et al. Elongation Factor Tu is a Multifunctional and Processed Moonlighting Protein. **Sci Rep**. 2017;7(1):1–17.
  187. Boone TJ, Burnham CAD, Tyrrell GJ. Binding of Group B Streptococcal Phosphoglycerate Kinase to Plasminogen and Actin. **Microb Pathog**. 2011;51(4):255–61.
  188. Llobet E, March C, Giménez P, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. **Antimicrob Agents Chemother**. 2009;53(1):298–302.
  189. Martin RM, Cao J, Wu W, Zhao L, Manthei DM, Pirani A, et al. Identification of Pathogenicity-Associated Loci in *Klebsiella pneumoniae* from Hospitalized Patients. **mSystems**. 2018;3(3):1–15.
  190. Tomás A, Lery L, Regueiro V, Pérez-Gutiérrez C, Martínez V, Moranta D, et al. Functional Genomic Screen Identifies *Klebsiella pneumoniae* Factors Implicated in Blocking Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Signaling. **J Biol Chem**. 2015;290(27):16678–97.
  191. Liu J, Sun L, Liu W, Guo L, Liu Z, Wei X, et al. A Nuclease from *Streptococcus mutans* Facilitates Biofilm Dispersal and Escape from Killing by Neutrophil Extracellular Traps. **Cell Infect Microbiol**. 2017;7(March):1–14.
  192. Storisteanu DML, Pocock JM, Cowburn AS, Juss JK, Nadesalingam A, Nizet V, et

- al. Evasion of Neutrophil Extracellular Traps by Respiratory Pathogens. **Perspective**. 2017;56:423–31.
193. Wang L, Shen D, Wu H, Ma Y. Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to Both Intracellular and Extracellular Killing of Neutrophils. **PLoS One**. 2017;1–10.
194. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI Secretion System Effectors: Poisons With a Purpose. **Nat Rev Microbiol**. 2014;12(2):137–48.