



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
*"JULIO DE MESQUITA FILHO"*  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia**  
**Aplicadas à Farmácia**

**PATRICK DA SILVA**

**Estudo da regulação transcricional por YgiV e da interação proteica de VisP na sinalização química e montagem do LPS na patogênese de Salmonella enterica sorovar Typhimurium**

Araraquara - SP

2020

**PATRICK DA SILVA**

**Estudo da regulação transcricional por YgiV e da interação proteica de VisP na sinalização química e montagem do LPS na patogênese de Salmonella enterica sorovar Typhimurium**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Cristiano Gallina Moreira

Araraquara - SP

2020

---

**S586e** Silva, Patrick da.  
Estudo da regulação transcricional por YgiV e da interação proteica de VisP na sinalização química e montagem do LPS na patogênese de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium / Patrick da Silva. – Araraquara: [S.n.], 2020.  
82 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Microbiologia.

Orientadora: Cristiano Gallina Moreira.

1. YgiV. 2. *Salmonella enterica*. 3. Transcrição bacteriana. 4. Regulação metabólica. 5. Fucose. 6. Propanodiol. I. Moreira, Cristiano Gallina, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030081P7**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Estudo da regulação transcricional por YgiV e da interação proteica de VisP na sinalização química e montagem do LPS na patogênese de Salmonella enterica sorovar Typhimurium

**AUTOR: PATRICK DA SILVA**

**ORIENTADOR: CRISTIANO GALLINA MOREIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CRISTIANO GALLINA MOREIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. JULIANA PFRIMER FALCÃO (Participação Virtual)  
Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP

Profa. Dra. ROXANE MARIA FONTES PIAZZA (Participação Virtual)  
Laboratório de Bacteriologia / Instituto Butantan

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 06 de novembro de 2020



*Dedico este trabalho aos meus pais, os quais sempre deram liberdade em minhas decisões e apoio incondicional no caminho que tenho trilhado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, prof. Cristiano Gallina Moreira, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelos conselhos e direcionamentos para realização deste trabalho.

À professora Carol A. Gross e aos pesquisadores Yan Zhang e Horia Todor pela oportunidade de colaboração.

Aos professores Daniel Guariz Pinheiro e Alessandro de Mello Varani pelo ensino de bioinformática.

À FCFar – UNESP, FAPESP (processos nº 2014/06779-2, 2016/12744-2, 2018/22799-4), e Capes pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste trabalho.

***“... com o clarão do raio da silibrina  
desintegro o poder da bactéria.”***

***(Bienal - Zeca Baleiro)***

## RESUMO

Bactérias patogênicas empregam proteínas para responder a estímulos externos e ativar a patogenicidade. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium apresenta a proteína VisP, a qual possui papel importante na resposta a estresse e na ativação das ilhas de patogenicidade SPI-1 e 2 (**S**almonella **P**atogenicity Island 1 and 2). O gene *visP* está contido em um *operon* o qual também apresenta *ygiV*, que codifica um regulador transcricional da família AraC. O presente estudo avaliou e investigou a regulação transcricional realizada por YgiV e sua correlação com o sistema de dois componentes QseBC no processo patogênico. Realizou-se análise transcriptômica do mutante  $\Delta ygiV$  identificando-se 379 genes diferencialmente expressos comparado com a amostra selvagem. Dentre os genes com aumento de expressão em  $\Delta ygiV$ , 33 pertencem a SPI-1 com função de invasão de células epiteliais. A maioria dos genes com expressão reduzida codificam proteínas de catabolismo em geral, de açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos. Foi realizada uma massiva análise *in silico* de predição da função de YgiV, assim como determinação de uma sequência consenso de reconhecimento e interação com o fator de transcrição. Determinou-se uma provável interação de YgiV com a molécula 1,2-propanodiol. Ademais, através da identificação da sequência consenso dos elementos *cis* que sofrem ação reguladora de YgiV, foi predito o provável *regulon* de YgiV. Corroborando os dados de análise transcriptômica, foram identificados genes de SPI-1 e a via de fermentação de fucose à propionato. Ensaio de análise de expressão gênica sob superexpressão de YgiV confirmaram os dados de predição *in silico*. Também foi avaliada a expressão gênica de alguns alvos de SPI-1 e do *operon pdu*, responsável pela degradação de 1,2-propanodiol à propionato. Os resultados mostraram que a atuação natural de YgiV é acentuada em ambiente anaeróbico e que a presença de fucose afeta fortemente o efeito de sua função. Por fim, ensaios de invasão de células HeLa demonstraram que YgiV pode apresentar papel de repressor transcricional, função esta que pode ser

intensificada conforme a concentração de 1,2-propanodiol aumenta. Estes resultados demonstraram o papel de YgiV de regulação transcricional no processo patogênico de invasão de células epiteliais mediado por *S. Typhimurium* e sua relação com açúcares presentes no lúmen intestinal. E que a via de produção de propionato é imprescindível para uma colonização intestinal efetiva por *S. Typhimurium*, processo que depende da regulação por QseBC e YgiV.

**PALAVRAS-CHAVE:** YgiV. *Salmonella enterica*. Transcrição bacteriana. Regulação metabólica. Fucose. Propanodiol.

## ABSTRACT

Pathogenic bacteria employ proteins to respond to external stimuli and activate pathogenicity. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium presents the VisP protein, which plays an important role in the response to stress and in the activation of the pathogenicity islands SPI-1 and 2 (*Salmonella* Patogenicity Island 1 and 2). The *visP* gene is contained in an operon which also has *ygiV*, which encodes an AraC family transcriptional regulator. The present study evaluated and investigated the transcriptional regulation carried out by YgiV and its correlation with the two-component QseBC system. A transcriptomic analysis of the  $\Delta ygiV$  mutant was performed, identifying 379 differentially expressed genes compared to the wild-type. Among the genes with increased expression in  $\Delta ygiV$ , 33 belong to SPI-1 with the role of epithelial cell invasion. Most genes with reduced expression code for catabolism associated proteins in general, as sugar, aminoacids and nucleic acids catabolism. A massive *in silico* analysis was performed to predict YgiV function, as well as the determination of a recognition and transcription factor interaction consensus sequence. A probable YgiV interaction with the 1,2-propanediol molecule was determined. Furthermore, by identifying the consensus sequence of *cis* elements that undergo YgiV regulatory action, the likely YgiV regulon was predicted. Confirming the transcriptomic analysis data, SPI-1 genes and the fucose fermentation pathway to propionate were identified. Gene expression analysis assays under YgiV overexpression confirmed the *in silico* prediction data. The gene expression of some SPI-1 targets and the *pdu operon*, responsible for the degradation of 1,2-propanediol to propionate, was also evaluated. The results showed that the natural performance of YgiV is accentuated in an anaerobic environment and that the presence of fucose strongly affects the effect of its function. Finally, HeLa cell invasion assays have shown that YgiV can play the role of transcriptional repressor, a function that can be enhanced as the 1,2-propanediol concentration increases. These results demonstrated the transcriptional regulation role

of YgiV in in the pathogenic process of epithelial cell invasion mediated by *S. Typhimurium* and its relationship with sugars present in the intestinal lumen. As well as the propionate production pathway being essential for an effective intestinal colonization by *S. Typhimurium*, a process that depends on regulation by QseBC and YgiV.

**KEYWORDS:** YgiV. *Salmonella enterica*. Bacterial transcription. Metabolic regulation. Fucose. Propanediol.

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> Expansão intestinal de <i>S. Typhimurium</i> mediada por metabólitos da microbiota.....	19
<b>Figura 2</b> Organização dos operons <i>qseBC</i> e <i>visP-ygiV</i> em <i>S. Typhimurium</i> .....	20
<b>Figura 3</b> Influência de VisP e as cadeias de antígeno-O na invasão de células epiteliais.....	22
<b>Figura 4</b> Análise da integridade do RNA para sequenciamento de larga escala.....	39
<b>Figura 5</b> Representação global dos genes diferencialmente expressos em $\Delta ygiV$ .....	40
<b>Figura 6</b> Classificação dos genes com expressão aumentada no mutante $\Delta ygiV$ .....	41
<b>Figura 7</b> Expressão de genes da patogênese.....	42
<b>Figura 8</b> Classificação dos genes com expressão reduzida no mutante $\Delta ygiV$ .....	43
<b>Figura 9</b> Validação dos genes com expressão aumentada na análise global.....	44
<b>Figura 10</b> Validação dos genes com expressão reduzida na análise global.....	45
<b>Figura 11</b> Modelo de YgiV de <i>S. Typhimurium</i> .....	46
<b>Figura 12</b> Predição a ligantes de YgiV.....	47
<b>Figura 13</b> Conservação de resíduos nos ortólogos de YgiV.....	48
<b>Figura 14</b> Predição de resíduos de YgiV com potencial para ligarem-se a nucleotídeos.....	50
<b>Figura 15</b> Predição de ligantes ao domínio EMD de YgiV.....	51
<b>Figura 16</b> Conservação de resíduos de EMD com função predita de interação.....	52
<b>Figura 17</b> Elemento <i>cis</i> de interação com YgiV.....	53
<b>Figura 18</b> Confirmação da superexpressão de YgiV.....	55
<b>Figura 19</b> Superexpressão de YgiV nos genes de expressão reduzida em $\Delta ygiV$ .....	56
<b>Figura 20</b> Superexpressão de YgiV nos genes de expressão aumentada em $\Delta ygiV$ .....	57
<b>Figura 21</b> Efeitos da glicose e fucose nos genes de SPI-1 durante anaerobiose.....	58
<b>Figura 22</b> Efeitos da glicose e fucose nos genes de <i>pdu</i> durante anaerobiose.....	59
<b>Figura 23</b> Repressão de <i>pdu</i> por YgiV no crescimento anaeróbico com glicose.....	60
<b>Figura 24</b> Repressão de <i>pdu</i> e SPI-1 por YgiV no crescimento anaeróbico com fucose.....	61

**Figura 25** Inibição da invasão de células HeLa pela superexpressão de YgiV.....62

## **Lista de tabelas e quadros**

<b>Quadro 1</b> Cepas bacterianas utilizadas neste estudo.....	25
<b>Tabela 1</b> <i>Motifs</i> selecionados baseado em análises prévias.....	54

# Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de figuras	
Lista de tabelas e quadros	
Sumário	
1. Introdução.....	14
1.1. Sinalização química via Autoindutor-3/Epinefrina/noraepinefrina.....	15
1.2. Patogenicidade em <i>Salmonella</i> .....	16
1.3. Diversidade energética no lúmen intestinal e seu papel na patogenicidade de <i>S. Typhimurium</i> .....	18
1.4. VisP e YgiV.....	19
1.5. Hipótese de estudo.....	21
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos gerais.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias.....	25
3.2. Extração plasmidial.....	26
3.3. Preparo de bactérias para transformação genética.....	27
3.4. Mutagenese via $\lambda$ Red.....	28
3.5. Análise de expressão gênica global.....	31
3.5.1. Extração de RNA total. ....	31
3.5.2. Construção de biblioteca e sequenciamento.....	31
3.5.3. Montagem do transcriptoma e análise de diferença de expressão.....	32
3.6. Ontologia gênica.....	33
3.7. Análises <i>in silico</i> de interação com ligantes e conservação de resíduos.....	34
3.8. Complementação gênica.....	36
3.9. Western blot.....	36
3.10. Análise de expressão gênica por qRT-PCR.....	37
3.11. Cultivo de célula epitelial.....	37
3.12. Ensaio de invasão de células HeLa.....	38
4. Resultados.....	39
4.1. Análise da expressão gênica global da amostra mutante $\Delta ygiV$ .....	39
4.2. Validação dos genes diferencialmente expressos.....	44
4.3. Análise transcriptômica comparativa de YgiV e QseC.....	45
4.4. Caracterização <i>in silico</i> de YgiV.....	46

4.5. Caracterização <i>in silico</i> de potenciais elementos <i>cis</i> e provável <i>regulon</i> de YgiV.....	52
4.6. Construção do sistema de superexpressão de YgiV.....	55
4.7. Análise da superexpressão de YgiV na regulação transcricional.....	56
4.8. Análise de expressão gênica em anaerobiose com glicose ou fucose.....	57
4.9. Função de YgiV na invasão de células epiteliais.....	61
4.10. Discussão.....	63
5. Conclusões.....	72
Referências.....	74

## 1. Introdução

Salmonelose é uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças de origem alimentar e é causada pela bactéria *Salmonella*. É estimado em torno de dez milhões de casos em humanos no mundo a cada ano, e resulta em mais de 100 mil mortes. Para as espécies de *Salmonella*, mais de 2500 diferentes sorotipos ou sorovares foram identificadas até então. *Salmonella* é uma bactéria ubíqua e pode sobreviver várias semanas em ambiente seco e vários meses na água. A maioria dos sorovares podem infectar um amplo espectro de espécies diferentes. Geralmente, causam gastroenterite, o que pode não causar complicações e não necessitar tratamento, entretanto em jovens, idosos e pacientes imunocomprometidos pode ser severa. A salmonelose é transmitida por ingestão de alimentos de origem animal infectados, e é caracterizada por febre aguda, dor abdominal, diarreia, náusea e vômito. Entre os sorotipos não-tifoidais mais importantes, estão *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (WHO, 2013).

Sinalização química em bactérias é um dos mais intrigantes aspectos da relação patógeno-hospedeiro (HUGHES; TEREKHOVA; LIOU; HOVDE *et al.*, 2010; MOREIRA; SPERANDIO, 2012; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010), mecanismo através do qual as mesmas interagem com o hospedeiro e também com a sua respectiva microbiota. Devido à complexidade destes sinais em um ambiente de composição diversa e flutuante como o intestino humano, sua completa elucidação demanda novos estudos. Esses sinais, bem como suas interações, são de suma importância na Microbiologia. A sinalização química em bactérias é essencial tanto nas interações intraespecíficas, assim como nas interespecíficas, como na interação direta com células eucarióticas, ou seja, na relação patógeno-hospedeiro (UNAL; SINGH; FLEURY; SINGH *et al.*, 2012). A sinalização química via hormônios adrenérgicos de estresse, como epinefrina (Epi) e noraepinefrina (NE), possui papel fundamental na virulência de bactérias conforme previamente reportado (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003).

Bactérias empregam diversos mecanismos para se comunicar com o meio e regular seus mecanismos de sobrevivência. Com objetivo de caracterizar novos fatores de virulência associados à sinalização química da célula bacteriana, nosso grupo caracterizou uma nova proteína do espaço periplasmático de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (MOREIRA;

HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Esta proteína foi identificada a partir de estudos em *S. Typhimurium* com o sistema de 2-componentes previamente caracterizado QseBC e a sinalização via Epi/NE/Autoindutor-3 (AI-3) (MOREIRA; SPERANDIO, 2012; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). Inicialmente denominada YgiW, esta proteína foi renomeada para VisP (**V**irulence and **s**tress-related **P**eriplasmic protein) devido a sua função (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), pertencendo a família BOF (*B*inding *O*ligosaccharide/*n*ucleotide *F*olding) (GINALSKI; KINCH; RYCHLEWSKI; GRISHIN, 2004), que possui a característica predita de se ligar a açúcares e demais moléculas de baixo peso molecular e apresenta potencial de virulência (GINALSKI; KINCH; RYCHLEWSKI; GRISHIN, 2004).

Seu papel inicial na resposta a estresse foi demonstrado anteriormente, e foi observado em análises posteriores sua importância na patogenicidade mediada por fatores codificados nas ilhas de patogenicidade SPI-1 e 2 (**S**almonella **P**atogenicity **I**sland 1 and 2) (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018; MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Esta proteína é codificada por um gene em um *operon*, o qual apresenta também o gene *ygiV*, que codifica um putativo regulador transcricional da família AraC (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*, 2009) ainda não caracterizado. A completa elucidação da função dessas proteínas e seu mecanismo bioquímico e biológico de ação em relação à patogenicidade de *S. Typhimurium* é um tópico muito importante na compreensão da relação patógeno-hospedeiro.

### **1.1. Sinalização química via Autoindutor-3/Epinefrina/noraepinefrina**

Procariotos e eucariotos empregam sinalização célula-célula por meio de sinais químicos. Essa sinalização permeia a comunicação interespecífica e intraespecífica, além da comunicação inter e intra-Reinos (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). A sinalização química através dos hormônios Epi e NE, do hospedeiro, e do Autoindutor-3 (AI-3), da microbiota, foi inicialmente descrita na ativação de genes de virulência em *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). Este mecanismo está presente também em diversas espécies bacterianas, bem como em seus respectivos hospedeiros (SPERANDIO; TORRES; JARVIS; NATARO *et al.*, 2003). O sistema de 2-componentes QseBC foi previamente reportado como sendo responsável na virulência de

EHEC (CLARKE; HUGHES; ZHU; BOEDEKER *et al.*, 2006), EPEC (SIRCILI; WALTERS; TRABULSI; SPERANDIO, 2004), UPEC (HADJIFRANGISKOU; KOSTAKIOTI; CHEN; HENDERSON *et al.*, 2011), *S. Typhimurium* (BEARSON; BEARSON, 2008; MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010; PATEL; GALÁN, 2006a; RASKO; MOREIRA; LI; READING *et al.*, 2008) além de outros sorovares (PULLINGER; VAN DIEMEN; DZIVA; STEVENS, 2010). Também para as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (JUÁREZ-RODRÍGUEZ; TORRES-ESCOBAR; DEMUTH, 2013), *Haemophilus influenzae* (UNAL; SINGH; FLEURY; SINGH *et al.*, 2012), *Aeromonas hydrophila* (KHAJANCHI; KOZLOVA; SHA; POPOV *et al.*, 2012), *Edwardsiella tarda* (WANG; WANG; YANG; XIAO *et al.*, 2011), *Francisella tularensis* (MOKRIEVICH; KONDAKOVA; VALADE; PLATONOV *et al.*, 2010), entre outras.

## 1.2. Patogenicidade em *Salmonella*

A patogênese no gênero *Salmonella*, ou mais especificamente em *S. Typhimurium*, é um mecanismo complexo e orquestrado. Inicialmente a motilidade mediada por flagelo é usada pela *Salmonella* para se movimentar no lúmen intestinal, e é requisitada para uma eficiente colonização, invasão celular e indução de patogênese (ERHARDT; DERSCH, 2015). A movimentação gerada por ela permite acesso à elevada disponibilidade de nutrientes no intestino inflamado, e assim, iniciar o contato com a célula hospedeira e o processo de invasão (STECHER; BARTHEL; SCHLUMBERGER; HABERLI *et al.*, 2008; STECHER; HAPFELMEIER; MULLER; KREMER *et al.*, 2004). O flagelo é uma macroestrutura proteica que pode ser caracterizada como um Sistema de Secreção do Tipo 3 (*Type Three Secretion System* – TTSS), a qual se utiliza de uma força prótica motriz para rotacionar sua estrutura e propelar a bactéria em direção a fontes energéticas (CHEVANCE; HUGHES, 2008). A sinalização deste processo é realizada por sensores de quimiotaxia que direcionam a bactéria para nichos com fontes metabolizáveis de interesse, principalmente açúcares e ácidos graxos de cadeia curta (*Small Chain Fatty Acids* - SCFA) (CHEVANCE; HUGHES, 2008; ERHARDT; DERSCH, 2015). Flagelo é produzido durante a colonização intestinal, entretanto sua produção é reprimida após a invasão de células epiteliais. Suas subunidades são potentes indutores da resposta imune do hospedeiro (HAYASHI; SMITH; OZINSKY; HAWN *et al.*, 2001).

Diversas ilhas de patogenicidade são descritas na literatura e foram melhor elucidadas com o sequenciamento das linhagens LT2 (MCCLELLAND; SANDERSON; SPIETH; CLIFTON *et al.*, 2001) e SL1344 (KROGER; DILLON; CAMERON; PAPERFORT *et al.*, 2012). Algumas destas ilhas são diretamente relacionadas aos processos infecciosos de *S. Typhimurium*, como a SPI-1 ligada a invasão celular (GALÁN; CURTISS, 1989), e SPI-2 vinculada à replicação intracelular, sobrevivência em macrófagos e infecção sistêmica em camundongos (CIRILLO; VALDIVIA; MONACK; FALKOW, 1998; HENSEL; SHEA; WATERMAN; MUNDY *et al.*, 1998; OCHMAN; SONCINI; SOLOMON; GROISMAN, 1996). As ilhas SPI-1 e SPI-2 codificam distintos TTSS, estruturas estas em forma de agulha molecular responsáveis por injetar as proteínas efetoras essenciais durante estes dois momentos distintos, extra e intracelular, do processo patogênico (GALÁN, 1996; GALÁN; CURTISS, 1989; GROISMAN; OCHMAN, 1993; OCHMAN; SONCINI; SOLOMON; GROISMAN, 1996; SHEA; HENSEL; GLEESON; HOLDEN, 1996).

O *locus* SPI-1 contém tanto genes que codificam para proteínas efetoras como reguladores do SPI1-TTSS. Curiosamente algumas proteínas efetoras do TTSS de SPI-1 e SPI-2 são codificadas em *loci* distintos, como SPI-5. Tais proteínas efetoras são inseridas nas células do hospedeiro através do TTSS. Especificamente três efetores: SopE, SopE2 e SopB, atuam em conjunto com três Rho GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac1 e RhoG) para a coordenação e eficiência do processo de invasão. Juntas estas proteínas lideram a reorganização dos filamentos de actina no processo de internalização por macropinocitose. SopB, juntamente com os demais efetores supracitados, coordena a secreção do cloreto via desfosforilação lipídica (ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001), e indiretamente estimula Cdc42 e RhoG através de sua atividade fosfoinositídeo fosfatase (FRIEBEL; ILCHMANN; AEPFELBACHER; EHRBAR *et al.*, 2001; HARDT; CHEN; SCHUEBEL; BUSTELO *et al.*, 1998; PATEL; GALÁN, 2006b; ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001). SopB também promove a doença intestinal por aumentar os níveis intracelulares de D-myo-inositol 1,4,5,6-tetra-cis-fosfato, que estimula secreção de cloreto celular (ZHOU; CHEN; HERNANDEZ; SHEARS *et al.*, 2001). Outro efector secretado via TTSS de SPI-1, SipA, embora não seja exigido para a invasão celular, auxilia o início da polimerização no ponto específico de invasão. Ele é responsável por diminuir a concentração crítica e aumentar a estabilidade dos

filamentos de actina neste ponto específico da célula hospedeira (HIGASHIDE; DAI; HOMBS; ZHOU, 2002; MCGHIE; HAYWARD; KORONAKIS, 2001; ZHOU; MOOSEKER; GALÁN, 1999).

### **1.3. Diversidade energética no lúmen intestinal e seu papel na patogenicidade de *S. Typhimurium***

O lúmen intestinal é um ambiente de alta diversidade de nutrientes disponíveis e consequentemente de sua constituição microbiana. As regiões iniciais apresentam mais disponibilidade de nutrientes, principalmente advindos da alimentação. Entretanto tais regiões são caracterizadas por alto fluxo causado por diversos fatores, como o próprio peristaltismo, o que dificulta a fixação da microbiota e colonização por patógenos. O bolo alimentar perde grande parte dos nutrientes conforme passa pelo intestino, principalmente os de composição simples e metabolizáveis pelo hospedeiro, como alguns monossacarídeos (KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012). Nas regiões do íleo e início do ceco o fluxo vai diminuindo, tornando locais propícios para a colonização por patógenos. Todavia as fontes energéticas de composição simples tornam-se mais escassas, e assim os patógenos precisam se adaptar a tais ambientes. Outro fator importante dessas regiões é o aumento do muco, fornecendo uma fonte de carboidratos alternativa, a qual torna-se a principal fonte em situações de jejum (FAN; PEDERSEN, 2020). Tanto a composição dos nutrientes advindos da alimentação nessas regiões como o próprio muco são complexas, sendo principalmente polissacarídeos de grande diversidade de ligações glicosídicas. A metabolização desses polissacarídeos exige uma especificidade enzimática a qual não está presente em *S. Typhimurium* (CHASSARD; LACROIX, 2013; KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012). Assim, o patógeno necessita da presença de determinados constituintes da microbiota para sobreviver e prosperar nesses ambientes. Algumas bactérias, como o *Bacteroides thetaiotaomicron*, possuem enzimas que degradam o muco intestinal e liberam açúcares simples como a fucose, a qual é metabolizada pela *S. Typhimurium*. Obviamente esse processo não ocorre naturalmente para o sucesso do patógeno, mas a liberação desses açúcares do muco seria uma maneira de manutenção da própria microbiota em situação de jejum. Portanto, a fucose liberada não é metabolizada exclusivamente pela *S. Typhimurium*, esta compete por essa fonte com outros microrganismos da microbiota (RIVERA-CHÁVEZ; BÄUMLER, 2015). O que favorece a *S. Typhimurium* nesse processo não é somente a metabolização da fucose em si, mas a de seu principal metabólito

em anaerobiose, o 1,2-propanediol. A sua degradação é uma via mais restrita dentro da diversidade da microbiota, favorecendo a expansão e crescimento da *S. Typhimurium* (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017). Via esta que também está relacionada a patogênese de *S. Typhimurium* (Figura 1).

**Figura 1** – Expansão intestinal de *S. Typhimurium* mediada por metabólitos da microbiota

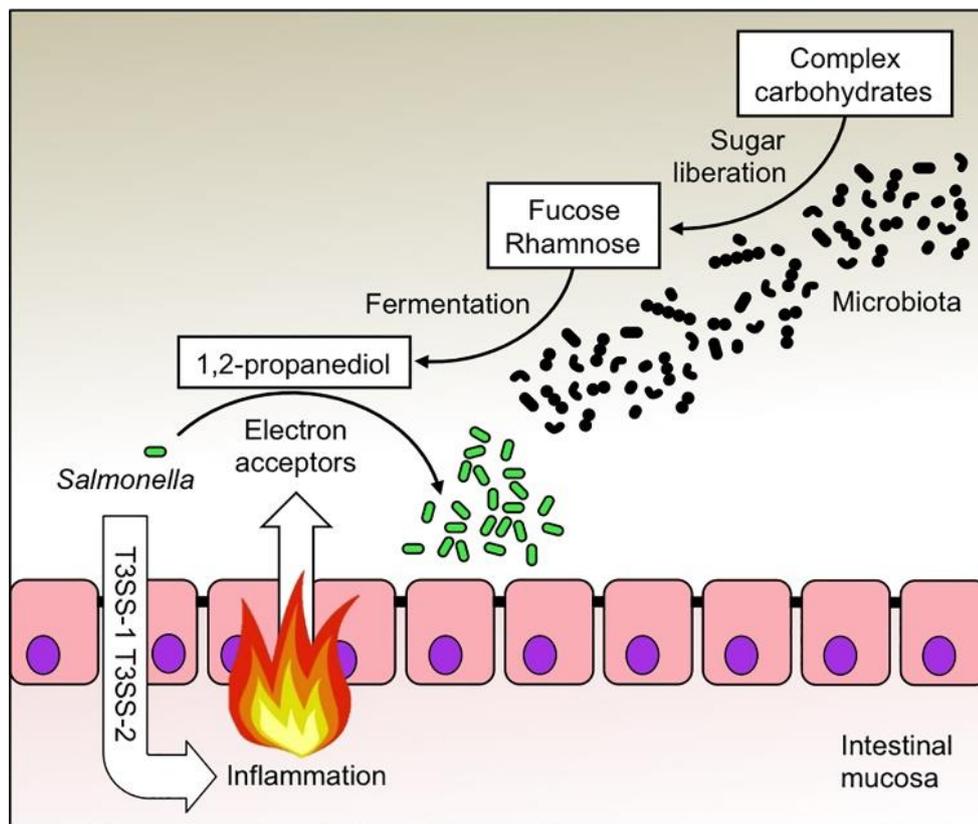


Figura 1 – Expansão intestinal de *S. Typhimurium* mediada pelo processo inflamatório e por 1,2-propanediol, metabólito advindo da fermentação da fucose e rhamnose (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017).

#### 1.4. VisP e YgiV

Previamente caracterizou-se a importância do sensor quinase QseC na patogênese e sinalização química *in vivo* em *S. Typhimurium* (MOREIRA; WEINSHENKER; SPERANDIO, 2010). A partir deste estudo, identificou-se a proteína periplasmática VisP, que associa mecanismos distintos como resposta a estresse bacteriano, sobrevivência e virulência, possuindo alta importância ao que se refere a manutenção de membrana bacteriana (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018; MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013).

O gene *visP* foi caracterizado como o primeiro integrante de um operon, o qual também apresenta o gene *ygiV*. O operon de *visP* e *ygiV* apresenta uma organização adjacente de direção oposta e *upstream* do operon *qseBC* (Figura 2).

**Figura 2** - Organização dos operons *qseBC* e *visP-ygiV* em *S. Typhimurium*.

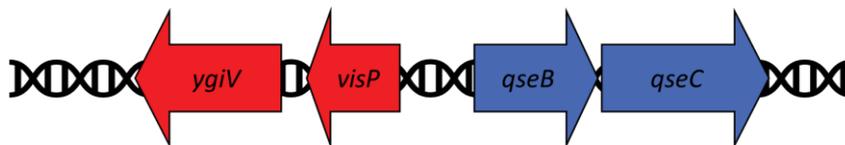


Fig. 2 - Organização dos operons *qseBC* e *visP-ygiV* em *S. Typhimurium* (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013). Modificado.

Anteriormente na literatura, VisP foi apenas mencionada rapidamente em um estudo proteômico de larga escala em *Escherichia coli* como uma proteína periplasmática Sec-B dependente (BAARS; YTTERBERG; DREW; WAGNER *et al.*, 2006).

Inicialmente a relevância de VisP surgiu após a realização de análises transcriptômicas do mutante  $\Delta qseC$  de *S. Typhimurium* (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), comparativamente à amostra selvagem. Esta análise apontou *visP* como gene mais expresso, uma expressão 65 vezes aumentada no mutante  $\Delta qseC$ , coerente com resultados preliminares para *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC) e semelhante a outro estudo prévio em *S. Typhimurium* (CIRILLO; VALDIVIA; MONACK; FALKOW, 1998).

VisP associa fatores de virulência e funções celulares básicas, como metabolismo, estrutura de membrana bacteriana, estresse, conectando as mesmas com a sinalização química através de AI-3, Epi e NE em *S. Typhimurium* via QseBC (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018; MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013).

Em *S. Typhimurium* essa proteína foi apontada por responder diferentemente a agentes antimicrobianos, como Polimixina B (MERIGHI; SEPTER; CARROLL-PORTILLO; BHATIYA *et al.*, 2009; PILONIETA; ERICKSON; ERNST; DETWEILER, 2009), importante peptídeo catiônico antimicrobiano (CAMP) no processo de colonização intestinal e patogênese de *S. Typhimurium*. Também se relacionou, previamente, VisP com diferenças no perfil de LPS de membrana (MOREIRA; HERRERA; NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013), importante para resistência a CAMPs, o que correlaciona com o dado anteriormente citado. É importante

salientar a sobrevivência celular como um passo essencial durante o processo patogênico de *S. Typhimurium*.

Além de seu papel na resposta à estresse, VisP também foi descrita por apresentar importante função na resposta a macrófagos devido ao seu papel regulador das cadeias de antígeno-O (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018).

Em *S. Typhimurium*, o gene *ygiV* apresenta-se *downstream* a *visP*, no mesmo *operon*, e este gene codifica um regulador transcricional putativo (KROGER; DILLON; CAMERON; PAPENFORT *et al.*, 2012; MCCLELLAND; SANDERSON; SPIETH; CLIFTON *et al.*, 2001) da família AraC/XyIS (A/X) (GALLEGOS; SCHLEIF; BAIROCH; HOFMANN *et al.*, 1997). A família de proteínas A/X é constituída por fatores de transcrição que exercem função de regulação de processos biológicos como metabolismo de fontes de carbono, patogênese e resposta a estresse. Eles apresentam dois domínios estruturais principais: domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain* - DBD) e o domínio de efetor/multimerização (*Effector/Multimerization Domain* - EMD). O domínio DBD é altamente conservado entre os integrantes da família e compreende uma  $\alpha$ -hélice entre dois *motifs* de ligação ao DNA hélice-alça-hélice (*Helix-turn-Helix* - HTH) (GALLEGOS; SCHLEIF; BAIROCH; HOFMANN *et al.*, 1997; MARTIN; ROSNER, 2001). Há poucas informações a respeito deste regulador, grande parte em estudos genômicos de larga-escala (HAYASHI; MOROOKA; YAMAMOTO; FUJITA *et al.*, 2006; KROGER; DILLON; CAMERON; PAPENFORT *et al.*, 2012; MCCLELLAND; SANDERSON; SPIETH; CLIFTON *et al.*, 2001; RILEY; ABE; ARNAUD; BERLYN *et al.*, 2006). Em *Escherichia coli* K12, YgiV foi descrito com a função de repressor transcricional do gene *mcbR*, cujo produto inibe uma proteína periplasmática, YbiM, responsável pela produção de ácido colânico, favorecendo a formação de biofilme (ZHANG; GARCIA-CONTRERAS; WOOD, 2008). Provavelmente, YgiV apresenta alguma relação com VisP, visto que ambas são codificadas no mesmo operon, sendo assim, transcritas conjuntamente. São necessários mais estudos para elucidar a relação destas proteínas e seus respectivos papéis na formação de antígeno-O e patogenicidade de *S. Typhimurium*.

### 1.5. Hipótese de estudos

A hipótese inicial deste estudo é de que o *operon*, compreendendo os genes *visP* e *ygiV*, exerce importante função no processo patogênico de *S. Typhimurium*, principalmente na

interface de interação patógeno-hospedeiro. Dentro desta interface focamos nas etapas do início do processo de interação com as células do hospedeiro, principalmente no processo de invasão de células epiteliais. Desta forma, é levantada a hipótese de que assim como VisP, YgiV também atua nos mecanismos bacterianos dessa interação da parte “ofensiva” desse processo como nos TTSS e suas proteínas efetoras.

Previamente já foi demonstrado que VisP interfere na montagem das cadeias de antígeno-O do LPS de *S. Typhimurium*. Mais precisamente no controle da distribuição modal pelas proteínas WZZ<sub>ST</sub>, WZZ<sub>fepE</sub> e Wzy, onde VisP aparenta estar envolvida na formação e ou determinação do comprimento final destas cadeias polissacarídicas (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018). A extensão da cadeia de antígeno-O, assim como a atuação de VisP neste processo em conjunto com a função de TTSS tem um papel importante na virulência de *S. Typhimurium* como reportado anteriormente (DA SILVA; MANIERI; HERRERA; TRENT *et al.*, 2018) e também observado em dados preliminares (Figuras 3).

**Figura 3** – Influência de VisP e as cadeias de antígeno-O na invasão de células epiteliais

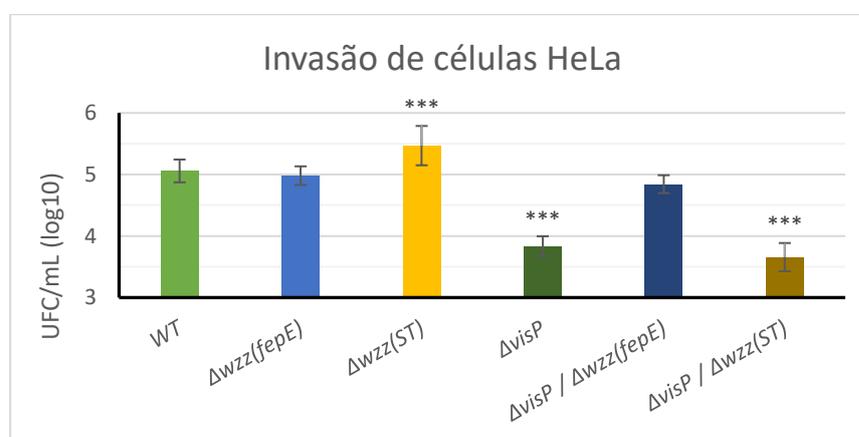


Fig. 3 - Análise quantitativa da invasão de *S. Typhimurium* em células epiteliais HeLa em MOI de 100:1, comparando-se as amostras  $\Delta wzz_{fepE}$ ,  $\Delta wzz_{ST}$ ,  $\Delta visP$ ,  $\Delta visP/\Delta wzz_{fepE}$  e  $\Delta visP/\Delta wzz_{ST}$ . Significância estatística em comparação com a amostra selvagem (*wild-type* - WT),  $p < 0,001$  (\*\*\*). (Dados preliminares não publicados).

A função predita de YgiV em estudos de larga escala como regulador transcricional da família A/X é um indicativo do possível papel de YgiV em processos patogênicos. Assim como a função descrita anteriormente de VisP de se ligar a açúcares (MOREIRA; HERRERA;

NEEDHAM; PARKER *et al.*, 2013) também é um indicativo de que este *operon* apresenta função que correlaciona patogenicidade e metabolismo de carboidratos.

Desta maneira foi proposto para o presente estudo a investigação de alvos da regulação transcricional mediada por YgiV, buscando elucidar o papel deste regulador relacionado à ação de VisP na patogenicidade via sensor quinase QseC de *S. Typhimurium*.

Esta integração de sistemas funcionais desempenha um papel inédito na interação e comunicação destes organismos, os inter-relacionados com a microbiota e/ou hospedeiro. Neste sentido, são apresentadas novas e empolgantes condições neste paradigma que surge na Microbiologia, tornando-se importante concentrar o foco em fatores de virulência e seus mecanismos de sinalização como alvos para novos tratamentos (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivos gerais**

- I. Determinar a função bioquímica e biológica de YgiV.
- II. Identificar o possível *regulon* de YgiV.

### **2.2 Objetivos específicos**

- I. Investigar o papel de YgiV como regulador transcricional.
- II. Identificar a sequência consenso do elemento *cis* de interação com YgiV de forma a determinar os genes que sofrem sua regulação transcricional.
- III. Identificar os possíveis pontos de regulação da ação de YgiV.
- IV. Investigar a correlação entre YgiV e o sistema de dois componentes QseBC e as implicações dessa relação na patogênese de *S. Typhimurium*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Cultivo e armazenamento de bactérias

Foram realizados estoques das cepas e mutantes necessários para as atividades a serem efetuadas no projeto. Tais amostras estão disponíveis na coleção de bactérias do Laboratório de Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana (PASQUIBAC), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, *campus* de Araraquara.

As amostras, contidas em criotubos, foram estriadas em placas de ágar LB, deixadas em cultivo *overnight* a 37 °C. Colônias isoladas foram repassadas para tubos com 3 mL de meio LB, mais um antibiótico específico para seleção no caso de cepas com marca de resistência. Após um crescimento *overnight* a 37 °C em *shaker*, coletou-se 1 mL da cultura, adicionou-se 0,5 mL de glicerol 50%, em criotubos, os quais foram estocados no *freezer* - 80 °C. No Quadro 1 apresentam-se as cepas que foram utilizadas nos ensaios de caracterização fenotípica e análise de expressão gênica.

Todo cultivo bacteriano foi realizado em crescimento *overnight* a 37 °C, com aeração e agitação em caldo LB, com exceção quando indicado no experimento.

**Quadro 1** - Cepas bacterianas utilizadas neste estudo

Nº na Coleção	Descrição da cepa	Marca resistência diferencial	Origem
3	<i>Salmonella enterica</i> sorovar Typhimurium SL1344 ( <i>Wild-Type</i> – WT)	Estreptomicina, canamicina	(HOISETH; STOCKER, 1981)
32	<i>Escherichia coli</i> DH5α carreando o plasmídeo pKD3	Cloranfenicol	Coleção PASQUIBAC
38	DH5α carreando o plasmídeo pCP20	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
42	DH5α carreando o plasmídeo pKD46	Ampicilina	Coleção PASQUIBAC
54	SL1344, mutante $\Delta ygiV$	Estreptomicina, canamicina	Presente estudo
198	<i>Escherichia coli</i> MG1655 carreando o plasmídeo pTrc99a	Ampicilina	Coleção Gross Lab
199	MG1655 carreando o plasmídeo pTrc99a- <i>ygiV</i> :Myc+	Ampicilina	Presente estudo
55	SL1344, mutante $\Delta ygiV$ , <i>ygiV</i> :Myc+ (pTrc99a)	Estreptomicina, canamicina e ampicilina	Presente estudo

Quadro 1 - Amostras utilizadas nos ensaios de mutagênese via  $\lambda$  Red e caracterização fenotípica.

### 3.2. Extração plasmidial

Realizou-se um procedimento em pequena escala de extração de DNA plasmidial de suspensão de células bacterianas baseado no processo de lise alcalina. Foi utilizado o *kit* da Invitrogen *Quick Plasmid Miniprep*®.

O procedimento se baseia no fato que os plasmídeos são moléculas de DNA relativamente pequenas e supertorcidas e o DNA cromossomal bacteriano é muito maior e menos supertorcido. Essa diferença na topologia permite a precipitação seletiva do DNA cromossomal e proteínas celulares separadamente do plasmídeo e moléculas de RNA. Nas células que são lisadas em meio alcalino, que desnatura ambos os ácidos nucléicos e as proteínas, e que é posteriormente neutralizado com acetato de potássio, o DNA cromossomal e as proteínas precipitam por causa da impossibilidade de se renaturarem corretamente (por conta de seu grande tamanho). Os plasmídeos renaturam corretamente e permanecem em solução, eficientemente separados do DNA cromossomal e das proteínas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Nesse procedimento, são usadas três soluções principais, chamadas de *Ressuspension Buffer (R3)*, *Lysis Buffer (L7)* e *Precipitation Buffer (N4)*. A primeira solução (R3), que é adicionada ao precipitado de células preparadas com antecedência, contém Tris e EDTA. O Tris serve para tamponar a solução em pH 8,0, enquanto que o EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) é um quelante, que se liga a cátions bivalentes da camada lipídica, enfraquecendo o envelope celular (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Além disso, a solução R3 apresenta RNase A, a qual degrada o RNA em solução. A segunda solução (L7), que é adicionada após ressuspensão do precipitado na solução R3, contém SDS e hidróxido de sódio e tem a função de lisar a célula. O SDS é um detergente que dissolve os componentes lipídicos da membrana celular, bem como as proteínas celulares (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Já o NaOH desnatura o DNA cromossomal e plasmidial em fita simples, o DNA plasmidial circular permanece torcido (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A terceira solução (N4) é formada por acetato de potássio 3 M e ácido acético, sendo que este torna o pH novamente neutro, permitindo a renaturação das fitas de DNA. Os grandes segmentos de DNA cromossomais não podem re-hibridizar perfeitamente, mas colapsam em emaranhados parcialmente hibridizados. Ao mesmo tempo, o acetato de potássio precipita o SDS da suspensão celular junto com as

proteínas e lipídeos. O DNA cromossomal parcialmente re-hibridizado é aprisionado no precipitado SDS/lipídeo/proteína. Apenas o DNA plasmidial escapa do precipitado e permanece em solução (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Em seguida, a solução final obtida é centrifugada, e o sobrenadante é posto em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de DNA plasmidial. O eluato é descartado. A coluna é lavada com a solução *Wash Buffer (W9)*, que contém etanol 70%, sendo então removidos os sais e o SDS remanescentes. Por fim, o DNA plasmidial é eluído da coluna com tampão Tris-EDTA, sendo em seguida medida a sua concentração através do espectrofotômetro *Nanodrop 2000®* da Thermo Scientific.

### **3.3. Preparo de bactérias para transformação genética**

Durante o processo de mutagênese via  $\lambda$  Red, é necessária a transformação das bactérias, as quais se deseja modificar, com os plasmídeos contendo os genes que codificam as recombinases. Assim é imprescindível deixá-las competentes para o procedimento de transformação (DATSENKO; WANNER, 2000).

O procedimento de preparo de bactérias eletrocompetentes é extremamente simples, e possui o principal objetivo de retirar íons da suspensão celular através de sucessivas lavagens, reduzindo a força iônica. Assim a solução contendo a bactéria e o plasmídeo formam um meio isolante entre placas de um capacitor, que deixa passar uma intensa corrente elétrica em determinada voltagem, a qual gera poros na membrana da bactéria, permitindo a internalização do plasmídeo (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Inicialmente, foi feito um pré-inóculo com 3 mL de meio LB, crescimento *overnight* a 37 °C em *shaker*, os quais foram inoculados em um erlenmeyer com 150 mL de LB, deixados a 37 °C em *shaker* até atingir uma densidade óptica ( $OD_{600}$ ) de 0,6. Em seguida, a cultura foi posta em gelo por 30 minutos. Após foi passada para tubos cônicos de 50 mL, centrifugados em centrífuga refrigerada (4 °C) por 6 minutos a 4000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em água gelada, para uma nova centrifugação. Repetiu-se a lavagem com água gelada. Terminado, lavou-se com glicerol 10%, e ressuspendeu-se em 0,4 mL de glicerol 10%. Por fim, alíquotou em tubos de microcentrífuga, 50  $\mu$ L cada (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), tais alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C.

Na transformação por choque térmico, a diferença de temperatura ocasiona um estresse na membrana da bactéria, formando poros, e cátions divalentes presentes na solução formam complexo com o fosfato do DNA, carreando-o por entre o poro da membrana (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para deixar as bactérias competentes para a transformação por choque térmico, primeiramente se fez um pré-inóculo com 3 mL de meio LB, crescimento *overnight* a 37 °C em *shaker*, sendo posteriormente inoculado em 100 mL de meio SOB (Tripton 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10 mM, esterilizado por filtração), deixados a 37 °C em *shaker* até atingir uma densidade óptica (OD<sub>600</sub>) de 0,6. Atingido tal ponto, deixou-se o frasco de cultura em banho de gelo por 10 minutos. Após foi passada para dois tubos cônicos de 50 mL, centrifugados em centrífuga refrigerada (4 °C) por 10 minutos a 2500 x *g*. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 20 mL de TB (Pipes pH 7,0 10 mM, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 55 mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 15 mM, KCl 250 mM, esterilizado por filtração) resfriado. Deixou-se em gelo por 10 minutos. Novamente as células foram centrifugadas, mesmas condições anteriores. Descartou-se o sobrenadante, e cuidadosamente as células foram ressuspendidas em 5 mL de TB resfriado, adicionado de 375 µL de DMSO. Novamente deixou-se em gelo por 10 minutos, e por fim, a suspensão foi aliquotada em tubos de microcentrífuga, 100 µL cada um. Tais alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### 3.4. Mutagênese via λ Red

Amplificou-se por PCR o cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3 (DATSENKO; WANNER, 2000), e o fragmento gerado foi posteriormente utilizado para a recombinação homóloga na mutagênese via λ Red. Os primers usados necessitam das seguintes características: região terminal 5' homóloga às extremidades do gene alvo, aproximadamente 50 pares de base; sítio FRT (*FLP Recognition Target*), e região terminal 3' homóloga ao cassete de resistência a cloranfenicol do plasmídeo pKD3. Além desses primers, foi utilizado o par de primers, P1 e P2 (DATSENKO; WANNER, 2000), *forward* e *reverse* respectivamente, para checagem da inserção do cassete de resistência à cloranfenicol no *locus* do gene alvo para a mutação.

Após a amplificação do cassete de resistência a cloranfenicol flanqueado pelas regiões homólogas de *ygiV* deixou-se a amostra 3 (Quadro 1) competente para transformação com o

plasmídeo pKD46. Este plasmídeo apresenta o profago  $\lambda$ , o qual possui três genes: *bet* (aka  $\beta$ ), *exo*, e *gam* (aka  $\gamma$ ). Exo é uma exonuclease 5'-3' que degrada a região terminal 5' de DNA linear. Bet é uma proteína ligadora de DNA simples fita que se liga à região terminal 3' simples fita gerada por Exo e promove anelamento ao DNA complementar. Gam liga-se ao complexo RecBCD da bactéria, inibindo sua atividade de exonuclease (DATSENKO; WANNER, 2000). Foram retiradas do freezer à -80 °C alíquotas da amostra 3 competente, e deixadas em banho de gelo até o descongelamento. Em 100  $\mu$ L de bactéria competente, foi adicionado 10  $\mu$ L da suspensão de pKD46 (36,5 ng/ $\mu$ L) e deixados em banho de gelo por 30 minutos. Passado este tempo, é dado o choque térmico à temperatura de 42 °C por dois minutos, o qual gera estresse na membrana da bactéria formando poros. Com o auxílio de íons divalentes presentes na solução, o DNA plasmidial é carregado para o interior da célula bacteriana. Após o choque, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB, deixadas em um *Shaker*, a 30 °C por uma hora (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Depois as células foram plaqueadas em meio ágar LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL), pois o plasmídeo pKD46 apresenta a marca de seleção de resistência a este antibiótico. Cultivo *overnight* à 30 °C, devido à característica de termosensibilidade do plasmídeo. Colônias isoladas foram cultivadas em 3 mL de LB com ampicilina, para posterior armazenamento à -80 °C.

A amostra foi plaqueada em ágar LB com ampicilina, cultivo *overnight* à 30 °C. Algumas colônias isoladas foram inoculadas em 25 mL de meio SOB, com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e 2,5 mL de L-arabinose 1 M, crescimento à 30 °C até atingir densidade óptica (OD<sub>600</sub>) de 0,6. O profago  $\lambda$  do plasmídeo pKD46 apresenta um promotor dependente de arabinose, assim é induzida a expressão das enzimas que realizam a recombinação. Centrifugou-se as células e fez-se três sucessivas lavagens com 25 mL de glicerol 10% gelado. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de água gelada e transferidas para um tubo de microcentrífuga. 50  $\mu$ L dessa suspensão foram transformados com 5  $\mu$ L do fragmento de PCR do cassete de resistência a cloranfenicol por eletroporação. Após adicionou-se 1 mL de meio LB, e as células foram deixadas para recuperação por três horas à 30 °C. Terminada a recuperação, 200  $\mu$ L das células foram plaqueadas em meio ágar LB com cloranfenicol (20  $\mu$ g/mL), crescimento *overnight* à 42 °C. Colônias crescidas em meio com cloranfenicol foram

bem sucedidas na mutagênese, sendo feito uma checagem posterior por PCR com o par de primer P1 e P2. A amostra obtida foi o mutante  $\Delta ygiV$ .

Foi realizado a eliminação do cassete de resistência a cloranfenicol, o qual estava inserido no *locus* do gene *ygiV*. Este procedimento foi feito através da transformação do mutante  $\Delta ygiV$  com o plasmídeo pCP20, o qual apresenta o gene para expressão da recombinase FLP, com um promotor de indução térmica ( $\sim 42$  °C). Esta enzima elimina o cassete de resistência a cloranfenicol, pois este apresenta-se flanqueado por sítios FRT (***FLP Recognition Target***), caracterizados como sítios de ação da FLP, a qual remove a região flanqueada. A temperatura utilizada também é útil para curar o plasmídeo, que apresenta replicação termossensível (DATSENKO; WANNER, 2000).

O procedimento de eletroporação foi feito com o eletroporador MicroPulser® (BIO-RAD). Foi utilizada uma cubeta de 2 mm de espessura, a 2,5 kV. Eletroporou-se 100  $\mu$ L de células eletrocompetentes com 100 ng de pCP20. Após o choque, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio LB, deixadas em um *Shaker*, a 30 °C por uma hora. Depois da recuperação, foram plaqueados 50  $\mu$ L, da suspensão celular em placas contendo meio ágar LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL), as quais foram cultivadas a 30 °C *overnight*. O plasmídeo pCP20 apresenta marca de resistência à ampicilina, assim, somente bactérias que incorporaram o plasmídeo cresceram neste meio. Colônias isoladas obtidas foram repassadas para tubos contendo 3 mL de LB sem antibiótico por três horas a 42 °C. Este choque térmico permite a expressão da FLP, assim como também a cura do plasmídeo pCP20. Desta maneira, as bactérias perdem a marca de resistência a cloranfenicol e à ampicilina no mesmo processo. 100  $\mu$ L de cada tubo foram passados para placas contendo meio ágar LB com estreptomicina (100  $\mu$ g/mL). Colônias obtidas foram repicadas para três placas de ágar LB, cada uma contendo um dos seguintes antibióticos: ampicilina (100  $\mu$ g/mL), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL), e cloranfenicol (20  $\mu$ g/mL). As colônias desejadas devem ser sensíveis a ampicilina e cloranfenicol, e resistentes a estreptomicina. A colônia que apresentou tal padrão foi cultivada em 3 mL de LB com estreptomicina *overnight* e, sucessivamente, estocada à -80 °C (DATSENKO; WANNER, 2000), com a identificação de cepa 54, o mutante  $\Delta ygiV$  de *S. Typhimurium* SL1344.

### 3.5. Análise de expressão gênica global

Foi realizado uma análise por RNA-seq, comparando-se os níveis de expressão gênica total entre a amostra selvagem de *S. Typhimurium* e o mutante  $\Delta ygiV$ , de forma a determinar os genes regulados por YgiV no nível transcricional (KROGER; DILLON; CAMERON; PAPENFORT *et al.*, 2012), além de análise por qRT-PCR de genes-alvo na confirmação dos resultados de larga-escala.

#### 3.5.1. Extração de RNA total

A técnica de extração de RNA consiste no uso de desnaturante forte; o método mais empregado utiliza TRIzol, que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, e ao ser adicionado rompe as células inativa a enzima RNase e dissolve os componentes celulares, enquanto mantém o RNA intacto. O clorofórmio é adicionado em seguida e separa a solução anterior em fases, sendo elas: aquosa (contém RNA); intermediária (DNA); orgânica (proteínas, membranas, organelas). Em seguida, a solução aquosa obtida é extraída e acrescida de etanol 100%, o qual irá solubilizar as moléculas de RNA. Esta solução é posta em uma coluna de separação, que se liga às moléculas de RNA. O eluato é descartado. A coluna é lavada com uma solução de etanol 70%, sendo então removidos os sais remanescentes. Por fim, o RNA é eluído da coluna, e tratado com DNase para uma maior purificação.

As cepas foram inoculadas em 3 mL de meio LB, postas em um crescimento sob agitação *overnight*, 37 °C. 500  $\mu$ L deste crescimento foram inoculados em 25 mL de LB, e deixadas crescer até uma  $DO_{600}$  de 1,0 em 37 °C sob agitação. Os 25 mL foram posteriormente centrifugados (2500 x g, 10 min). O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 500  $\mu$ L de TRIzol® (Ambion™). Esta solução foi aquecida a 65 °C por 10 min, e posteriormente adicionada de 100  $\mu$ L de clorofórmio, homogeneização via vórtex. A solução foi centrifugada a 10000 x g, 15 min, 4 °C para separação de fases. A fase superior aquosa foi retirada e posta em um novo tubo acrescida de 0,5 volume de etanol 100%. A partir desta etapa foi utilizado o kit de extração de RNA RiboPure™ Bacteria (Thermo Fisher Scientific).

#### 3.5.2. Construção de biblioteca e sequenciamento

O RNA total extraído de cada amostra, em duplicata, foi purificado através do kit RiboZero™ Bacteria (Illumina), para uma remoção de rRNA com maior eficiência através de sondas

de afinidade por rRNA bacteriano ligadas a *beads* magnéticas. Este passo é essencial devido à numerosa quantidade de rRNA em detrimento do mRNA, o que pode acarretar a ultra ocupação da *flow cell* pelas moléculas de rRNA, resultando numa baixa cobertura de mRNA. Em seguida, é realizada a análise de qualidade pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), o qual realiza uma eletroforese capilar de alta resolução, quantificando e avaliando a integridade do RNA extraído e purificado. Após esta etapa, foi realizada a construção da biblioteca de cDNA através do kit TrueSeq™ RNA-seq Library Preparation (Illumina), constituído de diversas etapas. Inicialmente, o RNA purificado é quimicamente fragmentado a tamanhos específicos (~250 pb) e convertido a uma fita simples de cDNA (DNA complementar) através de *primers* hexaméricos aleatórios, precedido da síntese da segunda fita de cDNA. Em seguida, os fragmentos de cDNA passam por adenilação na extremidade 3' para complementação com os adaptadores, os quais possuem uma timina sobressaliente na extremidade 3'. Após ligação com os adaptadores, a dupla fita é desnaturada e cada fita é amplificada, resultando em duas construções diferentes devido à posição do índice de sequenciamento. Isso ocorre para que ambas as extremidades de cada fragmento sejam sequenciadas, sequenciamento esse denominado *paired-end*. Após o preparo da biblioteca, esta foi quantificada por qPCR, através do método de curva padrão para a realização do sequenciamento com o kit de reagentes MiSeq® v3 (Illumina), específico para o sequenciador MiSeq® (Illumina), o qual foi utilizado.

### **3.5.3. Montagem do transcriptoma e análise de diferença de expressão**

O sequenciador MiSeq gerou dois arquivos de sequenciamento do tipo *fastq* para cada amostra sequenciada. Cada qual apresenta milhares a milhões de sequências (*reads*) de tamanho específico de acordo com o número de ciclos de reações, 75 pb no sequenciamento realizado neste estudo. Os arquivos *fastq* gerados por amostra possuem *reads* correspondentes às extremidades de cada fragmento obtido na construção da biblioteca de cDNA, as quais são indexadas por uma linha de cabeçalho identificando a *read*, o que auxilia no seu pareamento com a *read* “irmã” do outro arquivo *fastq* correspondente. Além da sequência de leitura, os arquivos *fastq* também fornecem a qualidade de cada base sequenciada codificada no formato Phred +33. Esta informação é imprescindível para a avaliação e filtragem (*trimmagem*) das *reads* com baixa qualidade na primeira etapa da

montagem do transcriptoma realizada com o software Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), eliminando *reads* menores que 35 pb e Phred score abaixo de 28. A etapa de *trimmagem* foi finalizada pela correção de erro das *reads* pelo algoritmo baseado em *k-mer* SGA (SIMPSON; DURBIN, 2012). Em seguida foi realizado o alinhamento e montagem do transcriptoma em relação ao genoma de referência de *S. Typhimurium* SL1344 (KROGER; DILLON; CAMERON; PAPENFORT *et al.*, 2012), número de acesso do GenBank GCA\_000210855.2, através do software Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). Este software foi alimentado com os arquivos *fastq* pós-*trimmagem* e o arquivo *fasta* da sequência do genoma referência, alinhando as *reads* com este, gerando o arquivo *sam* (*Sequence Alignment Map*) do mapa do alinhamento. Através do transcriptoma montado foram calculadas o número de *reads* por transcrito pelo software HTSeq (ANDERS; PYL; HUBER, 2015) das duas amostras (linhagem *S. Typhimurium* selvagem e mutante  $\Delta ygiV$ ) em triplicata. Os valores obtidos de cada gene foram comparados (selvagem x mutante) através de análise estatística rebuscada utilizando-se o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), em linguagem de programação R, identificando-se aqueles diferencialmente expressos. Tal pacote utiliza-se de máxima verossimilhança para estimar a dispersão por gene, ajusta os valores obtidos a uma curva, reduz os valores brutos de acordo com a curva através de uma abordagem Bayesiana empírica. Isso permite que a força da redução dependa de quão próximo a dispersão real tenda da curva de acordo com os graus de liberdade das amostras. Também é utilizada uma abordagem Bayesiana empírica no cálculo do logaritmo da diferença relativa de cada gene através do ajuste a um modelo linear generalizado, obtendo uma estimativa de máxima-verossimilhança de cada diferença relativa logarítmica. Então é ajustada a distribuição das estimativas de máxima-verossimilhança sobre todos os genes à uma distribuição normal centrada em zero. Após a estimativa reduzida da diferença relativa logarítmica, é aplicado um teste de Wald, o qual a divide por seu erro padrão resultando em um teste estatístico *z*. O *p-value* obtido passa por uma análise de FDR (*False Discovery Rate*) de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

### 3.6. Ontologia gênica

Os transcritos selecionados como diferencialmente expressos no transcriptoma foram direcionados para análise de ontologia gênica. Esta tem como objetivo categorizar os genes

em grupos e avaliar estatisticamente o enriquecimento de cada grupo de acordo com todos os transcritos da amostra. Tal avaliação foi realizada através da plataforma *online* PANTHER (MI; MURUGANUJAN; HUANG; EBERT *et al.*, 2019) e também por curadoria manual através de busca em banco de dados como o Uniprot (UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, 2020).

### **3.7. Análises *in silico* de interação com ligantes e conservação de resíduos**

Foi realizada modelagem de YgiV através dos softwares MODELLER (WEBB; SALI, 2016) e RaptorX (KÄLLBERG; WANG; WANG; PENG *et al.*, 2012) por não possuir sua estrutura tridimensional resolvida. Assim como também ensaios de predição de moléculas ligantes para YgiV. Este ensaio foi realizado com a intenção de se corroborar a função de YgiV como fator de transcrição. A análise inicial foi efetuada através do software RaptorX (KÄLLBERG; WANG; WANG; PENG *et al.*, 2012). Diferente de sua utilização previamente descrita aqui na predição da estrutura tridimensional da proteína, neste caso optou-se pela função *Binding* oferecida pelo software a qual prediz potenciais moléculas ligantes baseada nas propriedades físico-químicas da proteína. Este software utiliza-se das informações de hidrofobicidade, nuvem eletroestática, solvatação e acesso de solvente, análise de estruturas secundárias e terciárias, assim como também busca de cristais de homólogos e ortólogos em bancos de dados depositados com molécula ligante. Foram retornadas informações de quais são os potenciais ligantes da proteína, e quais resíduos de aminoácidos são importantes para tal interação com o ligante. Desta maneira, as informações geradas serviram para desdobrar a análise em dois ramos paralelos: análise da proteína e seus aminoácidos responsáveis pela interação, e análise de uma provável sequência consenso de nucleotídeos reconhecida por YgiV. No primeiro ramo de análise, as informações de propriedades estruturais e resíduos identificados foram cruzados com os dados gerados por análise de conservação filogenética da sequência de aminoácidos de YgiV. Para tal, foram extraídos do banco de dados EggNOG (HUERTA-CEPAS; SZKLARCZYK; HELLER; HERNÁNDEZ-PLAZA *et al.*, 2020) 356 sequências de proteínas pertencentes a 283 espécies diferentes, classificadas como ortólogos de YgiV. Estas sequências foram direcionadas para um algoritmo de eliciação de *motifs* por maximização de expectativas, MEME (BAILEY; ELKAN, 1994). A prevalência e conservação dos resíduos nos *motifs* identificados foram comparados com os dados de interação estrutural

da proteína e passados para a próxima etapa. Em seguida, dois softwares distintos, baseados em informações de bancos de dados, foram utilizados na análise *in silico* de YgiV. O primeiro busca avaliar e corrigir um erro comum na análise de proteínas com propriedades de ligação a ácidos nucleicos, a distinção entre ligação a DNA ou RNA, tendo em vista que as propriedades físico-químicas de aminoácidos para ambas as interações são muito semelhantes. O software DRNAPred compara a sequência de aminoácidos da proteína a ser avaliada com um vasto banco de dados com proteínas de função previamente reportada e descrita de ligação a DNA ou RNA (YAN; KURGAN, 2017). O segundo programa utilizado nesta etapa avalia o potencial de interação com DNA através da comparação de um banco de dados de proteínas que se ligam ao DNA com um algoritmo de aprendizado de máquina. O DP-Bind funciona pela lógica de *Support Vector Machine* (SVM), a qual busca padrões nos *motifs* de interação com DNA no banco de dados e aplica na sequência avaliada (HWANG; GOU; KUZNETSOV, 2007). Todas as informações geradas pelos programas diferentes foram cruzadas a fim de se buscar resíduos de aminoácidos de maior importância na função de interação com o DNA. A análise de predição de ligantes baseada nas propriedades físico-químicas da proteína também foi realizada somente com o domínio EMD a fim de se determinar possíveis moléculas efetoras. As informações obtidas foram cruzadas com análise de conservação de resíduos como previamente descrito.

O segundo ramo da análise inicial focou na sequência de nucleotídeos gerada pela predição por propriedades físico-químicas de YgiV. A priori, foi gerada uma sequência consenso de nucleotídeos através do alinhamento das estruturas tridimensionais geradas pelo programa RaptorX, cada uma com um nucleotídeo distinto. Foram descartados nucleotídeos preditos que não permitiam a formação de ligação covalente entre os carbonos 5' e 3' dos nucleotídeos adjacentes por mau posicionamento ou distância incongruente com uma ligação covalente. Após a formação de uma sequência consenso foi possível a construção de *motifs* distintos, os quais variam de acordo com a plasticidade de cada resíduo, o que foi determinado pelo fator de probabilidade de interação com a proteína. Tais *motifs* compreendem matrizes de pontuação de posição específica. A sequência de 400 nucleotídeos *upstream* à abertura de fase de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) de todos os genes de *S. Typhimurium* (PRJNA50407) foram extraídos pelo software RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*)

*Retrieve Sequence* (NGUYEN; CONTRERAS-MOREIRA; CASTRO-MONDRAGON; SANTANA-GARCIA *et al.*, 2018). Os *motifs* previamente moldados foram utilizados como padrão para o escaneamento das regiões promotoras extraídas do genoma da *S. Typhimurium* através do software FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) (GRANT; BAILEY; NOBLE, 2011). Este software computa a pontuação da razão do logaritmo da verossimilhança por cada posição na base de dados de sequências dada, neste caso seriam as regiões promotoras fornecidas. O alinhamento dos *motifs* identificados pela análise nas regiões promotoras gerou a provável sequência de reconhecimento e interação de YgiV, ou seja, o padrão do elemento *cis* do seu *regulon*.

### 3.8. Complementação gênica

Para um maior entendimento da função gênica na patogenicidade e da interação gênica, a cepa mutante foi complementada com o gene deletado, inserido em um plasmídeo (pTrc99a) com promotor induzível por isopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para análise de superexpressão. O plasmídeo contendo o gene alvo foi transformado em amostra determinada através do procedimento de transformação por eletroporação.

A construção desse plasmídeo se deu pela técnica de montagem por Gibson (GIBSON; YOUNG; CHUANG; VENTER *et al.*, 2009). Esta técnica foi escolhida pela otimização do processo de clonagem, já que consiste todas as etapas principais da clonagem tradicional (amplificação, digestão e ligação) em uma única reação. Primers são desenhados de maneira a criar regiões de sobreposição nas extremidades de todos os fragmentos envolvidos na construção final. Desta maneira, pode se realizar a construção de três ou mais fragmentos numa única etapa. Utilizou-se o pTrc99a como *backbone* mais o gene *ygiV* e foi adicionado o epítipo Myc em sua região N-terminal. Para todos os ensaios com superexpressão de YgiV foi utilizado IPTG 1 mM para indução do promotor *trc*.

### 3.9. Western blot

Para blots usando lisados de células inteiras, as proteínas totais foram extraídas de *S. Typhimurium*, cultivadas em LB para OD<sub>600</sub> de 0,6. Resumidamente, 5 ml de cultura foram sedimentados (13000 rpm por 5 min a 4°C) e ressuspensos em 300  $\mu$ L de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM ditioneitol e 30 mM fluoreto de

fenilmetilsulfonil), lisozima foi adicionada a uma concentração final de 300 µg/mL. A cultura foi incubada a 4°C por 4 h e tratada com DNase I por 45 min a 4 ° C, restos celulares foram sedimentados (13.000 rpm por 10 min a 4 ° C), e o sobrenadante contendo proteína de célula inteira foi removido. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e *immunoblotting* foram realizados como descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os blots foram sondados com anticorpos monoclonais contra Myc. As proteínas foram detectadas usando quimioluminescência intensificada (ECL; Promega).

### 3.10. Análise de expressão gênica por qRT-PCR

Esta análise difere-se pelo emprego de cultivos bacterianos diferentes do padrão. Foram realizados cultivos conforme descritos em 3.1. Entretanto também foram realizados cultivos em anaerobiose até o final da fase exponencial de crescimento empregando meio mínimo contendo por litro: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,94 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,46 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,46 g; NH<sub>4</sub>Cl 1 g e MgSO<sub>4</sub> 2 mmol/L. Este meio foi suplementado com um dos seguintes: glicose (5 mM), fucose (5 mM) ou 1,2-propanodiol (10 mM ou 40mM).

A técnica de qRT-PCR foi empregada conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006). O ensaio de qRT-PCR foi realizado em triplicadas biológicas, e duplicatas experimentais (sextuplicata). Cada reação (20µL) continha o Master Mix SYBR, a transcriptase reversa Multi-scribe (Thermo Fisher Scientific) e inibidor de RNase (Thermo Fisher Scientific) adicionados, além de 100ng de RNA de amostra. Tal enzima possui atividade de transcriptase reversa e DNA polimerase, possibilitando a PCR quantitativa em um único passo (*one-step qPCR*). As reações foram normalizadas com o emprego do *rpoA* (*RNA polymerase subunit A*) como gene de referência. Foi utilizado o equipamento QuantStudio3 como termociclador e leitor de fluorescência (Thermo Fisher Scientific). Os resultados obtidos pelo ensaio de qRT-PCR foram analisados pelo método de *Comparative critical threshold* ( $\Delta\Delta CT$ ), conforme previamente descrito (WALTERS; SPERANDIO, 2006).

### 3.11. Cultivo de célula epitelial

No presente estudo foi utilizada a linhagem de células epiteliais HeLa (Laboratório de Biologia Celular – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP), em ensaios posteriormente descritos. O tipo celular foi cultivado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Thermo

Fisher®), contendo 4 mM de L-glutamina, 1 g/L de glicose (~5 mM), 1 mM piruvato sódico, 10% de soro fetal bovino e Penicilina-Estreptomicina (5000 U/mL, diluída 100x), em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C, com exceção quando indicado no experimento.

### 3.12. Ensaio de invasão de células HeLa

A virulência das cepas do estudo foi mensurada através da quantificação da invasão em células epiteliais HeLa *in vitro* em ensaio com gentamicina, conforme descrito previamente (FIERER; ECKMANN; FANG; PFEIFER *et al.*, 1993; FINLAY; RUSCHKOWSKI; DEDHAR, 1991; PFEIFER; MARCUS; STEELE-MORTIMER; KNODLER *et al.*, 1999). Infectadas com um MOI (*Multiplicity of infection*) de 100:1 durante 90 min a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, com os inóculos bacterianos normalizados na mesma DO<sub>600</sub>. As células bacterianas após interação com células HeLa, foram tratadas com gentamicina 30 µg/mL por 1h para matar as bactérias extracelulares remanescentes. Assim, após uma incubação extra de 3h a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, lisou-se as células HeLa com solução de Triton-X 100 (1%). Por fim as bactérias foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar LB seletivo (com estreptomicina) para determinação das UFC (unidades formadoras de colônias) de cada cepa testada em triplicatas (FIERER; ECKMANN; FANG; PFEIFER *et al.*, 1993; FINLAY; RUSCHKOWSKI; DEDHAR, 1991; PFEIFER; MARCUS; STEELE-MORTIMER; KNODLER *et al.*, 1999).

## 4. Resultados

### 4.1. Análise da expressão gênica global da amostra mutante $\Delta ygiV$

O RNA total das amostras SL1344 selvagem e  $\Delta ygiV$  de *S. Typhimurium* foi extraído através da utilização do reagente TRIzol® (Ambion™) em conjunto com o kit de extração de RNA RiboPure™ Bacteria (Thermo Fisher Scientific). A qualidade e pureza do RNA extraído foram analisadas no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer®, demonstrando a integridade do RNA (Figura 4).

**Figura 4** – Análise da integridade do RNA para sequenciamento de larga escala

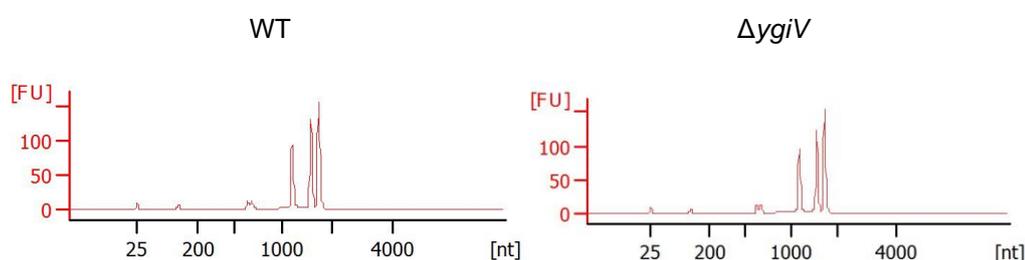


Fig. 4 – Análise da integridade do RNA purificado das amostras SL1344 tipo selvagem e mutante  $\Delta ygiV$  através de corrida eletroforética no equipamento 2100 Bioanalyzer®, em que os picos observados correspondem ao RNA ribossômico de *S. Typhimurium*.

Nesta etapa deparou-se com um entrave técnico, cuja solução não é amplamente divulgada ou conhecida. Como pode ser observado na Figura 4, foram identificados três picos expressivos no RNA das amostras avaliadas. Isso contradiz o consenso, sendo que o esperado são dois picos, cada qual correspondendo aos principais rRNA, 16S e 23S, no caso das bactérias. Esse tipo de observação indica degradação do RNA, entretanto o esperado seria a observação de um *smear* ao invés de um pico extra bem definido. Para compreender o ocorrido, recorreu-se a literatura e descobriu-se que grupos taxonômicos diferentes de bactérias apresentam esta característica de clivar pontos específicos do rRNA, função essa ainda de relevância desconhecida (EVGUENIEVA-HACKENBERG, 2005; SMITH; CRICHTON; OLD; HIGGINS, 1988).

Em seguida foi montado a biblioteca de cDNA com o kit TruSeq® da Illumina, de forma a preparar as amostras para o sequenciamento, o qual foi realizado com o kit V3® da Illumina no equipamento MiSeq® (Illumina). O transcriptoma das amostras foi alinhado ao genoma

referência da cepa SL1344, e os números de transcritos de cada gene foram quantificados com consecutiva análise estatística global de diferença de expressão conforme descrito anteriormente. Foram avaliados e identificados os genes diferencialmente expressos na cepa  $\Delta ygiV$  em relação à cepa selvagem de *S. Typhimurium* (Figura 5).

**Figura 5** – Representação global dos genes diferencialmente expressos em  $\Delta ygiV$

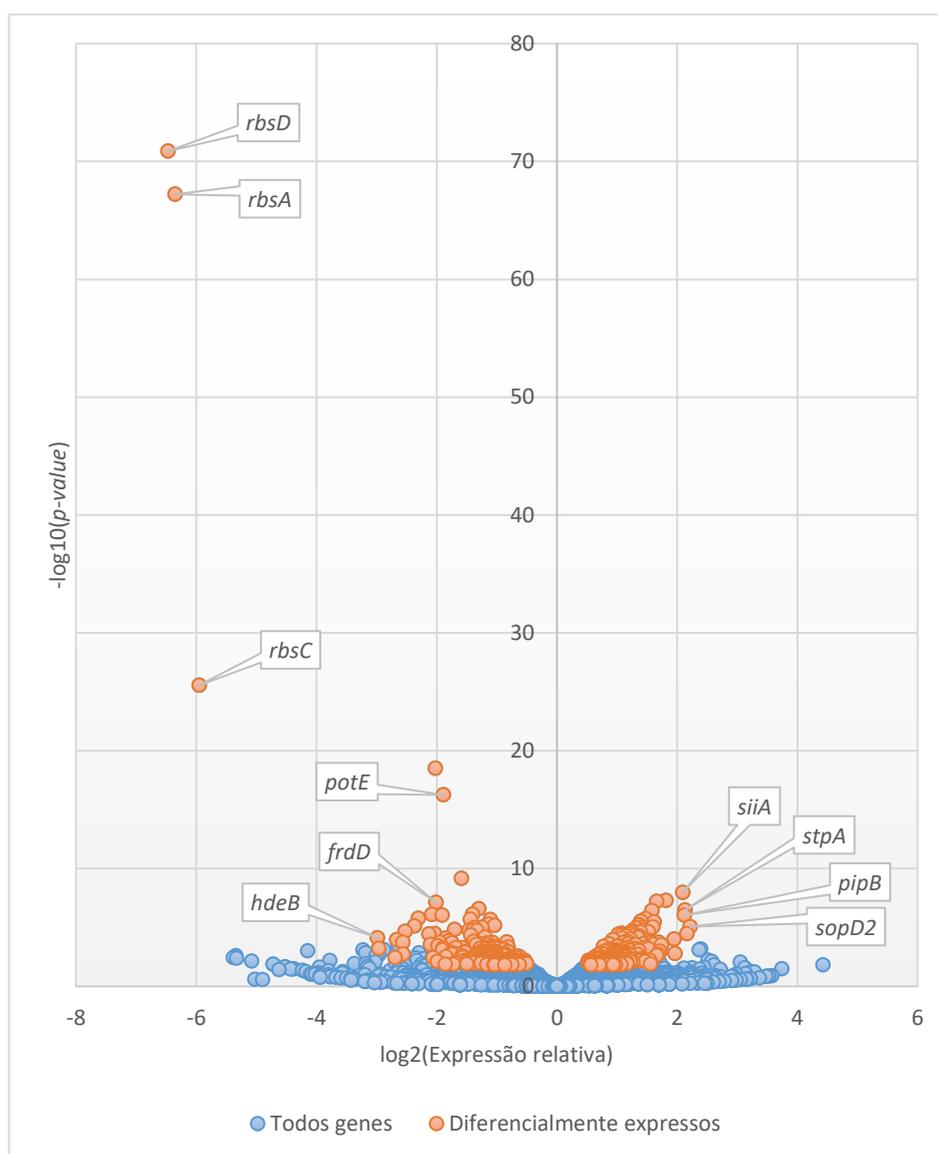


Fig. 5 – *Volcano plot* de 4549 transcritos identificados no sequenciamento, em que 379 foram caracterizados como diferencialmente expressos (marcação alaranjada) pelo teste de Wald seguido de análise de *False Discovery Rate*. Os genes destacados possuem maior diferença de expressão na comparação do mutante com a amostra selvagem.

Dentre os genes destacados, os quais apresentaram maior diferença de expressão e significância estatística na análise, podemos observar um padrão relacionado à função dos

grupos. Os genes com expressão reduzida no mutante  $\Delta ygiV$  em relação à cepa selvagem (*rbsD*, *rbsA*, *rbsC*, *frdD*, *potE*) marcados na Figura 5, codificam proteínas relacionadas ao metabolismo energético, enquanto aqueles marcados com expressão aumentada (*siiA*, *stpA*, *pipB*, *sopD2*) estão relacionados com a patogenicidade de *S. Typhimurium*.

Foi realizada uma ontologia gênica, conforme descrito previamente, dos 379 transcritos diferencialmente expressos. Dentre os 181 transcritos com aumento de expressão, foram identificados 52 genes relacionados à patogenicidade, com enfoque maior no processo de invasão de células epiteliais mediados por SPI-1. Além de 11 genes associados à formação de antígeno-O, importante estrutura de membrana na patogênese de *S. Typhimurium* (Figura 6).

**Figura 6** – Classificação dos genes com expressão aumentada no mutante  $\Delta ygiV$

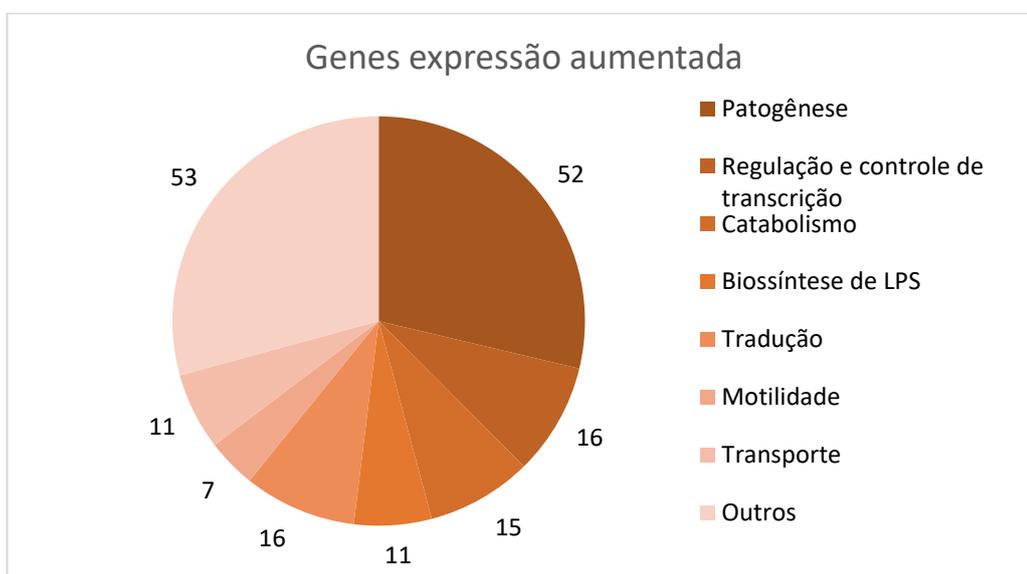


Fig. 6 – Ontologia gênica dos transcritos com expressão aumentada no mutante  $\Delta ygiV$  relativo à amostra selvagem.

Grande parte dos genes com aumento de expressão na ausência de *YgiV* relacionados à patogenicidade pertencem à SPI-1, assim como genes codificantes de proteínas efetoras do TTSS de SPI-1, os quais localizam-se fora de SPI-1 (Figura 7).

**Figura 7** – Expressão de genes da patogênese

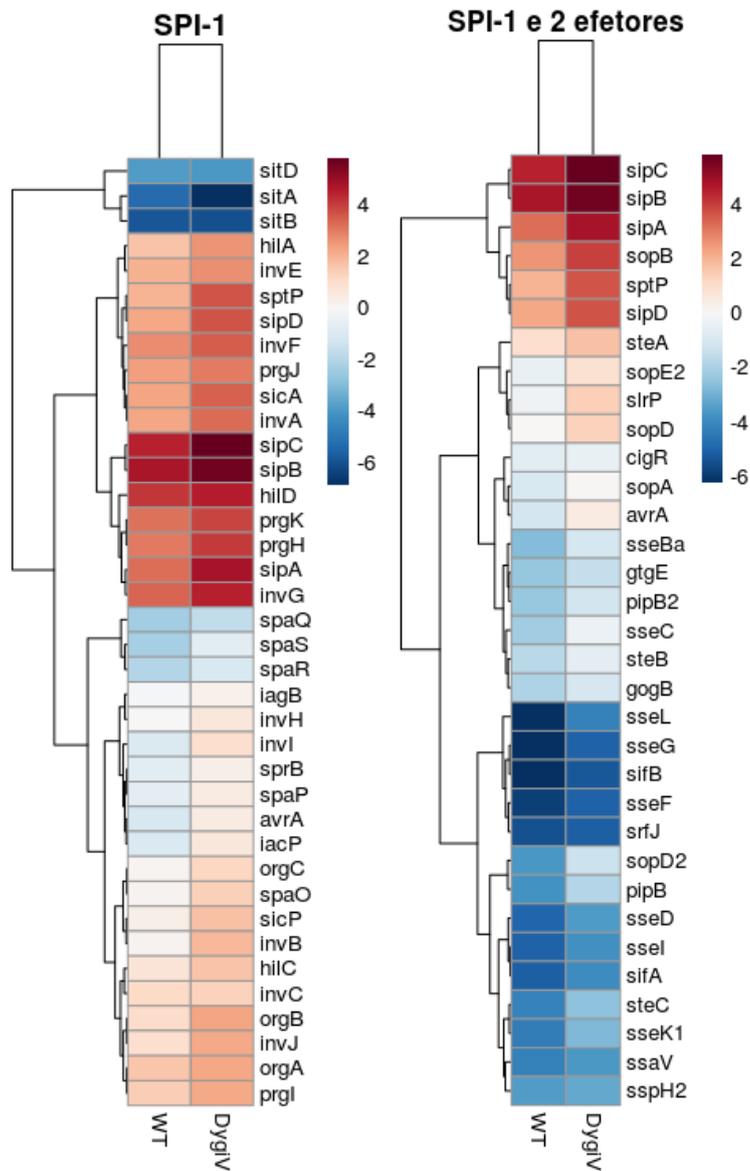


Fig. 7 – *Heatmaps* dos valores de expressão de genes pertencentes a SPI-1 (esquerda) e genes codificantes de proteínas efetoras excretadas pelos TTSS de SPI-1 e 2 (direita) comparando-se os níveis da amostra selvagem (WT) e o mutante de  $\Delta ygiV$  com agrupamento hierárquico dos genes.

Na classificação dos 198 transcritos com expressão reduzida, o grupo dos genes relacionados a processos metabólicos de organo-nitrogenados foi o mais expressivo com 56 representantes. Em seguida, genes relacionados ao metabolismo energético e de açúcares, com 33 genes fazendo parte desses processos (Figura 8).

**Figura 8** – Classificação dos genes com expressão reduzida no mutante  $\Delta ygiV$

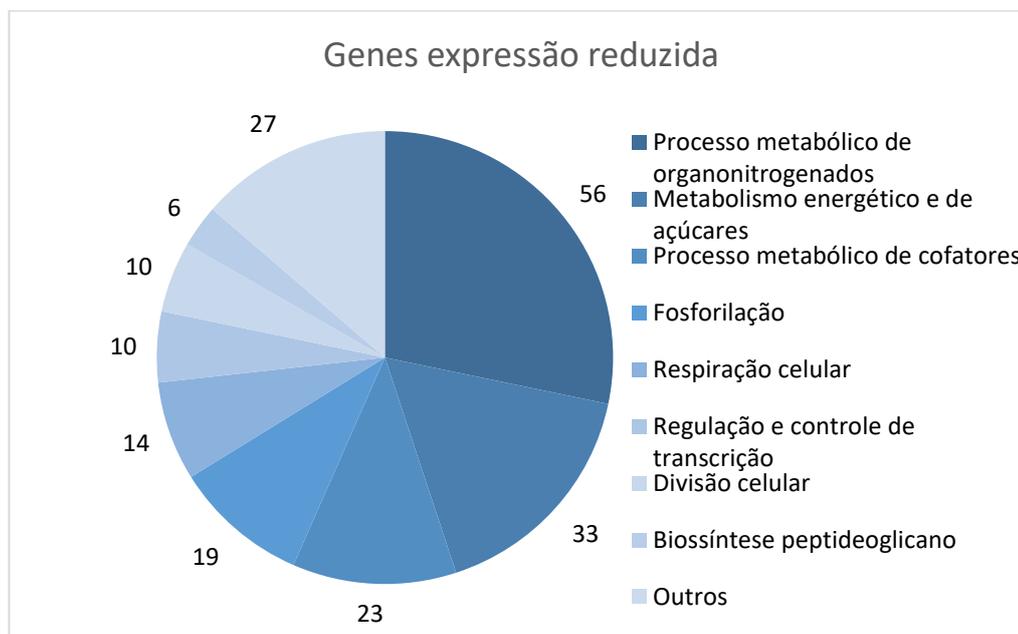


Fig. 8 – Ontologia gênica dos transcritos com expressão reduzida no mutante  $\Delta ygiV$  relativo à amostra selvagem.

Vale ressaltar que dentro deste grupo estão presentes os transcritos com maior significância estatística e maior diferença de expressão, com um enfoque maior no *operon rbs*, responsável pelo catabolismo e *uptake* de ribose (Figura 5).

É importante evidenciar que na análise de ontologia gênica realizada pelo software PANTHER, além da categorização do grupo de transcritos com diferença de expressão, também é realizada uma avaliação do seu enriquecimento. Isto indica quais grupos estão super representados caso os transcritos com diferença de expressão fossem uma amostragem aleatória. Dentro dos transcritos com aumento de expressão no mutante  $\Delta ygiV$ , houve um enriquecimento de 9,96 vezes no grupo relacionado à patogenicidade. Enquanto para os transcritos com expressão reduzida no mutante  $\Delta ygiV$ , houve enriquecimento na ordem de 20 vezes para o transporte de maltose e processo catabólico de ribose. Tais informações podem indicar um papel de YgiV como mediador no balanço entre ativação da patogênese, com enfoque maior no processo de invasão de células epiteliais, e processos catabólicos relacionados na obtenção de energia.

#### 4.2. Validação dos genes diferencialmente expressos

Dentro do grupo de genes com diferença de expressão acentuada e estatisticamente significativa observados no mutante  $\Delta ygiV$  comparado com amostra selvagem na análise transcriptômica, 7 foram selecionados para a validação através de qRT-PCR. Ambos os genes relacionados com a motilidade, *fliC* e *motA*, assim como aqueles relacionados ao processo de invasão de células epiteliais, *sipA* (SPI-1) e *sopB* (SPI-5), apresentaram a diferença de expressão validada pelo ensaio de qRT-PCR (Figura 9).

**Figura 9** – Validação dos genes com expressão aumentada na análise global

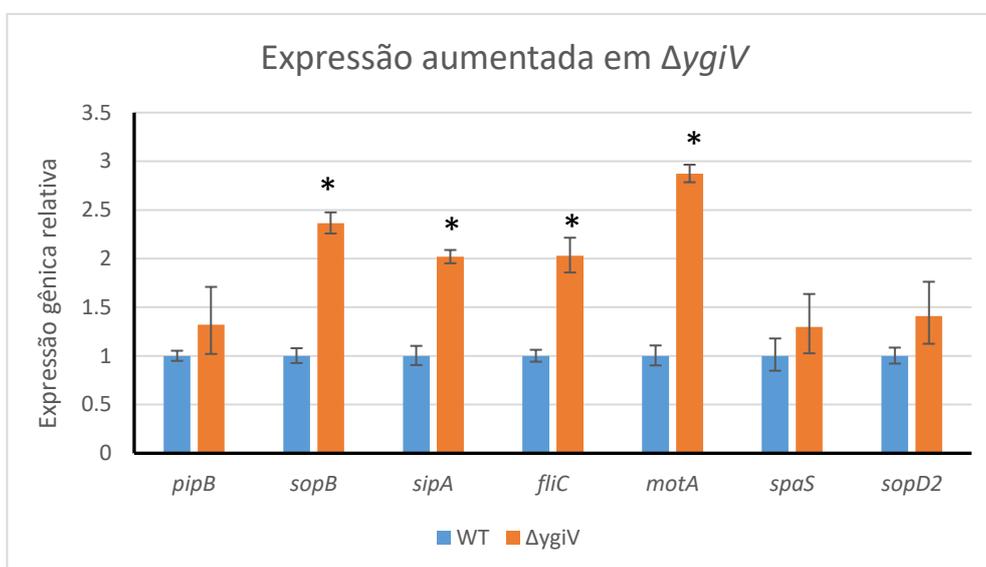


Fig. 9 – Ensaio de validação de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) e mutante  $\Delta ygiV$  por qRT-PCR de genes cuja expressão apresentou-se aumentada no mutante na análise de larga escala de RNAseq. \* valor de  $p < 0,05$ .

Os genes *spaS* (SPI-1), *pipB* e *sopD2* (SPI-5) apresentaram aumento de expressão no mutante  $\Delta ygiV$  em comparação com a amostra selvagem, entretanto pouco expressiva e diferente dos níveis observados no RNAseq (Figura 9). Todos os 6 genes testados, com expressão reduzida na ausência de YgiV no ensaio transcriptômico, foram validados pelo qRT-PCR em níveis de diferença similares ao RNAseq (Figura 10).

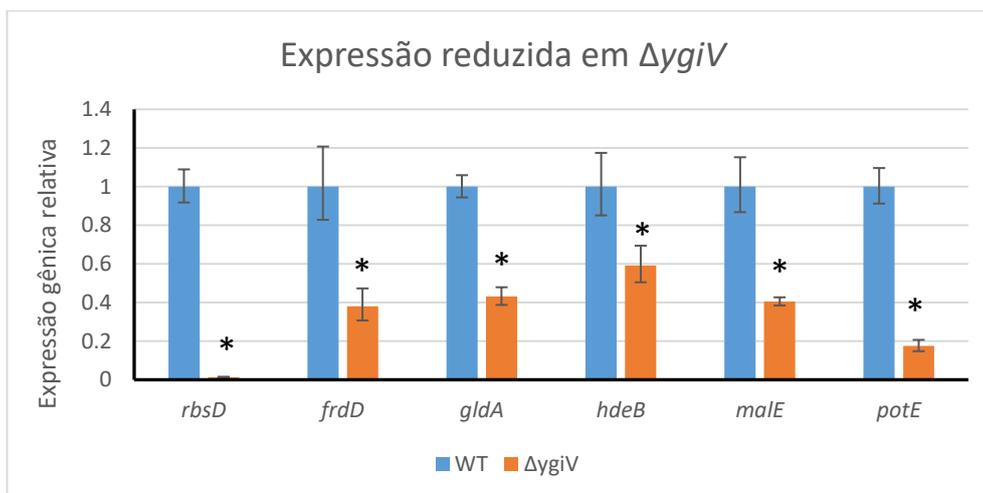
**Figura 10** – Validação dos genes com expressão reduzida na análise global

Fig. 10 – Ensaio de comparação de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) e mutante  $\Delta ygiV$  de genes cuja expressão apresentou-se reduzida no mutante na análise de larga escala de RNAseq. \* valor de  $p < 0,05$ .

Os genes com expressão reduzida no mutante  $\Delta ygiV$  foram selecionados conforme os valores de diferença de expressão observados no RNAseq e os grupos de ontologia gênica enriquecidos. Assim, *rbsD* e *malE* são os representantes do grupo relacionado com o transporte e catabolismo de açúcares, ribose e maltose, respectiva e especificamente (BAO; DALAL; CYTRYNBAUM; DUONG, 2015; BELL; BUCKEL; GROARKE; HOPE *et al.*, 1986; RYU; KIM; KIM; YOO *et al.*, 2004). O gene *potE* codifica transportador de putrescina/ornitina (KEIKO; KASHIWAGI; SAKU; MIYAMOTO *et al.*, 1992), enquanto que *gldA* e *frdD* são constituintes do metabolismo energético (TRUNIGER; BOOS, 1994; WESTENBERG; GUNSALUS; ACKRELL; SICES *et al.*, 1993). Uma chaperona associada à resistência a pH ácido é codificada por *hdeB* (ZHAO; HOURY, 2010).

### 4.3. Análise transcriptômica comparativa de YgiV e QseC

Previamente foi realizado o RNAseq do mutante  $\Delta qseC$  pela aluna de mestrado Luana de Sales Leite do laboratório PASIQUIBAC. A importância desta análise reside no fato de que junto a *visP*, *ygiV* é um dos genes com maior superexpressão no mutante  $\Delta qseC$  comparado com a amostra selvagem. Assim, genes com a expressão diametralmente oposta nos mutantes comparado com a amostra selvagem possuem maiores chances de serem alvos específicos da regulação mediada por YgiV. Desta forma, o grupo de genes com aumento de expressão no

mutante  $\Delta qseC$  em comparação com a amostra selvagem foi cruzado com aqueles com expressão reduzida em  $\Delta ygiV$  relativos à amostra selvagem. Tal análise resultou em apenas 13 genes em comum. Entretanto, no cruzamento do grupo de genes de expressão reduzida em  $\Delta qseC$  (852) com genes superexpressos em  $\Delta ygiV$  (181), ambos relativos à WT, foram identificados 74 genes em comum. Isso representa um enriquecimento de aproximadamente 2,46 vezes, caso ambos os grupos fossem escolhidos aleatoriamente dentre os 5137 genes de *S. Typhimurium*. Realizou-se uma ontologia gênica com os 74 genes resultando em um enriquecimento de 21,60 vezes para genes de processos patogênicos, principalmente genes envolvidos no processo de invasão de células epiteliais de SPI-1, SPI-4 e SPI-5. Além disso, também foram identificados nessa ontologia gênica os processos de tradução, montagem do ribossomo e processo catabólico da treonina. O último em conjunto com os genes que não apareceram na análise estão todos relacionados com processos metabólicos em anaerobiose. Essas informações reforçam a hipótese de YgiV como um repressor transcricional.

#### 4.4. Caracterização *in silico* de YgiV

Com o objetivo de se caracterizar a proteína YgiV funcionalmente foi realizada a modelagem de sua estrutura tridimensional, assim como a caracterização de seus principais domínios (Figura 11).

**Figura 11** – Modelo de YgiV de *S. Typhimurium*

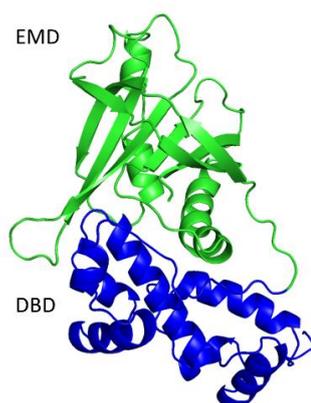


Fig. 11 – Modelagem da estrutura tridimensional de YgiV e caracterização dos dois domínios funcionais: EMD (*Effector/Multimerization Domain*) e DBD (*DNA Binding Domain*) através dos softwares RaptorX e Modeller.

A estrutura tridimensional de YgiV foi modelada com base no cristal do fator de transcrição Rob de *Escherichia coli* (1D5Y – código no PDB – *Protein Data Bank*), representante da família AraC/XylS (A/X), o qual apresentou maior homologia com a sequência de YgiV. Assim como diversos outros representantes da família A/X, YgiV apresenta *DNA Binding Domain* (DBD) na região N-terminal, apresentando dois *motifs Helix-Turn-Helix* (HTH) ligados por uma  $\alpha$ -hélice, caracterizados por possuírem função de ligação e/ou interação com DNA dupla-fita. Em sua região C-terminal foi caracterizado o domínio *Effector/Multimerization Domain* (EMD), este não sendo presente em todos os representantes da família A/X e de função variável, podendo exercer papel de interação com molécula efetora ou amplificação do sinal por multimerização (Figura 11) (GALLEGOS; SCHLEIF; BAIROCH; HOFMANN *et al.*, 1997).

A partir da estrutura tridimensional modelada de YgiV foi possível a realização de ensaios de predição de ligantes a fim de se analisar sua função. Inicialmente efetuou-se a predição de ligantes baseada em suas estruturas secundárias e terciárias, assim como propriedades eletroestáticas e hidrofobicidade de sua superfície. Para tal foi utilizado o software RaptorX na função *Binding* (KÄLLBERG; WANG; WANG; PENG *et al.*, 2012). Assim como esperado, foi predito função de ligação a nucleotídeos em seu domínio DBD (Figura 12).

**Figura 12** – Predição a ligantes de YgiV

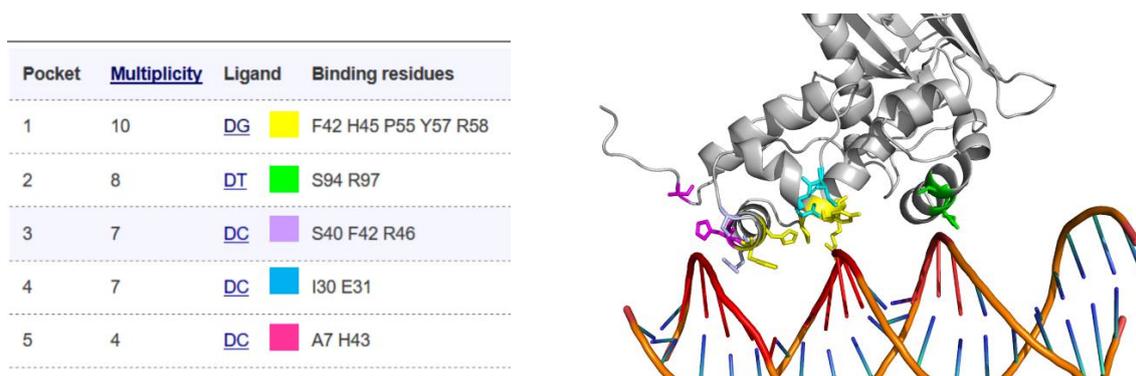


Fig. 12 – Predição de ligantes à estrutura tridimensional de YgiV através do software RaptorX. Quadro fornecido pelo software com a caracterização dos *pockets*, ou sítios de interação; multiplicidade (*Multiplicity*) – valor calculado pelo software com ranking de maior probabilidade de interação de cada *pocket*; provável ligante de cada *pocket* (DG – desoxiguanosina, DT – desoxitimina, DC - desoxicitosina); cor do *pocket*; e resíduos (aminoácidos) de YgiV que compõem cada *pocket* (esquerda). Estrutura

tridimensional de YgiV interagindo com molécula de DNA dupla-fita com os *pockets* de interação coloridos conforme o quadro (direita).

Através dessa análise foram identificados cinco sítios de interação com DNA no domínio DBD, assim como também foi predito com quais nucleotídeos cada sítio possui maior afinidade de interação (Figura 12).

Também foram realizadas análises de conservação de *motifs* e resíduos na sequência de YgiV. Extraiu-se do banco de dados EggNOG um total de 356 sequências de proteínas pertencentes a 283 espécies diferentes, classificadas como ortólogos de YgiV. Então foi realizada uma busca de *motifs* conservados nas sequências dessas proteínas através do software MEME, dos quais destacaram-se três *motifs* (Figura 13) devido à sua conexão com as informações obtidas na análise estrutural acima citada.

**Figura 13** – Conservação de resíduos nos ortólogos de YgiV

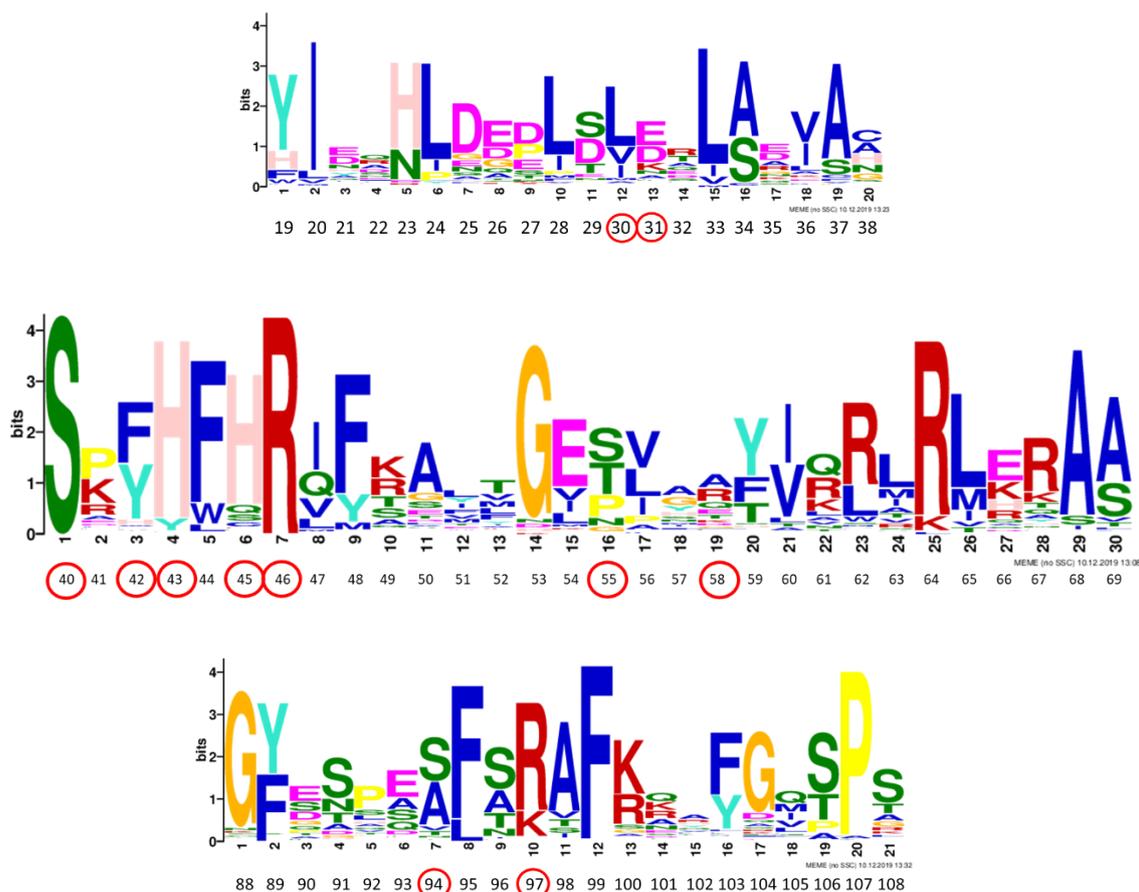


Fig. 13 – *Sequence logo* (logotipo de sequência) de três *motifs* identificados pelo software MEME através de análise de conservação de sequências dos ortólogos de YgiV. Cada letra é referente a um

resíduo de aminoácido e o seu tamanho é equivalente à sua representatividade entre todos os ortólogos na mesma posição do *motif*. Abaixo de cada *logo* está a sequência numérica dos resíduos de YgiV de *S. Typhimurium* SL1344. Estão circulados em vermelho os resíduos também identificados na análise estrutural de função.

No primeiro *motif* foi identificado o quarto *pocket* da análise estrutural descrita anteriormente, em que se destacam os resíduos I30 (terceiro resíduo mais conservado nesta posição) e E31 (resíduo mais conservado). O terceiro *pocket* (S40, F42 e R46) demonstrou-se altamente conservado entre as sequências dos ortólogos de YgiV, sendo observado no segundo *motif* (Figura 13). Este também apresenta elementos do primeiro *pocket* (F42, H45, P55 e R58) e do quinto (H43). Já no terceiro *motif* foi identificado o segundo *pocket* de interação (S94 e R97) (Figuras 12 e 13).

Vários softwares de predição de resíduos com potencial de interação com DNA apresentam um erro embutido pela semelhança das características de tais resíduos com aqueles que interagem com RNA. De forma a avaliar esta possibilidade, foi realizada análise da sequência de YgiV pelo software DRNAPred, o qual utiliza-se de um vasto banco de dados com proteínas com função reportada e testada de ligação a DNA e RNA (YAN; KURGAN, 2017). Além disso, foi efetuada análise de potencial de interação com DNA de resíduos através de um método de aprendizado de máquina, nomeado *Support Vector Machine* (SVM), o qual utiliza-se de informações de bancos de dados para identificação de tais resíduos pelo software DP-Bind (HWANG; GOU; KUZNETSOV, 2007). Ambas as análises identificaram diversos resíduos na sequência de YgiV com potencial de interação com DNA, sendo que vários deles já previamente apontados nas análises anteriores (Figura 14).

**Figura 14** – Predição de resíduos de YgiV com potencial para ligarem-se a nucleotídeos

DRNAPred		DP-Bind					
POS	RES	POS	RES	POS	RES	POS	RES
38	H	7	A	97	R	180	S
40	S	9	Y	98	A	181	Q
42	F	12	R	99	F	186	A
43	H	14	R	100	K	187	W
45	H	15	R	101	T	196	A
46	R	35	R	103	F	197	Q
49	T	37	A	105	Q	199	R
50	T	38	H	106	S	207	R
55	P	39	S	107	P	225	G
64	R	40	S	108	R	226	R
79	K	42	F	109	R	231	R
91	N	43	H	110	F	232	H
92	P	45	H	111	R	235	S
93	E	46	R	112	Q	253	A
94	S	47	Q	119	W		
96	T	48	F	122	R		
97	R	49	T	125	K		
100	K	50	T	144	T		
101	T	51	W	145	R		
103	F	58	R	154	H		
104	G	64	R	161	S		
106	S	65	L	162	A		
108	R	66	R	163	A		
109	R	67	R	164	K		
111	R	68	A	167	A		
170	R	69	S	168	W		
172	T	70	W	170	R		
226	R	71	R	171	E		
227	C	73	A	175	S		
231	R	96	T	179	S		

Fig. 14 – Predição de resíduos de YgiV com potencial para ligarem-se a nucleotídeos através de dois algoritmos distintos: DRNAPred (esquerda) e DP-Bind (direita). POS – posição na sequência primária de YgiV; RES – resíduo de aminoácido correspondente à posição declarada. Estão marcados em vermelho os resíduos identificados na análise estrutural e de conservação filogenética descritas anteriormente.

Cruzando as informações obtidas dos distintos métodos utilizados de predição de interação com DNA, foram identificados no domínio DBD os seguintes *motifs* com maior potencial: F42, H45, P55, R58 e S40, F42, R46.

Com o intuito de se caracterizar o domínio EMD de YgiV foi realizada outra análise de predição com o software RaptorX na função *Binding*, desta vez somente com a estrutura de EMD. O software identificou dois *pockets* de interação. O primeiro apresentou uma multiplicidade de 30 e ligante mais provável a molécula de imidazol. O segundo *pocket* possui multiplicidade de 8 e ligantes mais prováveis as seguintes moléculas: glicerol, 1,2-propanodiol e etanodiol (Figura 15).

**Figura 15** – Predição de ligantes ao domínio EMD de YgiV.

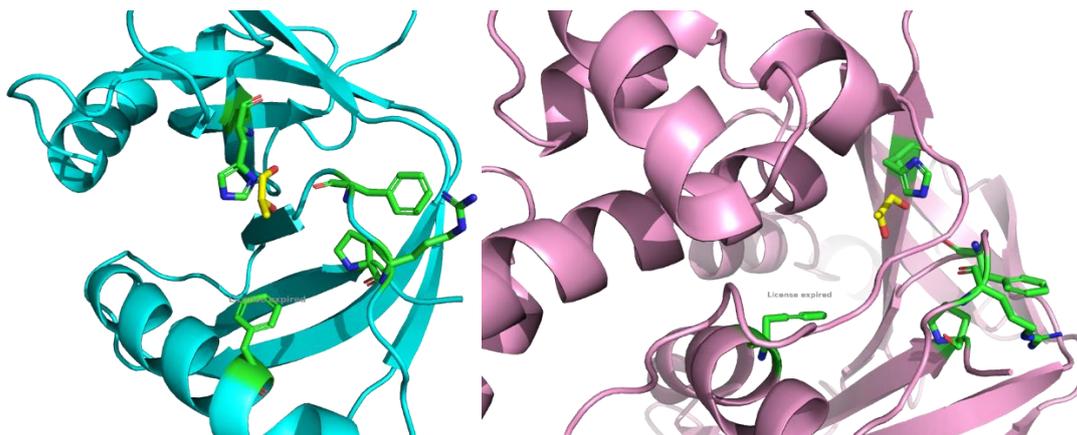


Fig. 15 – Predição de ligantes ao domínio EMD de YgiV. Estrutura tridimensional exclusiva do domínio EMD de YgiV (ciano) com os resíduos identificados pelo software RaptorX (verde) interagindo com molécula de 1,2-propanodiol (amarelo) no *pocket* identificado (esquerda). Estrutura tridimensional total de YgiV (magenta) após alinhamento com o domínio EMD evidenciando manutenção das posições dos resíduos identificados (verde) ao redor da molécula de 1,2-propanodiol (amarelo) (direita).

Através da análise previamente realizada de conservação de resíduos pelos ortólogos de YgiV buscou-se quais dos identificados no domínio EMD pela análise de propriedades estruturais podem ser caracterizados como altamente conservados. Três resíduos do segundo *pocket* (F247, R259 e P286) destacaram-se com conservação significativa em dois *motifs* distintos (Figura 16).

**Figura 16** – Conservação de resíduos de EMD com função predita de interação

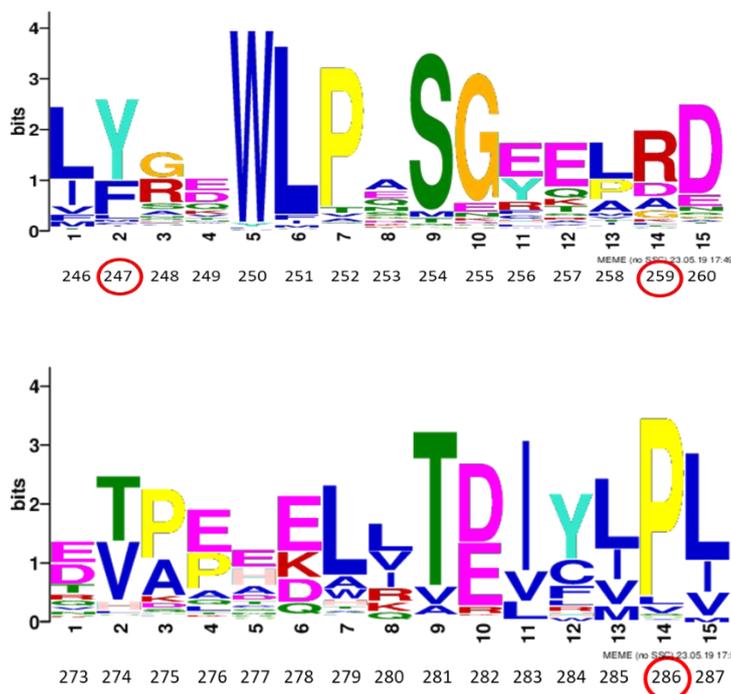


Fig. 16 – *Sequence logo* (logotipo de sequência) de dois *motifs* identificados pelo software MEME através de análise de conservação de sequências dos ortólogos de YgiV. Cada letra é referente a um resíduo de aminoácido e o seu tamanho é equivalente à sua representatividade entre todos os ortólogos na mesma posição do *motif*. Abaixo de cada *logo* está a sequência numérica dos resíduos de YgiV de *S. Typhimurium* SL1344. Estão circulos em vermelho os resíduos também identificados na análise estrutural de função.

#### 4.5. Caracterização *in silico* de potenciais elementos *cis* e provável *regulon* de YgiV

Através da análise estrutural de predição de interação de YgiV com DNA (Figura 24) foi possível a construção de uma provável sequência consenso de DNA: ACA[G/T]CAC[A/T]GNAC[T/G] (destacado em vermelho os nucleotídeos com maior probabilidade de interação). Sendo essa sequência o possível elemento *cis* de regulação transcricional na região promotora dos genes alvos do *regulon* de YgiV. Com tal sequência foi possível a construção de três *motifs* distintos, os quais variam de acordo com a plasticidade de cada resíduo, informação essa determinada pelo fator de probabilidade de interação. Variando de maior para menor plasticidade criou-se os *motifs*: NCNNCNCNGNNK, RCRKRCNGNRYK, ACAKCACWGNACK; com as respectivas identificações: pred\_BS.1, pred\_BS.3, pred\_BS.4. Tais *motifs* foram utilizados para análise posterior de escaneamento

das regiões promotoras de todos os genes de *S. Typhimurium* SL1344 através do software FIMO. Foram identificados no total 3817 possíveis elementos *cis* contidos na região promotora de 1865 genes dos 5137 de *S. Typhimurium* para os três *motifs* utilizados. Em sequência foi realizada uma ontologia gênica dos 1865 genes, e surpreendentemente o grupo com maior enriquecimento dentro dos estatisticamente significantes foi o mesmo identificado no RNAseq do mutante  $\Delta ygiV$ , processos biossintéticos de compostos organo-nitrogenados.

O alinhamento das 3817 sequências identificadas pelo FIMO gerou a possível sequência consenso de interação com YgiV (Figura 17).

**Figura 17** – Elemento *cis* de interação com YgiV



Fig. 17 – *Sequence logo* (logotipo de sequência) do possível elemento *cis* de interação com o fator de transcrição YgiV realizado através do alinhamento das 3817 sequências identificadas pelo FIMO.

É importante ressaltar que dentro dos 1865 genes houveram 52 em comum com os 181 genes com expressão aumentada no transcriptoma do mutante  $\Delta ygiV$ . Apesar de não configurar enriquecimento positivo comparado a grupos selecionados aleatoriamente de mesmo tamanho, o pequeno grupo apresentou ontologia gênica significativa com enriquecimento de 9,49 vezes para processos patogênicos exclusivamente de invasão de células epiteliais.

Desta maneira, foi realizada uma busca pelos *motifs* identificados pelo FIMO com relação nos processos biológicos evidenciados nas análises posteriores: patogênese, metabolismo de açúcares e biossíntese de organonitrogenados, assim como relação com as moléculas preditas a se ligarem no EMD (Tabela 1).

Tabela 1 – *Motifs* selecionados baseado em análises prévias

Gene	<i>motif</i>	Início	final	fita	FIMO score	p-value	Sequência
<b>Catabolismo de açúcares</b>							
<i>araD</i>	pred_BS.3	218	230	-	108.909	2,74E-05	CCAGCGCAGCGCG
<i>araJ</i>	pred_BS.3	67	79	+	106.242	4,85E-05	GCCGCGCTGGATG
<i>malG</i>	pred_BS.1	271	283	-	978.788	6,50E-05	CCGCCGCCGCCTT
<i>manY</i>	pred_BS.1	22	34	-	100.545	1,07E-05	GCGTCGCCGGCGG
<i>manY</i>	pred_BS.1	16	28	+	9,8	5,32E-05	CCAACGCCGCCGG
<i>rbsB</i>	pred_BS.1	10	22	-	9,8	5,32E-05	ACCGCCAGCGCG
<i>rhaD</i>	pred_BS.1	289	301	-	978.788	6,50E-05	GCGACGCGGGCGT
<i>treA</i>	pred_BS.3	214	226	+	106.121	5,72E-05	ACGTCCCGGCGTG
<i>treF</i>	pred_BS.3	153	165	-	146.121	1,29E-05	ACGTCACCGCATG
<i>treR</i>	pred_BS.1	25	37	-	9,8	5,32E-05	TCGGCGCGGAGGG
<i>treZ</i>	pred_BS.3	57	69	-	108.788	3,28E-05	GCAGCGCGGGGTC
<i>treZ</i>	pred_BS.1	60	72	+	9,8	5,32E-05	CCCGCGCTGCTGG
<i>zwf</i>	pred_BS.4	328	340	-	198.303	3,17E-07	ACAGCACTGTACT
<b>Patogênese</b>							
<i>hilD</i>	pred_BS.4	129	141	+	105.939	1,92E-05	ACCGCACAGGACA
<i>prgH</i>	pred_BS.4	345	357	-	105.939	1,92E-05	ACCGCACAGGACA
<i>sicP</i>	pred_BS.3	302	314	-	108.788	3,28E-05	CCATCGCCGGGCG
<i>sopB</i>	pred_BS.1	258	270	+	9,8	5,32E-05	GCCTCCCCGCCTG
<i>sopD2</i>	pred_BS.4	228	240	-	93.697	8,37E-05	ACAGCGCATAACG
<i>sopE</i>	pred_BS.3	147	159	-	106.121	5,72E-05	CCAGCGCCGGGTT
<i>steA</i>	pred_BS.1	9	21	-	100.545	1,07E-05	GCTCCGCCGGCGG
<i>qseB</i>	pred_BS.1	153	165	+	9,8	5,32E-05	GCGTCGCCGACGG
<b>Biossíntese de organonitrogenados</b>							
<i>cobB</i>	pred_BS.3	348	360	-	108.788	3,28E-05	GCAGCACCGCGCA
<i>cobD</i>	pred_BS.1	112	124	-	9,8	5,32E-05	ACCGCCCGGCTCG
<i>cobT</i>	pred_BS.3	82	94	+	103.576	8,66E-05	GCAGCGCCGTTTT
<i>cobT</i>	pred_BS.1	61	73	-	9,8	5,32E-05	GCCGCACAGGCCG
<b>Metabolismo do 1,2-propanodiol</b>							
<i>pduA</i>	pred_BS.1	335	347	+	9,8	5,32E-05	GCGGCACGGCTGG
<i>pduB</i>	pred_BS.3	259	271	-	106.121	5,72E-05	ACATCGCCGCGCA

Tabela 1 - *Motifs* selecionados baseado em processos biológicos identificados em análises prévias.

Além dos *motifs* mostrados na Tabela 1, também foram selecionados *motifs* na região promotora de alguns genes do *operon fuc* (fucose), e outros genes dos *operons rha* (rhamnose), *rbs* (ribose) e *man* (manose), todos relacionados com metabolismo de açúcares. Outros genes de SPI-1, vários outros pertencentes aos *operons cbi* e *cob* (cobalamina), e *pdu*

(1,2-propanodiol) também foram selecionados. Entretanto todos os aqui citados e ausentes na tabela apresentam-se no interior ou extremidade final de *operons* já descritos. Desta maneira, o *regulon* de YgiV aparentemente é formado pelos genes contidos na Tabela 1 correlacionando o processo patogênico de invasão de células epiteliais com catabolismo de açúcares.

#### 4.6. Construção do sistema de superexpressão de YgiV

O plasmídeo pTrc99a foi escolhido como *backbone* do sistema, o qual apresenta um promotor induzível por IPTG. Foi usado o epítipo Myc como marcador, e foram feitas construções N e C terminais. Para otimizar o tempo, ao invés da tradicional clonagem, foi realizada a montagem por Gibson (GIBSON; YOUNG; CHUANG; VENTER *et al.*, 2009) para obter as novas construções de plasmídeo. Para avaliá-las, foi feito um *western blot* analisando diferentes *backgrounds* (*E. coli* e *S. Typhimurium*) em busca de possíveis bandas inespecíficas e degradação da proteína alvo (Fig 18).

**Figura 18** – Confirmação da superexpressão de YgiV

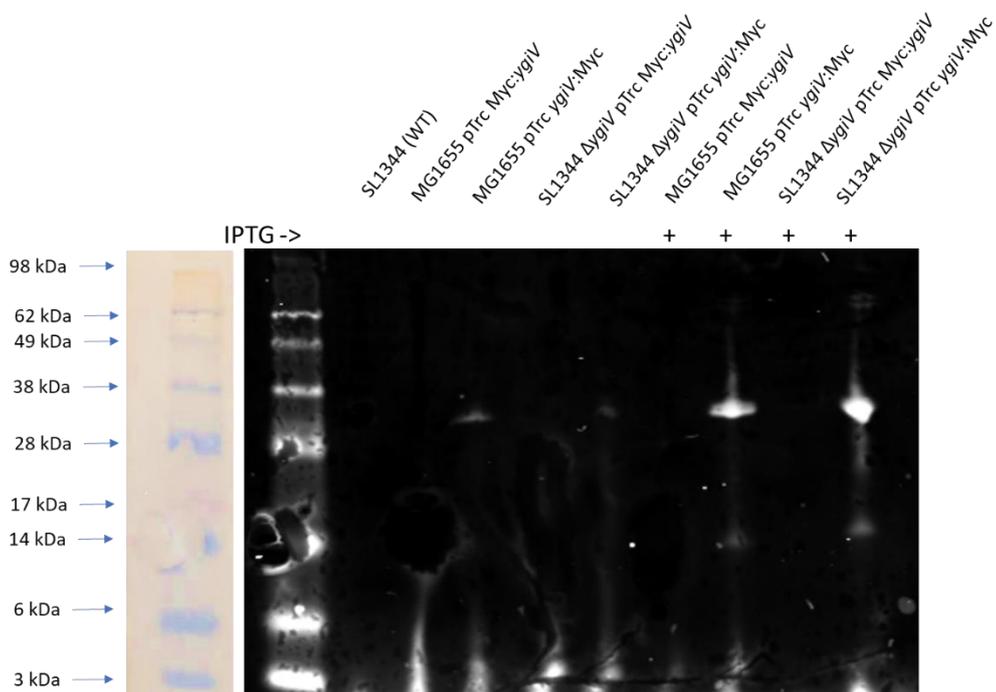


Fig 18 – Western blot anti-Myc de *S. Typhimurium* SL1344 WT; *E. coli* MG1655 com pTrc99a-Myc:ygiV; *E. coli* MG1655 com pTrc99a-ygiV:Myc; SL1344  $\Delta$ ygiV com pTrc99a-Myc:ygiV; SL1344  $\Delta$ ygiV carreando pTrc99a-ygiV:Myc. O sinal de mais (+) indica indução por IPTG.

O novo sistema de superexpressão de YgiV não apresentou banda inespecífica em nenhum dos *backgrounds* de *S. Typhimurium*, bem como mostrou uma resposta perceptível à indução de IPTG sem fortes sinais de degradação. Inicialmente, apenas a construção com Myc C-terminal foi confirmada, pois a N-terminal demonstrou-se um falso positivo (Fig. 14).

#### 4.7. Análise da superexpressão de YgiV na regulação transcricional

Após a confirmação do funcionamento do sistema de superexpressão de YgiV, foram realizados ensaios de análise de expressão gênica por qRT-PCR. Inicialmente foram avaliados os genes com redução de expressão no mutante  $\Delta ygiV$  relativo à amostra selvagem (Fig 19).

**Figura 19** – Superexpressão de YgiV nos genes de expressão reduzida em  $\Delta ygiV$

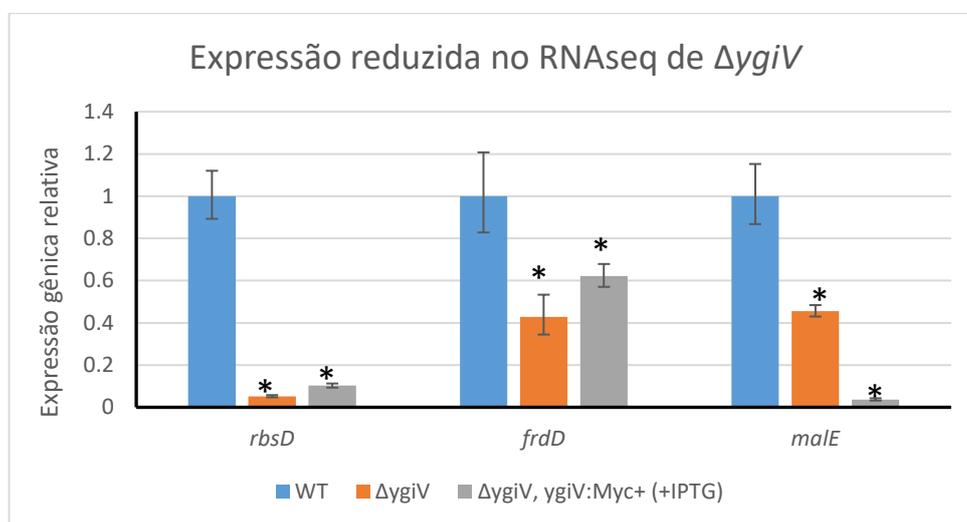


Fig. 19 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT), mutante  $\Delta ygiV$  e mutante  $\Delta ygiV$  complementado com *ygiV*:Myc com superexpressão induzida por IPTG por qRT-PCR de genes cuja expressão apresentou-se reduzida no mutante na análise de larga escala de RNAseq. \* valor de  $p < 0,05$ .

A superexpressão de YgiV acarretou resultados contraditórios para os genes testados, visto que não retornou a expressão aos mesmos níveis da amostra selvagem, assim como também não inverteu a diferença de expressão (Figura 19). Para os genes *rbsD* e *frdD* é perceptível, apesar de não estatisticamente significativa, que a superexpressão de YgiV ocasiona um aumento nos níveis de expressão comparado com a amostra mutante. Isso poderia indicar que YgiV regularia a expressão de tais genes, mas outros fatores são dominantes nessa condição de crescimento. Já para o gene *malE* a superexpressão de YgiV

resultou em maior redução do nível de expressão do gene do que a já observada no mutante  $\Delta ygiV$  (Figura 19).

Também foi avaliado o efeito da superexpressão de YgiV nos níveis transcricionais dos genes com aumento de expressão no mutante  $\Delta ygiV$  relativo à amostra selvagem (Fig 20).

**Figura 20** – Superexpressão de YgiV nos genes de expressão aumentada em  $\Delta ygiV$

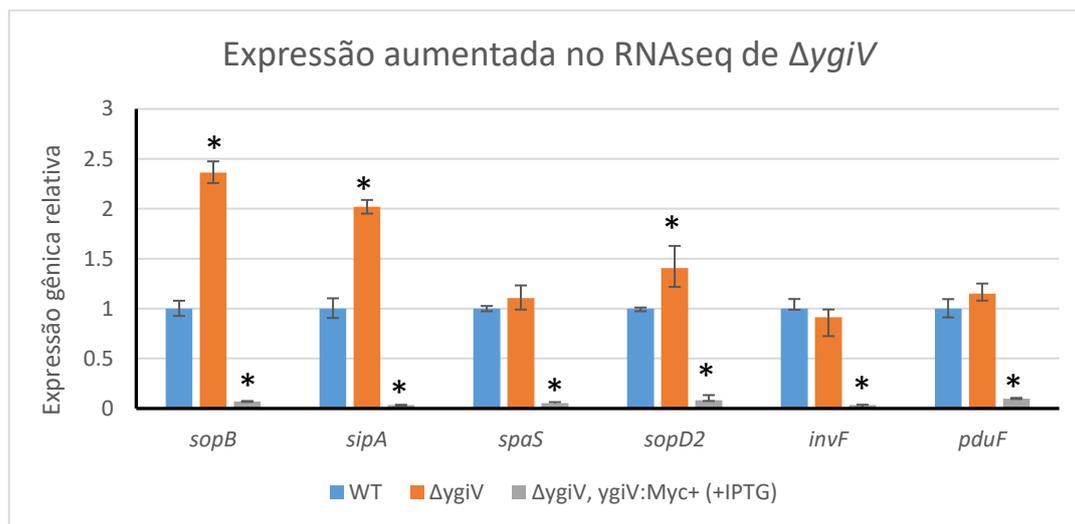


Fig. 20 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT), mutante  $\Delta ygiV$  e mutante  $\Delta ygiV$  complementado com *ygiV:Myc* com superexpressão induzida por IPTG por qRT-PCR de genes cuja expressão apresentou-se aumentada no mutante na análise de larga escala de RNAseq. \* valor de  $p < 0,05$ .

Em todos os genes avaliados a superexpressão de YgiV resultou na redução drástica dos níveis de expressão gênica. Os genes *sopB*, *sipA*, *spaS*, *sopD2* e *invF* são todos importantes no processo de invasão de células epiteliais, enquanto *pduF* codifica a permease para *uptake* de 1,2-propanodiol. Apesar dos níveis de expressão dos genes *spaS*, *invF* e *pduF* não apresentarem diferença significativa no mutante  $\Delta ygiV$  relativo à amostra selvagem, a superexpressão de YgiV demonstrou que YgiV exerce papel na regulação transcricional desses genes.

Os dados obtidos de expressão demonstram que YgiV provavelmente exerce papel de repressor transcricional.

#### 4.8. Análise de expressão gênica em anaerobiose com glicose ou fucose

A invasão de células epiteliais é um processo imprescindível no sucesso da colonização intestinal para a *S. Typhimurium*. Os níveis de oxigênio no lúmen intestinal caracterizam-se por baixos a próximos de zero, podendo ser configurado como ambiente

anaeróbico. A glicose no ambiente intestinal provém quase que em sua totalidade da alimentação fazendo parte de glicanos de origem vegetal como o amido (referencias). Já a fucose intestinal é proveniente de glicanos do muco, sendo liberada como monossacarídeo mediante ação da microbiota (referencias). Assim a glicose poderia ser considerada como fonte energética para a *S. Typhimurium* em período pós-prandial, enquanto a fucose pode ser a principal fonte em situação de jejum. Através dessa conjectura avaliamos a expressão gênica na amostra selvagem em condição de crescimento anaeróbico em meio mínimo suplantado com glicose ou fucose. Foram avaliados os genes de SPI-1 *sipA* e *invF* (Figura 21).

**Figura 21** – Efeitos da glicose e fucose nos genes de SPI-1 durante anaerobiose

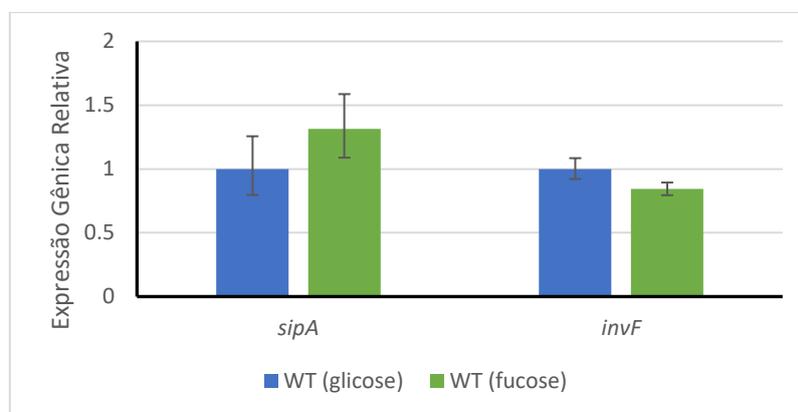


Fig. 21 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) em crescimento anaeróbico com glicose ou fucose como única fonte de carbono por qRT-PCR de genes de SPI-1.

Não foi observado diferença significativa na expressão dos genes de SPI-1 entre as condições de crescimento testadas (Figura 21).

A fucose em anaerobiose é direcionada para a produção de 1,2-propanodiol, o qual será subsequentemente metabolizado para a produção de propionato (referencias). Essa via metabólica é controlada pelo *operon pdu*. Devido a provável correlação de YgiV com metabolismo de 1,2-propanodiol foi avaliada a expressão gênica de três pontos chaves dessa via metabólica. Primeiramente analisou-se o efeito da glicose ou fucose na expressão dessa via em crescimento anaeróbico (Figura 22).

**Figura 22** – Efeitos da glicose e fucose nos genes de *pdu* durante anaerobiose

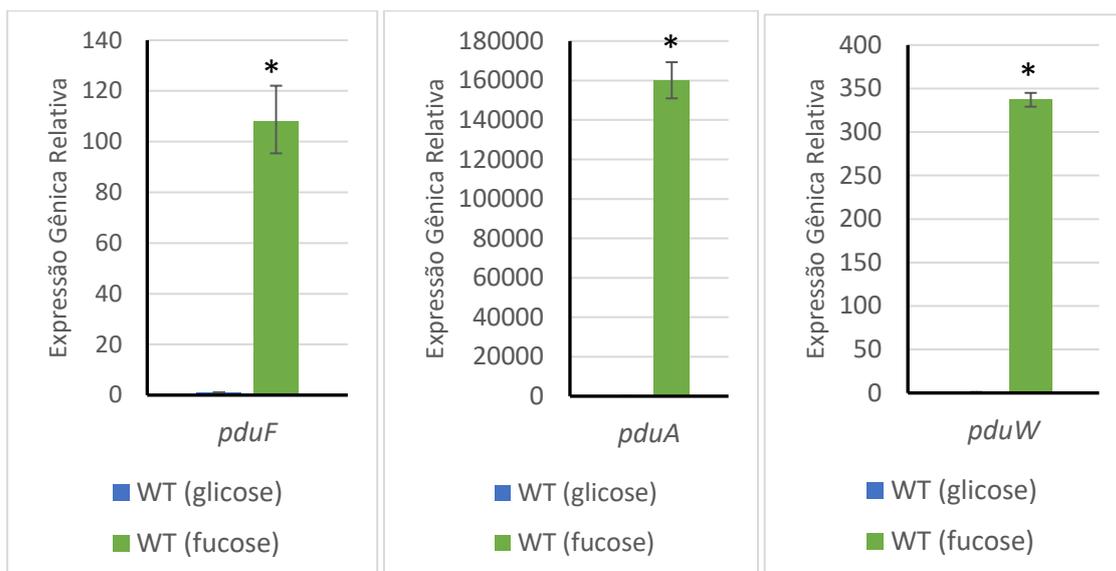


Fig. 22 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) em crescimento anaeróbico com glicose ou fucose como única fonte de carbono por qRT-PCR de genes da via metabólica de 1,2-propanodiol. \* valor de  $p < 0,05$ .

Assim como a fucose é direcionada para a produção de 1,2-propanodiol em anaerobiose, o que já justifica a diferença de expressão observada, a glicose exerce papel de repressão no *operon pdu*, corroborando dados previamente publicados (referencias). É demonstrado aqui que o gene que sofre maior efeito transcricional na mudança de fonte de carbono é *pduA*, primeiro gene do *operon pdu* e que codifica proteína componente do microcompartimento bacteriano Pdu-MCP (referencias).

Para um melhor entendimento do papel de YgiV nesses processos, foi comparada a expressão gênica da amostra selvagem para os genes testados anteriormente com o mutante  $\Delta ygiV$  sob crescimento anaeróbico com glicose como única fonte de carbono (Figura 23).

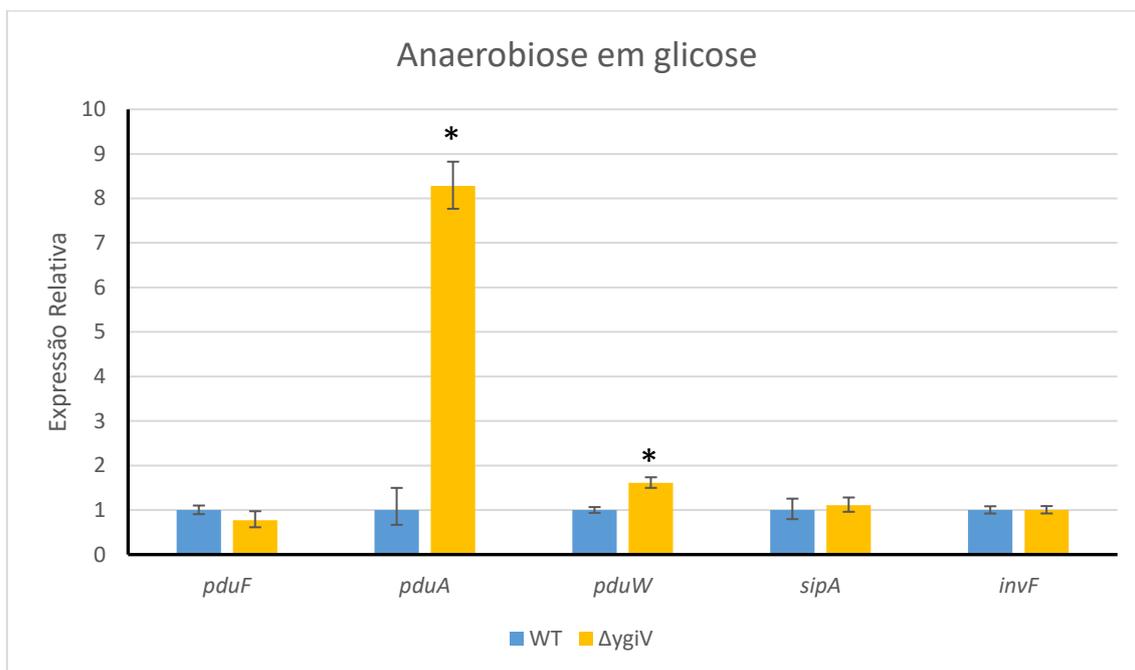
**Figura 23** – Repressão de *pdu* por YgiV no crescimento anaeróbico com glicose

Fig. 23 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) e mutante  $\Delta ygiV$  em crescimento anaeróbico com glicose como única fonte de carbono por qRT-PCR de genes de SPI-1 e da via metabólica de 1,2-propanodiol. \* valor de  $p < 0,05$ .

Aqui podemos constatar que a inibição do *operon pdu* exercida pela glicose é dependente de YgiV (Figura 23). O gene *pduF* apesar de fazer parte da via metabólica do 1,2-propanodiol, ele não se encontra no mesmo *operon*, estando *upstream* de *pduA* em direção oposta. Os genes de SPI-1 não sofreram alteração significativa em sua expressão mediante tal condição de crescimento comparando-se amostra selvagem e mutante  $\Delta ygiV$ .

Posteriormente foi realizada a comparação do nível de expressão do mesmo grupo de genes entre a amostra selvagem e mutante  $\Delta ygiV$  sob crescimento anaeróbico com fucose como única fonte de carbono (Figura 24).

**Figura 24** – Repressão de *pdu* e SPI-1 por YgiV no crescimento anaeróbico com fucose

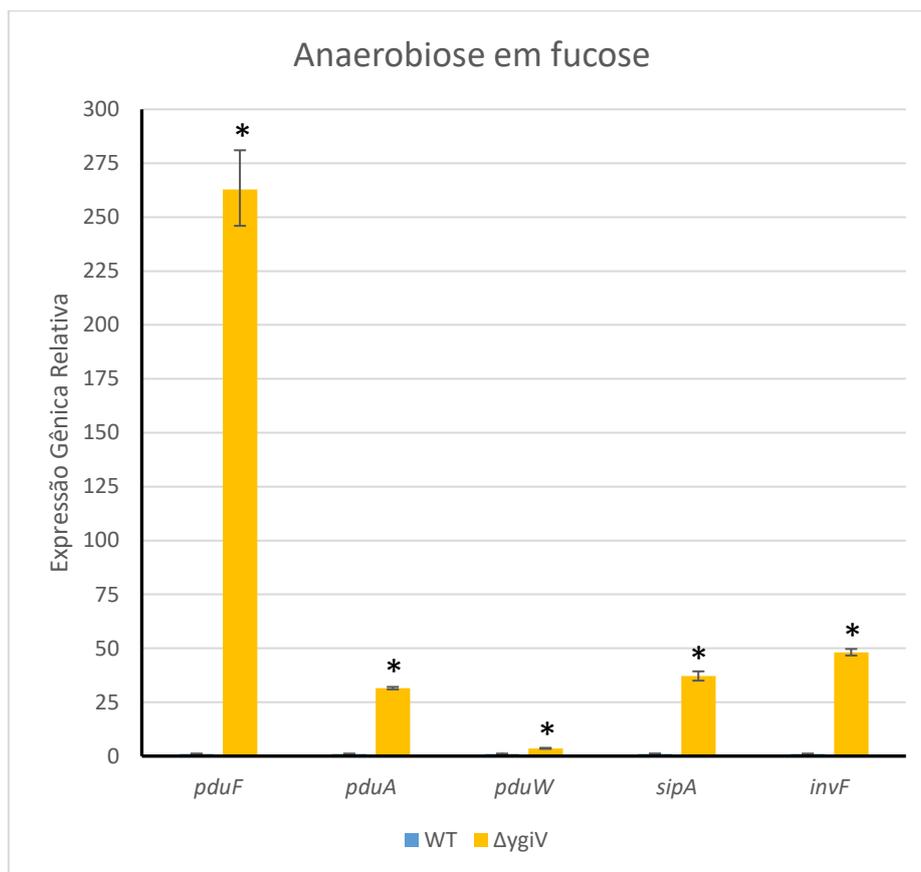


Fig. 24 – Ensaio de análise de expressão gênica entre a amostra selvagem (WT) e mutante  $\Delta ygiV$  em crescimento anaeróbico com fucose como única fonte de carbono por qRT-PCR de genes de SPI-1 e da via metabólica de 1,2-propanodiol. \* valor de  $p < 0,05$ .

O efeito do crescimento anaeróbico em fucose na expressão dos genes relacionados ao metabolismo de 1,2-propanodiol foi consideravelmente aumentado pela ausência de YgiV (Figuras 23 e 24). Ademais, sob tal condição de crescimento foi observado também que YgiV exerce forte papel de repressão transcricional nos genes de SPI-1 (Figura 24).

#### 4.9. Função de YgiV na invasão de células epiteliais.

A fim de se avaliar a influência de YgiV no processo de invasão de células epiteliais foi realizado um ensaio de interação célula-bactéria com a linhagem HeLa na presença de glicose, fucose ou 1,2-propanodiol (Figura 25).

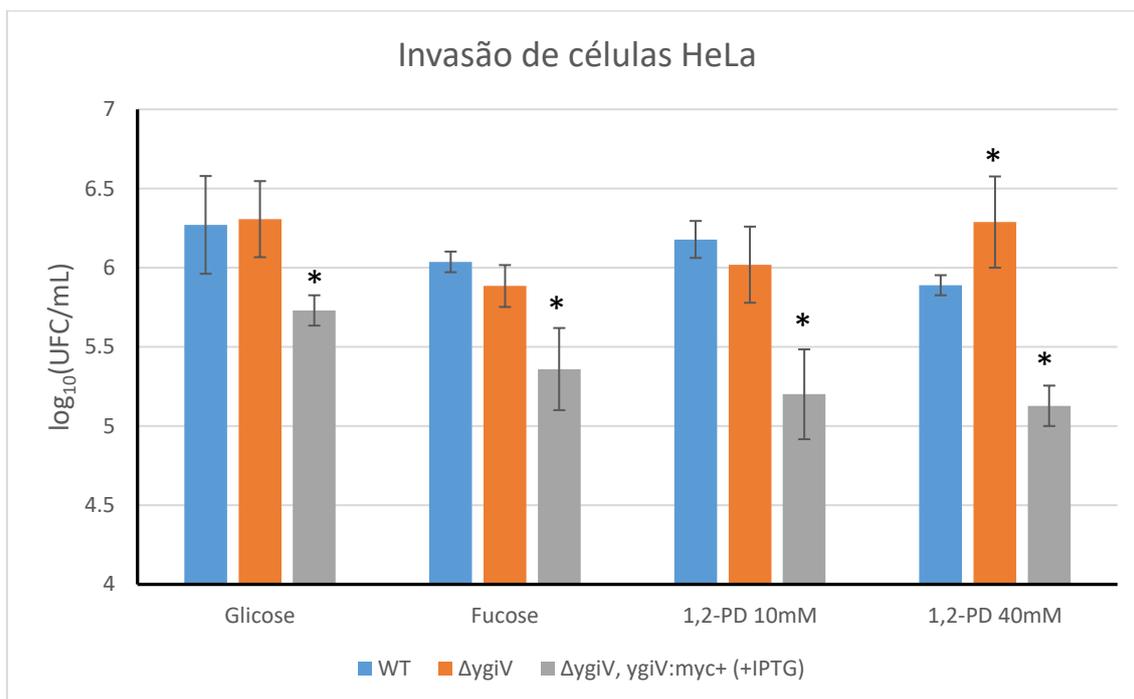
**Figura 25** – Inibição da invasão de células HeLa pela superexpressão de YgiV

Fig. 25 – Análise quantitativa da invasão de *S. Typhimurium* em células epiteliais HeLa em MOI de 100:1, testando a influência das fontes de carbono glicose, fucose e 1,2-propanodiol (1,2-PD), avaliando-se a influência de YgiV neste processo através da comparação entre amostra selvagem (WT), o mutante  $\Delta ygiV$  e o mutante  $\Delta ygiV$  complementado com *ygiV:Myc* com superexpressão induzida por IPTG. Os açúcares glicose e fucose estavam na concentração final de 5 mM. \* valor de  $p < 0,05$ .

Ficou evidente o papel de YgiV na repressão de genes envolvidos no processo de invasão de células epiteliais, sendo que em todas as condições testadas a superexpressão de YgiV resulta em redução do fenótipo comparada com a amostra selvagem (Figura 25). Inicialmente em glicose não há diferença significativa entre a amostra selvagem e o mutante  $\Delta ygiV$ , de acordo com a análise de expressão (Figura 23). Todavia diferente do esperado o ensaio na presença de fucose também não acarretou diferença entre a selvagem e o mutante. É importante ponderar aqui que o ensaio não foi realizado em anaerobiose, o que poderia elevar as diferenças fenotípicas observadas. Vale ressaltar que a única condição em que o mutante  $\Delta ygiV$  apresenta diferença significativa da amostra selvagem é em 40 mM de 1,2-propanodiol, apresentando um aumento de fenótipo de 0,4 ordem de magnitude. Outro fator importante é que conforme avança-se na via metabólica da seguinte forma: fucose  $\rightarrow$  1,2-propanodiol 10 mM  $\rightarrow$  1,2-

propanodiol 40 mM, a diferença entre o mutante  $\Delta ygiV$  e a amostra com superexpressão de YgiV aumenta significativamente, de 0,53 para 1,16 ordem de magnitude (Figura 25).

#### 4.10. Discussão

*S. Typhimurium* é considerado um dos principais patógenos de fonte alimentar de origem bacteriana e ainda é um dos principais modelos de patogenicidade em bactérias Gram-negativas. Apesar de muitos processos já desvendados em sua patogenicidade, muitos detalhes de regulação da resposta frente à colonização do hospedeiro ainda são desconhecidos.

Inicialmente os dados obtidos da análise transcriptômica comparando-se a amostra selvagem de *S. Typhimurium* SL1344 e o mutante  $\Delta ygiV$  em condição de crescimento em meio rico (LB) e aerobiose demonstraram-se ser desafiadores. As diferenças observadas, apesar de significativas estatisticamente, são pouco expressivas em muitos casos. Basta observar as diferenças obtidas no RNAseq e confirmadas por qRT-PCR dos genes de SPI-1 (Figura 9). Os níveis observados de expressão gênica não atingiram três vezes de diferença entre as amostras comparadas (Figura 9). Diferenças de expressão tão sutis podem não acarretar significância biológica perceptível, vide os ensaios de invasão em células HeLa (Figura 25). As diferenças observadas entre a amostra selvagem e o mutante  $\Delta ygiV$  não representam diferença significativa, o que somente foi obtido na presença de 1,2-propanodiol (Figura 25). Esses fatores trouxeram complicações para a análise, que já foi desafiadora somente pela quantidade de dados gerados. É importante salientar que mesmo diferenças altamente expressivas em dados de larga escala podem resultar em falsos positivos ou alvos de múltipla regulação, não resultando em resposta direta nos ensaios subsequentes. Este foi o caso do operon *rbs*, o qual demonstrou-se altamente alterado na análise transcriptômica (Figura 5). Entretanto, a superexpressão de YgiV não alterou significativamente os níveis de expressão do gene *rbsD* (Figura 19). De maneira curiosa, os níveis de expressão gênica de *rbsD* e *malE* na superexpressão de YgiV (Figura 19) apresentaram níveis semelhantes dos observados no RNAseq do mutante de  $\Delta qseC$  (dados pertencentes à mestranda Luana de Sales Leite). Isso pode ser justificado pelo fato de *ygiV* ser um dos genes com maior nível de expressão em  $\Delta qseC$ , na ordem de 100 vezes, comparado à amostra selvagem. Para esses casos, obviamente há uma regulação transcricional multifatorial ou efeito indireto causado por YgiV.

Inclusive, por YgiV ser um regulador transcricional, o cruzamento dos dados do RNAseq de  $\Delta ygiV$  (ausência do regulador) com o RNAseq de  $\Delta qseC$  (situação natural de superexpressão de YgiV) auxiliou substancialmente o direcionamento do presente estudo. Inicialmente reforçando a ideia de YgiV como um repressor transcricional pela convergência dos genes superexpressos no mutante  $\Delta ygiV$  e com baixa expressão gênica em  $\Delta qseC$ . Inclusive alguns dos genes presentes nessa análise também ajudaram a direcionar a definição do *regulon* de YgiV, como *pduF*, gene que codifica permease de 1,2-propanodiol (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995), e genes de SPI-1. Já foi demonstrado na literatura que a utilização de 1,2-propanodiol em conjunto com a maquinaria de SPI-1, resultando em processo inflamatório, é benéfico para a *S. Typhimurium* no processo de colonização e expansão intestinal (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017).

A análise funcional *in silico* demonstrou-se um método extremamente eficaz principalmente pela convergência do estudo estrutural com a conservação evolutiva de resíduos. Os dados gerados pelos softwares utilizados foram imprescindíveis no direcionamento do estudo e na avaliação da ontologia gênica obtida dos transcriptomas. O *pipeline* de softwares seguido no presente estudo pode ser usado futuramente na investigação da função biológica de fatores de transcrição não elucidada.

A conservação de resíduos específicos no domínio DBD na região externa dos *motifs* HTH foi um forte indício da função de YgiV de interação com DNA, assim como a importância destes resíduos em se ligar a uma sequência de DNA específica (Figura 13).

O sistema otimizado de superexpressão de YgiV foi primeiramente idealizado para a realização da técnica de ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation sequencing*) (PERKINS; DAVIES; KLEMM; ROWLEY *et al.*, 2013). Esta técnica consiste no sequenciamento em larga-escala de cromatina imunoprecipitada com anticorpo específico para a proteína alvo após realização de *crosslinking*. O sistema de superexpressão foi optado no lugar de expressão nativa devido ao fato de não ter sido encontrado condição de crescimento que cause a superexpressão natural de YgiV. Um alto nível de expressão da proteína alvo é necessário para esta técnica devido a obtenção picos de sinais acima de um *background*. Avaliando-se dados previamente publicados de larga escala de expressão gênica de *S. Typhimurium* em diversas condições crescimento e estresse (KRÖGER; COLGAN; SRIKUMAR; HÄNDLER *et*

*al.*, 2013; SRIKUMAR; KROGER; HEBRARD; COLGAN *et al.*, 2015) não foi encontrada condição natural que ocasione alto nível de expressão gênica de *ygiV*. Entretanto, foi observado algo que se tornou importante em análises posteriores: *ygiV* apresentou maior expressão em crescimento anaeróbico. Desta maneira para se testar essa hipótese foi utilizado o sistema de superexpressão de YgiV e com ele foram realizados os primeiros ensaios de análise de expressão gênica por qRT-PCR para avaliar este efeito em genes específicos (Figuras 19 e 20). Em estudo prévio foi avaliado os níveis de expressão gênica de *flhDC* mediante superexpressão de HilD, fator de transcrição que regula a expressão de SPI-1 (SINGER; KÜHNE; DEDITIUS; HUGHES *et al.*, 2014), demonstrando a eficácia desta técnica de avaliação de reguladores transcricionais. Primeiramente, em nenhum ensaio de superexpressão de YgiV foi constatado aumento da expressão de genes-alvo comparado com a amostra selvagem (Figuras 19 e 20). Resultou em redução significativa da expressão para todos os genes avaliados, independentemente do nível de expressão no mutante  $\Delta ygiV$  (Figuras 19 e 20). Esses dados indicam o papel de YgiV como repressor transcricional. Contudo mais ensaios que demonstrem a ligação física de YgiV na região promotora dos genes alvo são necessários, como o ensaio de GEMSA (*Gel Electrophoresis Mobility Shift Assay*) (PERKINS; DAVIES; KLEMM; ROWLEY *et al.*, 2013). Nesse ensaio após incubação da proteína purificada com sequências de DNA que supostamente interagem com ela em tubos separados mudando-se a concentração da proteína ou do DNA. Em que logo após é realizada uma eletroforese de cada reação e avalia-se se a mudança de concentração altera o tamanho da banda. Para a realização desse ensaio será necessário adicionar uma marca molecular na sequência da proteína ao sistema de superexpressão que propicie a purificação de YgiV, como uma cauda de histidina (6xHis) ou GST (Glutathione S-Transferase). No momento está sendo discutido com a prof<sup>a</sup> Carol Gross (Gross Lab, UCSF) a realização do ChIP-seq em seu laboratório como continuidade da colaboração realizada. A técnica de ChIP-seq confirmaria a interação física de YgiV com DNA e definiria com maior precisão o *regulon* de YgiV.

O *regulon* predito de YgiV corrobora com os dados do RNAseq de catabolismo de açúcares e patogenicidade mediada por SPI-1. É importante salientar que tais métodos de predição de função precisam agir em conjunto com diversas outras técnicas e posteriormente serem confirmados mediante experimentos. No entanto, as técnicas aqui utilizadas

direcionaram o estudo para o eixo metabólico fucose -> 1,2-propanodiol -> propionato. Inicialmente com a presença do gene *pduF* com aumento de expressão significativo no RNAseq, assim como *cobT* e *cbiL* com expressão reduzida. Seguido da predição de um possível sítio de interação com 1,2-propanodiol no domínio EMD de YgiV. A análise comparativa dos RNAseqs de  $\Delta ygiV$  e  $\Delta qseC$  apresentou vários genes e dentre eles *pduF*. O escaneamento de *motifs* pelas regiões promotoras de *S. Typhimurium* SL1344 retornou genes dos *operons* *cbi*, *cob*, *pdu* e *fuc*. Todos esses dados corroboraram para a investigação de YgiV como regulador transcricional dessa via metabólica, o que foi confirmado pelas análises de expressão gênica por qRT-PCR no modelo de superexpressão de YgiV. Assim os ensaios *in silico* de análise funcional de YgiV corroboram fortemente a proposição de YgiV como fator de transcrição. Formas diferentes de se analisar esta função confirmaram o papel bioquímico de YgiV como proteína que se liga ao DNA (Figuras 12 e 14). Ademais, as informações de conservação dos resíduos de aminoácido no domínio DBD junto com a conservação de *motifs* de sequências nucleotídicas na região promotora de genes alterados na análise transcriptômica convergiram com as análises de predição de ligantes por propriedades estruturais (Figuras 12, 13 e 14). Isso demonstra a importância do papel de YgiV de interação com os elementos *cis* dos genes avaliados, função essa que se mantém no decorrer do processo evolutivo associado ao gene *ygiV* (Figura 13). Além da via metabólica de degradação de fucose à propionato, também foram identificados na predição do *regulon* genes relacionados ao metabolismo de arabinose, manose, maltose, ribose, trehalose e rhamnose (Tabela 1). Tais genes codificam enzimas do catabolismo desses monossacarídeos, exercendo função principalmente sob condição de anaerobiose (NUCCIO; BÄUMLER, 2014). Outro dado importante é que foram identificados genes no *regulon* predito, que também estão contidos no grupo de diferencialmente expressos no transcriptoma de  $\Delta ygiV$ , de três vias distintas que levam a produção de propionato. Além da via de degradação de fucose explorada no presente estudo, orquestrada pelo *operon fuc*, também foram identificados genes da via de degradação de rhamnose e treonina, *operons rha* e *tdc* respectivamente. Estas vias, assim como a da fucose, ocorrem exclusivamente em anaerobiose tanto para a degradação de rhamnose (AKHY; BROWN; OLD, 1984) quanto treonina (SAWERS, 1998). Porém 1,2-propanodiol somente é metabólito intermediário nas vias de degradação de fucose e rhamnose (BADÍA;

ROS; AGUILAR, 1985). A função aqui predita de interação do domínio EMD de YgiV com a molécula de 1,2-propanodiol pode ser um indicativo de uma provável atuação diferente de YgiV nas vias de fermentação de fucose e rhamnose com a via de treonina. Ainda são necessários mais estudos para entendimento de como YgiV atua nos demais componentes de seu *regulon*. Tanto a via de fermentação de fucose quanto de rhamnose formam o composto 1,2-propanodiol e a sua metabolização para a formação de propionato é dependente de cobalamina (vitamina B12) (AKHY; BROWN; OLD, 1984; BADÍA; ROS; AGUILAR, 1985). *S. Typhimurium* pode obter a cobalamina do ambiente, como também sintetizá-la. A via biossintética de cobalamina é um processo orquestrado pelos *operons cob* e *cbi* (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995; JETER; OLIVERA; ROTH, 1984; STAIB; FUCHS, 2015), os quais apresentaram-se como possíveis alvos de regulação por YgiV na análise de predição do *regulon* (Tabela 1). Essa via biossintética ocorre exclusivamente em condição de crescimento anaeróbio (JETER; OLIVERA; ROTH, 1984).

Considerando YgiV como repressor de *pduF* e de genes de SPI-1 e SPI-5 relacionados a invasão de células epiteliais independentemente de fonte de açúcar específico e provável molécula efetora (Figura 20). Na condição de anaerobiose, a fonte de carbono afeta a expressão dos genes de *pdu* (Figura 22), mas não afeta os genes de SPI-1 (Figura 21). Isso foi observado no ensaio de invasão de células HeLa: em que a amostra selvagem não demonstra diferenças significativas nas distintas fontes de carbono testadas, mas em todas as condições a superexpressão de YgiV resultou em redução do fenótipo (Figura 25). Já foi demonstrado anteriormente que a fucose afeta a expressão de *pdu* através da formação do 1,2-propanodiol e sua interação com *pocR* (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995). A parte inédita deste processo está na superexpressão de *pduA*, componente importante do microcompartimento bacteriano (MCP) de metabolização de 1,2-propanodiol (BARI; KUMAR; SINHA, 2018) na presença de glicose e ausência de YgiV (Figura 23). Anteriormente foi descrito que glicose inibe a expressão de *pdu* (STAIB; FUCHS, 2015), e observamos que tal inibição é dependente de YgiV (Figura 23). Não foi observado o mesmo efeito para *pduF* (Figura 23), gene que codifica transportador transmembrana de 1,2-propanodiol e que se apresenta fora do *operon pdu* (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995). A ausência de YgiV em anaerobiose e presença de fucose não só resultou em superexpressão dos genes de

*pdu* como também afetou os genes de SPI-1 (Figura 24). Como pontos chave da possível regulação de YgiV no processo patogênico de invasão de células epiteliais estão os genes *hilD* e o operon *qseBC* (Tabela 1). Além desses pontos evidenciados, o regulon predito também apresentou *fnr* e *arcBC* como possíveis genes regulados por YgiV. Tais genes exercem papel da regulação de *hilD* dependentemente de oxigênio através da regulação dos pequenos RNAs FnrS e ArcZ (KIM; GOLUBEVA; VANDERPOOL; SLAUCH, 2019). A repressão de ambos os genes resultaria na não indução de FnrS e na derrepressão de ArcZ, sendo estes efeitos potenciais repressores pós-transcricionais de *hilD* (KIM; GOLUBEVA; VANDERPOOL; SLAUCH, 2019). Uma explicação plausível para o efeito ser observado somente no crescimento com fucose e não glicose seria a putativa interação de YgiV com 1,2-propanodiol (Figura 15). Sendo assim, a fermentação da fucose gera o 1,2-propanodiol, o qual liga-se a YgiV, aumentando a sua afinidade pelos elementos *cis* de seu regulon, principalmente *fnr*, o qual regula *hilD* sob condições de anaerobiose. Tal hipótese ajuda a explicar o efeito observado na expressão dos genes de SPI-1 em anaerobiose e na presença de fucose (Figura 24). Similar mas de efeito oposto, foi demonstrado que PocR ativa a transcrição de *pdu* após ligação com 1,2-propanodiol dependentemente de anaerobiose (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995). Neste estudo apesar da demonstração da dependência de anaerobiose na regulação transcricional exercida por PocR, os autores não levantaram a hipótese de como isso ocorre. Aqui podemos propor duas possibilidades: YgiV e PocR atuam de maneira inversa e competitiva na região promotora e isso é regulado pela concentração de 1,2-propanodiol; ou YgiV atua na regulação de PocR e, portanto, seria o regulador mestre do processo. A primeira hipótese pode ser relacionada com a alta sensibilidade de PocR a 1,2-propanodiol, iniciando sua atividade em concentrações baixas de 50  $\mu$ M (CHEN; AILION; BOBIK; STORMO *et al.*, 1995) e YgiV ser responsivo em concentrações mais altas. Dois fatores podem corroborar a baixa responsividade de YgiV a 1,2-propanodiol, o fenótipo observado de invasão de células HeLa resultou em diferença mais expressiva na alta concentração de 40 mM (Figura 25). Além disso, o sítio predito de interação com 1,2-propanodiol apresenta-se protegido por uma alça do domínio DBD (Figura 15). Já a segunda hipótese pode ser reforçada por *pocR* apresentar-se com aumento de expressão na análise transcriptômica do mutante  $\Delta$ *ygiV*. Comparando-se as duas, a primeira hipótese apresenta mais evidências de ocorrer.

O fenótipo de invasão de células HeLa aparentemente é dependente da quantidade de 1,2-propanodiol no meio (Figura 25). Pode ser observado uma tendência inversa de intensificação da diferença de fenótipo entre o mutante  $\Delta ygiV$  e a amostra com superexpressão de YgiV. Enquanto o fenótipo aumenta no mutante da condição de experimento na presença de fucose -> 1,2-propanodiol 10 mM -> 1,2-propanodiol 40 mM, isso é inverso na superexpressão de YgiV, cujo fenótipo vai reduzindo na mesma ordem. De certa maneira pode-se interpretar que a concentração de 1,2-propanodiol aumenta, pois no ensaio na presença de fucose a concentração de 1,2-propanodiol parte de zero e cresce conforme a *S. Typhimurium* fermenta o açúcar. Esta hipótese pode ser debatida pelo fato de o experimento não ser conduzido em anaerobiose total, e sim numa estufa com CO<sub>2</sub> a 5%. Entretanto, considerando a possibilidade, a fucose fermentada resultaria no acúmulo de 1,2-propanodiol dentro da célula no *background* de superexpressão de YgiV, tendo em vista que isso acarreta a repressão de *pduF*, o qual codifica o principal transportador transmembrana de 1,2-propanodiol. Isso seria uma possível explicação da redução do fenótipo neste mesmo *background* comparando-se presença de glicose com a presença de fucose, pois a fucose gera maior redução do fenótipo do que a glicose na superexpressão de YgiV (Figura 25). Para os demais casos, deparou-se com um entrave na hipótese, já que a superexpressão de YgiV reprime a produção do transportador transmembranar, impedindo a molécula presente no meio de entrar na célula bacteriana e interagir com YgiV. Foi demonstrado anteriormente que não só 1,2-propanodiol mas também propionaldeído apresentam uma taxa de transfusão passiva pela membrana (JAKOBSON; TULLMAN-ERCEK; SLININGER; MANGAN, 2017). Portanto, o 1,2-propanodiol passa pela membrana por difusão passiva, podendo assim interagir com YgiV e amplificar sua afinidade pelos elementos *cis*. Tal fato explicaria a maior redução fenotípica na maior concentração de 1,2-propanodiol (Figura 25).

Por fim, a conexão entre a via metabólica de produção de propionato em anaerobiose seria pouco correlata com o processo de invasão de células epiteliais. Anteriormente foi demonstrado que o *operon pdu* é essencial para uma colonização efetiva do lúmen intestinal pela *S. Typhimurium* (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017). Neste trabalho é demonstrado que *S. Typhimurium* utiliza-se do 1,2-propanodiol excretado pela microbiota no processo de fermentação da fucose advinda do muco intestinal, e que isto lhe confere

vantagem em seu desenvolvimento. Tal sucesso é dependente da capacidade da *S. Typhimurium* de elicitar processo inflamatório, ou seja, a maquinaria codificada em SPI-1 gera um estado propício para o crescimento impulsionado por 1,2-propanodiol. Entretanto este estudo falhou em explicar a conexão direta entre a utilização do 1,2-propanodiol e o processo inflamatório. Aqui propomos que YgiV exerce papel neste processo. A utilização de 1,2-propanodiol, assim como a fermentação de fucose, é um processo metabólico lento e que precisa ser cuidadosamente orquestrado por produzir intermediários tóxicos como o propionaldeído (OBRADORS; BADÍA; BALDOMÀ; AGUILAR, 1988). Desta forma, é necessário um regulador que seja sensível ao aumento da concentração de 1,2-propanodiol ao ponto de ser acima da taxa metabólica da *S. Typhimurium*. YgiV exerceria este papel, reprimindo os *operons pdu* e *cob* assim como o transportador PduF em altas concentrações do 1,2-propanodiol. Foi evidenciado anteriormente que sem acceptor de elétrons como o tetrionato, *S. Typhimurium* não cresce em 1,2-propanodiol, apenas mantém-se viável (OBRADORS; BADÍA; BALDOMÀ; AGUILAR, 1988). E também foi demonstrado que a colonização efetiva de *S. Typhimurium* no intestino de camundongos é dependente de *pdu* mas independente de *ttr*, *operon* de utilização de tetrionato (FABER; THIENNIMITR; SPIGA; BYNDLOSS *et al.*, 2017). Ou seja, a colonização bem-sucedida pode ser dependente de um fator que não causa o crescimento diretamente no ambiente intestinal. Isso poderia corroborar com nossa hipótese de que *S. Typhimurium* precisa regular esta via metabólica a contê-la em altas concentrações de 1,2-propanodiol em determinadas condições. O fator a conferir vantagem seria a produção de propionato como produto final e excretá-lo no lúmen intestinal. Estudos prévios mostraram que o propionato é um substrato da Gliconeogênese intestinal (IGN – *Intestinal Gluconeogenesis*), estimulando-a, assim como a produção de glucagon e norepinefrina pelo sistema nervoso simpático (TIROSH; CALAY; TUNCMAN; CLAIBORN *et al.*, 2019; VADDER; KOVATCHEVA-DATCHARY; GONCALVES; VINERA *et al.*, 2014). A IGN gera glicose da qual a *S. Typhimurium* pode se utilizar como uma melhor fonte de carbono, o que poderia gerar o seu crescimento efetivo luminal. Como evidenciado na análise transcriptômica do mutante  $\Delta qseC$ , *ygiV* está altamente expresso. Dessa forma QseC exerce repressão, direta através de QseB ou indireta, de *ygiV*. QseC é ativado por hormônios adrenais, como a Norepinefrina, pode reprimir a expressão de *ygiV*, resultando na derrepressão dos genes de SPI-1 e na via de produção de

propionato quando na presença de 1,2-propanodiol ou fucose. O propionato geraria a glicose como fonte de carbono pelo hospedeiro e aumentaria a concentração de Norepinefrina, conseqüentemente induzindo mais a resposta ativada por QseC. O aumento da concentração de 1,2-propanodiol para níveis tóxicos ativaria YgiV, inibindo todo o processo. Mais estudos são necessários para a confirmação de tal hipótese. Em relação a ocorrência deste processo, podemos inferir que o patógeno *S. Typhimurium* causa a disbiose intestinal por anteceder uma etapa natural da regulação de processos metabólicos do hospedeiro pela microbiota. Em condições normais, a produção de propionato pela microbiota e seu conseqüente estímulo a IGN é importante para a homeostase intestinal em momentos de jejum prolongado (VADDER; KOVATCHEVA-DATCHARY; GONCALVES; VINERA *et al.*, 2014). A escassez de fontes de nutrientes advindos da alimentação leva alguns grupos de microrganismos a liberarem açúcares do muco intestinal como a fucose, a qual é fermentada e resulta na excreção de 1,2-propanodiol. Este por sua vez seria iniciado seu consumo apenas na escassez de fucose. Assim, *S. Typhimurium* utilizaria o 1,2-propanodiol no momento que a microbiota ainda realiza fermentação de fucose, causando produção de propionato e conseqüente IGN precoces, levando a disbiose. O efeito prolongado deste processo poderia levar a resistência à insulina e desregulação hormonal, podendo até mesmo resultar em síndromes metabólicas como a Diabetes tipo 2 (TIROSH; CALAY; TUNCMAN; CLAIBORN *et al.*, 2019).

## 5. Conclusões

YgiV é um regulador transcricional da família AraC, e como tal apresenta papel de regulação de metabolismo de açúcares e patogenicidade.

Foi inferido através de análises *in silico* a sequência consenso do elemento *cis* de interação com YgiV nas regiões promotoras dos genes componentes de seu *regulon* (Figura 17).

Possui um papel de repressor da transcrição e seu *regulon* compreende a via metabólica de fermentação da fucose direcionada para a produção de 1,2-propanodiol e sua seguinte metabolização para propionato.

Também apresenta papel de regulador de SPI-1 e conseqüentemente do processo de invasão de células epiteliais.

Sua função é dependente de condições anaeróbias e aparentemente da concentração de 1,2-propanodiol no meio. Isto pode ocorrer através de uma possível interação alostérica de 1,2-propanodiol com YgiV, o que pode aumentar a afinidade do repressor transcricional com os elementos *cis* de regulação.

YgiV sofre ação da regulação transcricional de QseB, e também regula a transcrição de QseB de forma dependente das condições ambientais.

Cada vez mais os monossacarídeos e os ácidos graxos de cadeia curta têm mostrado cumprirem papel fundamental na disbiose do lúmen intestinal, principalmente na maneira como patógenos, como a *S. Typhimurium*, aproveitam-se desses processos. Entender tais processos e decifrar quais peças são essenciais nesse jogo é imprescindível na compreensão da relação complexa entre patógeno, microbiota e hospedeiro. Nesse âmbito YgiV tem demonstrado exercer papel regulador dos processos patogênicos de *S. Typhimurium* na colonização intestinal. Entretanto há muito ainda que se elucidar desse papel de regulador, como a total caracterização dos pontos de atuação de YgiV em todas as vias que levam a produção de propionato pela *S. Typhimurium* e o que isso implica na sua patogenicidade. Sendo assim, a continuidade desse trabalho é necessária para a confirmação dos demais pontos de regulação transcricional de YgiV dentro do *regulon* predito. O total entendimento de como enteropatógenos acarretam a disbiose intestinal em prol de uma colonização efetiva e como os metabólitos produzidos nesse processo afetam a regulação hormonal e fisiológica no

hospedeiro é de suma importância para gerar novos mecanismos de combate ao processo patogênico. Assim, a total confirmação do papel de YgiV na regulação gênica da relação patógeno-microbiota-hospedeiro poderia desvendar novos alvos terapêuticos não só para o combate às infecções intestinais, mas também para controle de síndromes metabólicas relacionadas a essa complexa relação.

## Referências

- AKHY, M. T.; BROWN, C. M.; OLD, D. C. L-Rhamnose utilisation in *Salmonella typhimurium*. **The Journal of applied bacteriology**, 56, n. 2, 1984 Apr 1984.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 31, n. 2, 01/15/2015 2015.
- BAARS, L.; YTTERBERG, A. J.; DREW, D.; WAGNER, S. *et al.* Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 15, p. 10024-10034, Apr 2006.
- BADÍA, J. F. A.; ROS, J.; AGUILAR, J. Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, 161, n. 1, 1985 Jan 1985.
- BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Biopolymers. **Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, 2, 1994 1994.
- BAO, H.; DALAL, K.; CYTRYNBAUM, E.; DUONG, F. Sequential Action of MalE and Maltose Allows Coupling ATP Hydrolysis to Translocation in the MalFGK2 Transporter. **The Journal of biological chemistry**, 290, n. 42, 10/16/2015 2015.
- BARI, N. K.; KUMAR, G.; SINHA, S. The Wrappers of the 1,2-Propanediol Utilization Bacterial Microcompartments. **Advances in experimental medicine and biology**, 1112, 2018 2018.
- BEARSON, B. L.; BEARSON, S. M. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, 44, n. 4, p. 271-278, Apr 2008.
- BELL, A. W.; BUCKEL, S. D.; GROARKE, J. M.; HOPE, J. N. *et al.* The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. **The Journal of biological chemistry**, 261, n. 17, 06/15/1986 1986.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- CHASSARD, C.; LACROIX, C. Carbohydrates and the human gut microbiota. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, 16, n. 4, 2013 Jul 2013.
- CHEN, P.; AILION, M.; BOBIK, T.; STORMO, G. *et al.* Five promoters integrate control of the *cob/pdu* regulon in *Salmonella typhimurium*. **Journal of bacteriology**, 177, n. 19, 1995 Oct 1995.
- CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature Reviews Microbiology**, 6, n. 6, p. 455-465, Jun 2008.
- CIRILLO, D. M.; VALDIVIA, R. H.; MONACK, D. M.; FALKOW, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Molecular Microbiology**, 30, n. 1, p. 175-188, Oct 1998.
- CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C. *et al.* The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103, n. 27, p. 10420-10425, Jul 2006.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, 3, n. 9, p. 541-548, Sep 2007.

DA SILVA, P.; MANIERI, F. Z.; HERRERA, C. M.; TRENT, M. S. *et al.* Novel Role of VisP and the Wzz System during O-Antigen Assembly in Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathogenesis. **Infection & Immunity**, 86, n. 8, Aug 2018.

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

ERHARDT, M.; DERSCH, P. Regulatory principles governing Salmonella and Yersinia virulence. **Frontiers in Microbiology**, 6, 2015.

EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Bacterial ribosomal RNA in pieces. **Molecular microbiology**, 57, n. 2, 2005 Jul 2005.

FABER, F.; THIENNIMITR, P.; SPIGA, L.; BYNDLOSS, M. X. *et al.* Respiration of Microbiota-Derived 1,2-propanediol Drives Salmonella Expansion during Colitis. **PLoS pathogens**, 13, n. 1, 01/05/2017 2017.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, 09/04/2020 2020.

FIERER, J.; ECKMANN, L.; FANG, F.; PFEIFER, C. *et al.* Expression of the Salmonella virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infection Immunity**, 61, n. 12, p. 5231-5236, Dec 1993.

FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. **Journal of Cell Science**, 99 ( Pt 2), p. 283-296, Jun 1991.

FRIEBEL, A.; ILCHMANN, H.; AEPFELBACHER, M.; EHRBAR, K. *et al.* SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. **Journal of Biological Chemistry**, 276, n. 36, p. 34035-34040, Sep 2001.

GALLEGOS, M. T.; SCHLEIF, R.; BAIROCH, A.; HOFMANN, K. *et al.* Arac/XylS family of transcriptional regulators. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61, n. 4, p. 393-410, Dec 1997.

GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. **Mol Microbiol**, 20, n. 2, p. 263-271, Apr 1996.

GALÁN, J. E.; CURTISS, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 86, n. 16, p. 6383-6387, Aug 1989.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.-Y.; VENTER, J. C. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, 6, n. 5, p. 343-345, 2009-04-12 2009. OriginalPaper.

GINALSKI, K.; KINCH, L.; RYCHLEWSKI, L.; GRISHIN, N. V. BOF: a novel family of bacterial OB-fold proteins. **FEBS Letters**, 567, n. 2-3, p. 297-301, Jun 2004.

GRANT, C. E.; BAILEY, T. L.; NOBLE, W. S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. **Bioinformatics (Oxford, England)**, 27, n. 7, 04/01/2011 2011.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by Salmonella typhimurium and Shigella flexneri. **The EMBO Journal**, 12, n. 10, p. 3779-3787, Oct 1993.

HADJIFRANGISKOU, M.; KOSTAKIOTI, M.; CHEN, S. L.; HENDERSON, J. P. *et al.* A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, 80, n. 6, p. 1516-1529, Jun 2011.

HARDT, W. D.; CHEN, L. M.; SCHUEBEL, K. E.; BUSTELO, X. R. *et al.* S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. **Cell**, 93, n. 5, p. 815-826, May 1998.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R. *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, 410, n. 6832, p. 1099-1103, Apr 26 2001.

HAYASHI, K.; MOROOKA, N.; YAMAMOTO, Y.; FUJITA, K. *et al.* Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. **Molecular Systems Biology**, 2, p. 2006.0007, 2006.

HENSEL, M.; SHEA, J. E.; WATERMAN, S. R.; MUNDY, R. *et al.* Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Molecular Microbiology**, 30, n. 1, p. 163-174, Oct 1998.

HIGASHIDE, W.; DAI, S.; HOMBS, V. P.; ZHOU, D. Involvement of SipA in modulating actin dynamics during Salmonella invasion into cultured epithelial cells. **Cellular Microbiology**, 4, n. 6, p. 357-365, Jun 2002.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, 291, n. 5812, p. 238-239, May 21 1981.

HUERTA-CEPAS, J.; SZKLARCZYK, D.; HELLER, D.; HERNÁNDEZ-PLAZA, A. *et al.* eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. **Nucleic Acids Research**, 47, n. D1, 2020.

HUGHES, D. T.; TEREKHOVA, D. A.; LIOU, L.; HOVDE, C. J. *et al.* Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107, n. 21, p. 9831-9836, May 2010.

HWANG, S.; GOU, Z.; KUZNETSOV, I. B. DP-Bind: a web server for sequence-based prediction of DNA-binding residues in DNA-binding proteins. **Bioinformatics**, 23, n. 5, p. 634-636, 2007.

JAKOBSON, C. M.; TULLMAN-ERCEK, D.; SLININGER, M. F.; MANGAN, N. M. A systems-level model reveals that 1,2-Propanediol utilization microcompartments enhance pathway flux through intermediate sequestration. **PLoS computational biology**, 13, n. 5, 05/05/2017 2017.

JETER, R. M.; OLIVERA, B. M.; ROTH, J. R. Salmonella typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B12) de novo under anaerobic growth conditions. **Journal of bacteriology**, 159, n. 1, 1984 Jul 1984.

JUÁREZ-RODRÍGUEZ, M. D.; TORRES-ESCOBAR, A.; DEMUTH, D. R. ygiW and qseBC are co-expressed in Aggregatibacter actinomycetemcomitans and regulate biofilm growth. **Microbiology**, 159, n. Pt 6, p. 989-1001, Jun 2013.

KEIKO; KASHIWAGI; SAKU; MIYAMOTO *et al.* Excretion of Putrescine by the Putrescine-Ornithine Antiporter Encoded by the potE Gene of Escherichia Coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89, n. 10, 05/15/1992 1992.

KHAJANCHI, B. K.; KOZLOVA, E. V.; SHA, J.; POPOV, V. L. *et al.* The two-component QseBC signalling system regulates in vitro and in vivo virulence of Aeromonas hydrophila. **Microbiology**, 158, n. Pt 1, p. 259-271, Jan 2012.

KIM, K.; GOLUBEVA, Y. A.; VANDERPOOL, C. K.; SLAUCH, J. M. Oxygen-dependent regulation of SPI1 type three secretion system by small RNAs in Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Molecular microbiology**, 111, n. 3, 2019 Mar 2019.

KOROPATKIN, N. M.; CAMERON, E. A.; MARTENS, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, 10, n. 5, 04/11/2012 2012.

- KROGER, C.; DILLON, S. C.; CAMERON, A. D.; PAPENFORT, K. *et al.* The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 109, n. 20, p. E1277-1286, May 15 2012.
- KRÖGER, C.; COLGAN, A.; SRIKUMAR, S.; HÄNDLER, K. *et al.* An Infection-Relevant Transcriptomic Compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Cell Host & Microbe**, 14, n. 6, p. 683-695, 2013/12/11/ 2013.
- KÄLLBERG, M.; WANG, H.; WANG, S.; PENG, J. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. **Nature Protocols**, 7, p. 1511-1522, 2012-07-19 2012.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, 9, n. 4, p. 357-359, 2012-03-04 2012. OriginalPaper.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, 15, n. 12, p. 550, 2014-12-05 2014. OriginalPaper.
- MARTIN, R. G.; ROSNER, J. L. The AraC transcriptional activators. **Current Opinion in Microbiology**, 4, n. 2, p. 132-137, Apr 2001.
- MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W. *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, 413, n. 6858, p. 852-856, Oct 25 2001.
- MCGHIE, E. J.; HAYWARD, R. D.; KORONAKIS, V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. **The EMBO Journal**, 20, n. 9, p. 2131-2139, May 2001.
- MERIGHI, M.; SEPTER, A. N.; CARROLL-PORTILLO, A.; BHATIYA, A. *et al.* Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiology**, 9, p. 42, 2009.
- MI, H.; MURUGANUJAN, A.; HUANG, X.; EBERT, D. *et al.* Protocol Update for Large-Scale Genome and Gene Function Analysis With the PANTHER Classification System (v.14.0). **Nature protocols**, 14, n. 3, Mar 2019 2019.
- MOKRIEVICH, A. N.; KONDAKOVA, A. N.; VALADE, E.; PLATONOV, M. E. *et al.* Biological properties and structure of the lipopolysaccharide of a vaccine strain of *Francisella tularensis* generated by inactivation of a quorum sensing system gene qseC. **Biochemistry (Moscow)**, 75, n. 4, p. 443-451, Apr 2010.
- MOREIRA, C. G.; HERRERA, C. M.; NEEDHAM, B. D.; PARKER, C. T. *et al.* Virulence and stress-related periplasmic protein (VisP) in bacterial/host associations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, n. 4, p. 1470-1475, Jan 2013.
- MOREIRA, C. G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenesis. **Infection & Immunity**, 80, n. 12, p. 4344-4353, Dec 2012.
- MOREIRA, C. G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infection & Immunity**, 78, n. 3, p. 914-926, Mar 2010.
- NGUYEN, N. T. T.; CONTRERAS-MOREIRA, B.; CASTRO-MONDRAGON, J. A.; SANTANA-GARCIA, W. *et al.* RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. **Nucleic acids research**, 46, n. W1, 07/02/2018 2018.
- NUCCIO, S.-P.; BÄUMLER, A. J. Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. **mBio**, 5, n. 2, 03/18/2014 2014.

- OBRADORS, N.; BADÍA, J. A.; BALDOMÀ, L.; AGUILAR, J. Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. **Journal of bacteriology**, 170, n. 5, 1988 May 1988.
- OCHMAN, H.; SONCINI, F. C.; SOLOMON, F.; GROISMAN, E. A. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93, n. 15, p. 7800-7804, Jul 1996.
- PATEL, J. C.; GALÁN, J. E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. **J Cell Biol**, 175, n. 3, p. 453-463, Nov 2006a.
- PATEL, J. C.; GALÁN, J. E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. **Journal of Cell Biology**, 175, n. 3, p. 453-463, Nov 2006b.
- PERKINS, T. T.; DAVIES, M. R.; KLEMM, E. J.; ROWLEY, G. *et al.* ChIP-seq and transcriptome analysis of the OmpR regulon of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium reveals accessory genes implicated in host colonization. **Molecular Microbiology**, 87, n. 3, p. 526-538, Feb 2013.
- PFEIFER, C. G.; MARCUS, S. L.; STEELE-MORTIMER, O.; KNODLER, L. A. *et al.* *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. **Infection & Immunity**, 67, n. 11, p. 5690-5698, Nov 1999.
- PILONIETA, M. C.; ERICKSON, K. D.; ERNST, R. K.; DETWEILER, C. S. A protein important for antimicrobial peptide resistance, YdeI/OmdA, is in the periplasm and interacts with OmpD/NmpC. **Journal of Bacteriology**, 191, n. 23, p. 7243-7252, Dec 2009.
- PULLINGER, G. D.; VAN DIEMEN, P. M.; DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Role of two-component sensory systems of *Salmonella enterica* serovar Dublin in the pathogenesis of systemic salmonellosis in cattle. **Microbiology**, 156, n. Pt 10, p. 3108-3122, Oct 2010.
- RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C. *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. **Science**, 321, n. 5892, p. 1078-1080, Aug 2008.
- RILEY, M.; ABE, T.; ARNAUD, M. B.; BERLYN, M. K. *et al.* *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. **Nucleic Acids Research**, 34, n. 1, p. 1-9, 2006.
- RIVERA-CHÁVEZ, F.; BÄUMLER, A. J. The Pyromaniac Inside You: *Salmonella* Metabolism in the Host Gut. **Annual review of microbiology**, 69, 2015 2015.
- RYU, K.-S.; KIM, C.; KIM, I.; YOO, S. *et al.* NMR Application Probes a Novel and Ubiquitous Family of Enzymes That Alter Monosaccharide Configuration. **The Journal of biological chemistry**, 279, n. 24, 06/11/2004 2004.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. London: CSHL Press, 2001.
- SAWERS, G. The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. **Archives of microbiology**, 171, n. 1, 1998 Dec 1998.
- SHEA, J. E.; HENSEL, M.; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93, n. 6, p. 2593-2597, Mar 1996.
- SIMPSON, J. T.; DURBIN, R. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. **Genome Research**, 22, n. 3, p. 549-556, Mar 2012.
- SINGER, H. M.; KÜHNE, C.; DEDITIUS, J. A.; HUGHES, K. T. *et al.* The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon flhDC. **Journal of bacteriology**, 196, n. 7, 2014 Apr 2014.

SIRCILI, M. P.; WALTERS, M.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infection & Immunity**, 72, n. 4, p. 2329-2337, Apr 2004.

SMITH, N. H.; CRICHTON, P. B.; OLD, D. C.; HIGGINS, C. F. Ribosomal-RNA patterns of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and related Enterobacteriaceae. **Journal of Medical Microbiology**, 1988/07/01 1988.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P. *et al.* Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, n. 15, p. 8951-8956, Jul 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Molecular Microbiology**, 43, n. 3, p. 809-821, Feb 2002.

SRIKUMAR, S.; KROGER, C.; HEBRARD, M.; COLGAN, A. *et al.* RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella Typhimurium*. **PLoS Pathogens**, 11, n. 11, p. e1005262, 2015.

STAIB, L.; FUCHS, T. M. Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Frontiers in microbiology**, 6, 10/12/2015 2015.

STECHER, B.; BARTHEL, M.; SCHLUMBERGER, M. C.; HABERLI, L. *et al.* Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. **Cellular Microbiology**, 10, n. 5, p. 1166-1180, May 2008.

STECHER, B.; HAPFELMEIER, S.; MULLER, C.; KREMER, M. *et al.* Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* colitis in streptomycin-pretreated mice. **Infection & Immunity**, 72, n. 7, p. 4138-4150, Jul 2004.

TIROSH, A.; CALAY, E. S.; TUNCMAN, G.; CLAIBORN, K. C. *et al.* The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. **Science Translational Medicine**, 2019-04-24 2019.

TRUNIGER, V.; BOOS, W. Mapping and Cloning of *gldA*, the Structural Gene of the *Escherichia Coli* Glycerol Dehydrogenase. **Journal of bacteriology**, 176, n. 6, Mar 1994 1994.

UNAL, C. M.; SINGH, B.; FLEURY, C.; SINGH, K. *et al.* QseC controls biofilm formation of non-typeable *Haemophilus influenzae* in addition to an AI-2-dependent mechanism. **International Journal of Medical Microbiology**, 302, n. 6, p. 261-269, Nov 2012.

UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, 47, n. D1, 2020.

VADDER, F. D.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; GONCALVES, D.; VINERA, J. *et al.* Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, 156, n. 1-2, 01/16/2014 2014.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection & Immunity**, 74, n. 10, p. 5445-5455, Oct 2006.

WANG, X.; WANG, Q.; YANG, M.; XIAO, J. *et al.* QseBC controls flagellar motility, fimbrial hemagglutination and intracellular virulence in fish pathogen *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, 30, n. 3, p. 944-953, Mar 2011.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, 54, p. 5.6.1-5.6.37, Jun 20 2016.

WESTENBERG, D. J.; GUNSALUS, R. P.; ACKRELL, B. A. C.; SICES, H. *et al.* Escherichia coli fumarate reductase frdC and frdD mutants. Identification of amino acid residues involved in catalytic activity with quinones. **The Journal of biological chemistry**, 268, n. 2, 01/15/1993 1993.

WHO. **Salmonella (non-typhoidal), Fact sheet n° 139.**  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>, 2013.

YAN, J.; KURGAN, L. DRNApred, fast sequence-based method that accurately predicts and discriminates DNA- and RNA-binding residues. **Nucleic Acids Research**, 45, n. 10, 2017.

ZHANG, X. S.; GARCIA-CONTRERAS, R.; WOOD, T. K. Escherichia coli transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). **The ISME Journal**, 2, n. 6, p. 615-631, Jun 2008.

ZHAO, B.; HOURY, W. A. Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, 88, n. 2, 2010 Apr 2010.

ZHOU, D.; CHEN, L. M.; HERNANDEZ, L.; SHEARS, S. B. *et al.* A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Molecular Microbiology**, 39, n. 2, p. 248-259, Jan 2001.

ZHOU, D.; MOOSEKER, M. S.; GALÁN, J. E. Role of the S. typhimurium actin-binding protein SipA in bacterial internalization. **Science**, 283, n. 5410, p. 2092-2095, Mar 1999.