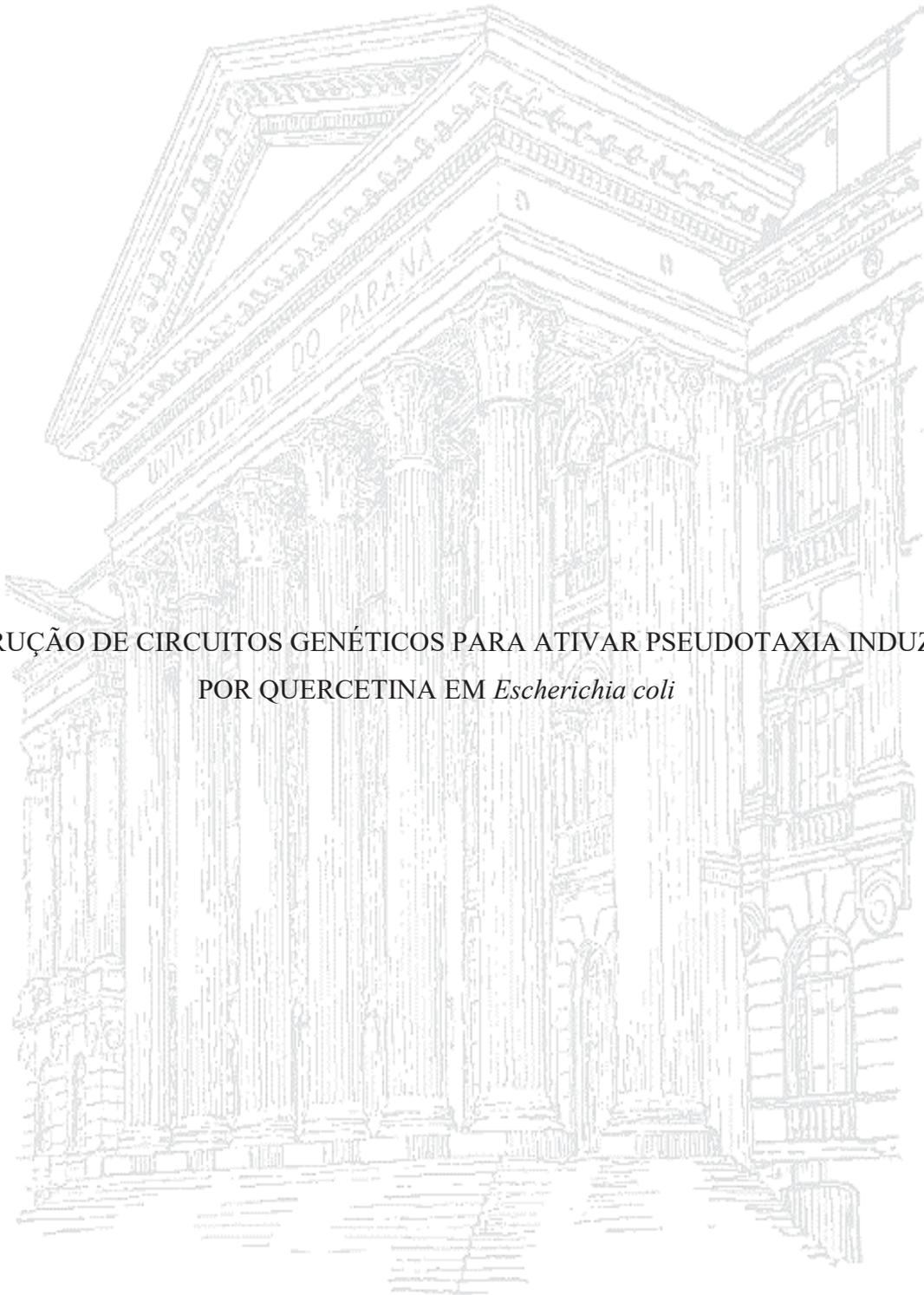


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO PASSAGLIA BRUSCHI

CONSTRUÇÃO DE CIRCUITOS GENÉTICOS PARA ATIVAR PSEUDOTAXIA INDUZIDA
POR QUERCETINA EM *Escherichia coli*



CURITIBA

2024

GUSTAVO PASSAGLIA BRUSCHI

CONSTRUÇÃO DE CIRCUITOS GENÉTICOS PARA ATIVAR PSEUDOTAXIA INDUZIDA
POR QUERCETINA EM *Escherichia coli*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bruschi, Gustavo Passaglia

Construção de circuitos genéticos para ativar Pseudotaxia induzida por Quercitina em *Escherichia coli* / Gustavo Passaglia Bruschi. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

1. Quimiotaxia. 2. Flavonoides. 3. *Escherichia coli*. I. Santos, Marcelo Müller dos, 1979. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GUSTAVO PASSAGLIA BRUSCHI** intitulada: **CONSTRUÇÃO DE CIRCUITOS GENÉTICOS PARA ATIVAR PSEUDOTAXIA INDUZIDA POR QUERCETINA EM *Escherichia coli***, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO MÜLLER DOS SANTOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Março de 2024.

Assinatura Eletrônica

08/03/2024 14:26:16.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/03/2024 15:55:58.0

FERNANDA MIYUKI KASHIWAGI

Avaliador Externo (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais)

Assinatura Eletrônica

08/03/2024 15:22:43.0

LEONARDO MAGALHÃES CRUZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marcelo Müller dos Santos pela orientação, pelo companheirismo, lições e ensinamentos. Você foi o professor que me fez pensar como um pesquisador, sou muito grato por isso.

À banca avaliadora formada pela Dra. Fernanda Miyuki Kashiwagi e pelo Dr. Leonardo Magalhães Cruz pela leitura do documento e considerações feitas. Todas elas foram muito pertinentes.

A todos os membros do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, principalmente aos colegas do laboratório Anexo: Lucas Henrique Junges, Brenno Wendler Miranda, Teles Mota, Marcos Damrley e Marcos Andrei. Obrigado pelo companheirismo diário, pelo compartilhamento de conversas, ideias e risadas. Vocês foram minha motivação e exemplo diariamente.

Aos colegas que, mesmo sendo de outras salas, sempre se dispuseram a ajudar: Maritza, Ryu, André, Maria, Eduardo, Eliandro e Rebeca.

Aos professores responsáveis do PPG, por todos os ensinamentos. Cada um de vocês foi essencial para a construção desse projeto.

Aos técnicos Valter e Thalita por todo auxílio e suporte técnico, e especialmente à Dona Rose Prado que sempre esteve disposta a ajudar quando precisei.

À minha família pelo apoio desde o primeiro dia que ingressei no laboratório, especialmente à minha companheira Julia, que sempre fez o possível para me motivar e esteve do meu lado me fazendo muito feliz por todo esse período.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, sem a qual esse trabalho não seria possível.

“O caminho para a sabedoria é não ter medo de errar.”

Paulo Coelho.

“É por causa de falhas que novas descobertas são feitas.”

Isaac Newton.

RESUMO

Bactérias podem ser atraídas ou repelidas por moléculas presentes no meio em que vivem. Tais moléculas induzem uma cascata de fosforilação e provocam a rotação dos flagelos, que impulsionam a bactéria, um mecanismo chamado quimiotaxia. Nesse contexto, bactérias do solo frequentemente competem por nutrientes e espaço, de maneira que a quimiotaxia em direção a compostos secretados por exsudatos vegetais é fundamental para a colonização radicular. Sendo assim, a inserção de modificações genéticas em bactérias dando-as a capacidade de se locomoverem em direção a moléculas específicas, surge como uma oportunidade para investigar o papel da quimiotaxia na competição pelo hospedeiro. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi regular a quimiotaxia de *Escherichia coli* em direção à quercetina, um flavonoide abundante e frequentemente secretado por plantas. Para isso, foram construídos circuitos regulatórios que envolvem o repressor transcricional QdoR e o promotor do gene *qdoI* de *Bacillus subtilis*. Quando QdoR é expresso, liga-se fortemente aos sítios operadores a montante de *qdoI*, porém se desliga quando interage com flavonoides, como a quercetina. Nos circuitos construídos nesse trabalho, o promotor de *qdoI* regula a expressão do gene *cheZ* de *E. coli*. A fosfatase CheZ controla os níveis de defosforilação da proteína CheY e por consequência regula a quimiotaxia. Além disso, a expressão de *cheZ* foi modulada, com o intuito de produzir diferentes níveis de quimiotaxia, permitindo uma análise da competição entre estirpes de *E. coli* que se movem rapidamente e lentamente em direção a quercetina. Com essa dinâmica, esse trabalho representa esforços iniciais para o melhor entendimento da dinâmica da quimiotaxia de bactérias em uma mesma população.

Palavras-chave: Quimiotaxia; Flavonoides; Circuitos Genéticos; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Bacteria can be attracted or repelled by molecules in their environment. These molecules induce a phosphorylation cascade and trigger the rotation of flagella, propelling the bacteria in a mechanism called chemotaxis. In this context, soil bacteria often compete for nutrients and space, and chemotaxis towards compounds secreted by plant exudates is crucial for bacterial root colonization. Therefore, the insertion of genetic modifications in bacteria, giving them the ability to move towards specific molecules, emerges as an opportunity to investigate the role of chemotaxis in host competition. The goal of this study is to regulate the chemotaxis of *Escherichia coli* towards quercetin, an abundant flavonoid frequently secreted by plants. To achieve this, regulatory circuits involving the transcriptional repressor QdoR and the promoter of the *qdoI* gene from *Bacillus subtilis* were constructed. When QdoR is expressed, it strongly binds to operator sites upstream of *qdoI*, but unbinds upon interaction with flavonoids such as quercetin. In our circuits, the *qdoI* promoter regulates the expression of the *cheZ* gene in *E. coli*. The CheZ phosphatase controls the dephosphorylation levels of the CheY protein and consequently regulates chemotaxis. Additionally, the expression of *cheZ* has been modulated with the aim of producing different levels of chemotaxis, enabling an analysis of the competition between strains of *E. coli* that move rapidly and slowly towards quercetin. With this dynamic, this work represents initial efforts towards a better understanding of chemotaxis of bacteria in the same population.

Palavras-chave: Chemotaxis; Flavonoids; Genetic Circuits; *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MECANISMO MOLECULAR DA QUIMIOTAXIA	16
FIGURA 2 - INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE <i>cheZ</i> NA ROTAÇÃO DOS FLAGELOS DE <i>E. coli</i>	16
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE <i>SWIMMING</i> E <i>SWARMING</i>	19
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DOS CIRCUITOS GENÉTICOS CONSTRUÍDOS NESSE TRABALHO	28
FIGURA 5 - ESQUEMA DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA DE <i>E. coli</i> PELOS MÉTODOS DE CAPILARIDADE	37
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DE UMA LÂMINA DE MICROSCÓPIO CUSTOMIZADA PARA EXPERIMENTOS DE CONFOCAL	38
FIGURA 7 - ENSAIOS QUALITATIVOS DE PSEUDOTAXIA EM MEIO SEMISSÓLIDO.....	41
FIGURA 8 - PSEUDOTAXIA DAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DE CAPILARIDADE E TENDO NO EIXO Y A CONTAGEM DE UFC NOS CAPILARES	43
FIGURA 9 - PSEUDOTAXIA DAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DE CAPILARIDADE E TENDO NO EIXO Y A CONTAGEM DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	45
FIGURA 10 - <i>CELL TRACKING</i> QUALITATIVO DAS ESTIRPES BW25113, BW25113 $\Delta cheZ$ E DAS ESTIRPES CONSTRUÍDAS NESTE TRABALHO	48
FIGURA 11 - <i>CELL TRACKING</i> QUANTITATIVO DAS ESTIRPES CONSTRUÍDAS NESTE TRABALHO	49
FIGURA 12 - ENSAIO DE MOTILIDADE EM PLACA DE MICROSCOPIA CONFOCAL	50
FIGURA 13 ENSAIO DE CO-CULTIVO EM PLACA DE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ESTIRPES DE <i>E. coli</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO.....	25
TABELA 2: PLASMÍDEOS UTILIZADOS E CONSTRUÍDOS NESTE TRABALHO.....	27
TABELA 3: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CIRCUITOS GENÉTICOS RESPONSIVOS A FLAVONOIDES	13
2.2 VIA METABÓLICA DA QUIMIOTAXIA E MECANISMO DE ADAPTAÇÃO	14
2.3 REGULAÇÃO DA QUIMIOTAXIA EM <i>Escherichia coli</i>	18
2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA.....	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS.....	24
4.2 ESTIRPES, VETORES E CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS	25
4.2.1 Estirpes Bacterianas Utilizadas	25
4.2.2 Vetores Utilizados	25
4.3 MANIPULAÇÃO DE DNA	26
4.3.1 Método de Clonagem de DNA.....	26
4.3.2 Plasmídeos Construídos	26
4.3.3 Transformação Bacteriana.....	28
4.3.3.1 Preparo de <i>Escherichia coli</i> quimiocompetente	28
4.3.3.2 Transformação por choque térmico	29
4.3.3.3 Preparo de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente	29
4.3.3.4 Transformação por eletroporação	30
4.3.5 Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina.....	30
4.3.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose	31
4.3.7 Reações de Digestão com Endonucleases de Restrição	31
4.3.8 Reações de Ligação de DNA	31
4.3.9 Triagem de Plasmídeos Recombinantes.....	32
4.2.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR).	32
4.3.11 Integração de <i>sfGFP</i> cromossomal - sistema CRIM.....	33
4.4 ENSAIOS DE PSEUDOTAXIA	34
4.4.1 Ensaios em Placas de Meio Semissólido.....	34
4.4.2 Ensaios de Pseudotaxia em Capilares	35
4.4.2.1 Capilares inseridos em pipetadora multicanal – Contagem de UFC	35

4.4.2.2 Capilares inseridos em seringas – Contagem por Citometria de Fluxo...	35
4.4.3 Ensaaios em Microscopia Confocal.....	37
4.4.3.1 Ensaaios em Lâminas	37
4.4.3.2 Vídeos de Motilidade e <i>Cell tracking</i>	39
4.4.3.3 Microscopia confocal em placas de Petri com fundo de vidro.....	39
4.4.4 Análises Estatísticas	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 ENSAIOS DE PSEUDOTAXIA EM PLACAS DE MEIO SEMISSÓLIDO	40
5.2 ENSAIOS EM CAPILARES.....	42
5.2.1 Sistema utilizando contagem de UFC	42
5.2.2 Sistema utilizando contagem por Citometria de Fluxo	44
5.3 ENSAIOS DE MOTILIDADE EM MICROSCOPIA CONFOCAL	45
5.3.1 Vídeos de Motilidade e <i>Cell tracking</i>	45
5.3.2 Microscopia confocal em placas de Petri com fundo de vidro	49
6. CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A quimiotaxia é um mecanismo molecular envolvido no movimento de bactérias por meio da rotação flagelar, em resposta a sinais químicos do ambiente em que vivem. Através desse mecanismo, são estabelecidas interações planta-bactéria, nas quais a planta libera em suas raízes moléculas sinalizadoras, que são identificadas por bactérias rizosféricas ou bactérias do solo como também são conhecidas (Feng *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo, bactérias presentes no solo identificam e processam essas moléculas, gerando uma resposta na rotação dos flagelos que permite o deslocamento da bactéria. Através desse mecanismo, bactérias benéficas podem ser atraídas pela sinalização da planta, enquanto bactérias patogênicas podem ser repelidas (Del Valle *et al.*, 2020; Cesco *et al.*, 2012; Ahuja & Kissen, 2012), isso representa uma maneira da planta selecionar sua comunidade de bactérias hospedeiras. Um exemplo clássico de sinalização guiada por flavonoides é a relação mutualística entre algumas espécies de *Rhizobium* e plantas leguminosas. A presença de bactérias benéficas atraídas pode influenciar positivamente a planta, estimulando a nodulação das raízes por exemplo, que permite a fixação biológica de nitrogênio e também pode propiciar defesa contra fitopatógenos e aumentar a absorção de nutrientes (Ahemad & Khan, 2013; Feng *et al.*, 2021). Apesar disso, recentemente essa ideia de quimioatração de *Rhizobium* por flavonoides foi refutada (Compton *et al.*, 2020).

O reconhecimento de metabólitos produzido pelas plantas em seus exsudatos radiculares por bactérias do solo acontece naturalmente. Por exemplo, *Bacillus subtilis* possui o regulador transcricional negativo QdoR do tipo TetR que é induzido por flavonoides como quercetina e fisetina (Hirooka *et al.*, 2007). O sistema em questão é induzido por flavonoides específicos e torna a bactéria resistente aos efeitos tóxicos destas moléculas, permitindo seu estabelecimento com o hospedeiro vegetal, ao mesmo tempo que previne bactérias patogênicas que não são resistentes. Portanto, os flavonoides são metabólitos secundários versáteis das plantas que as defendem contra invasores e sinalizam atração para microrganismos benéficos do solo. A quercetina destaca-se por possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias (Kumar *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004) e já foi encontrada em exsudatos de raízes de *Zea mays* (milho) (Kidd *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Narasimhan *et al.*, 2003) e *Alnus glutinosa* (Hughes *et al.*, 1999).

O sistema QdoR de *B. subtilis* é baseado na produção de *qdoI* (quercetina 2,3-dioxigenase), uma enzima que inativa a quercetina convertendo-a em ácido 2-protocatecuiol-floroglucinol carboxílico e monóxido de carbono. O gene *qdoI* possui em

sua região *upstream* dois sítios operadores para o repressor transcricional QdoR, que também possui um sítio operador *upstream* do gene *qdoR*, ou seja, QdoR pode se autoreprimir. A quercetina, por sua vez, inibe a ligação de QdoR ao DNA, induzindo a expressão de *qdoI* e *qdoR*. Dessa forma, quando QdoR é expresso, liga-se fortemente aos sítios operadores *upstream* de *qdoI*, porém se desliga quando interage com quercetina (Hirooka *et al.*, 2007).

Para entender a regulação da quimiotaxia, é importante destacar a sua via metabólica, que é bem descrita na literatura., Consiste em uma cascata de fosforilação e desfosforilação das proteínas CheY e CheZ (em conjunto com cascatas de metilação e desmetilação, explicadas mais adiante) que ativa os movimentos de *tumbling* e *running* da bactéria dependendo da presença ou ausência de um ligante nos quimiorreceptores de membrana. O regulador de motilidade bacteriana, CheZ, é uma fosfatase responsável por controlar o nível de CheY fosforilado (CheY-P), que, por sua vez, regula o modo de rotação da natação bacteriana. CheY-P se liga à proteína flagelar FliM e induz o flagelo a rotacionar no sentido horário (CW), o que faz com que a célula entre no estado de *tumbling*. Em contrapartida, o fenótipo *running* é restaurado pela ação da fosfatase CheZ, que desfosforila CheY-P e faz com que os flagelos rotacionem no sentido anti-horário (CCW). *E. coli* sem o gene *cheZ* ($\Delta cheZ$), perde sua capacidade de movimento direcionado pois não pode desfosforilar CheY-P e fica em estado de *tumbling* contínuo (Virgile *et al.*, 2018; Topp & Gallivan, 2007).

Este trabalho, portanto, buscou reprogramar o sistema QdoR de *B. subtilis* para regular a expressão do gene *cheZ* em *Escherichia coli*, através de sua regulação a nível transcricional pelo repressor QdoR, que é inativado por quercetina. Para isso foi utilizada a biologia sintética para construir circuitos genéticos unindo partes genéticas individuais (como promotores, genes, sítios de ligação ribossomal e terminador transcricional) em um plasmídeo estável em *E. coli* (Kim *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2019). Considerando a versatilidade dos circuitos genéticos, a locomoção de *E. coli* em direção a moléculas químicas específicas e não cognatas, tais como flavonoides, surge como uma oportunidade para investigar as bases da quimiotaxia na competição bacteriana pela colonização do hospedeiro vegetal. Além disso, foram construídos 2 circuitos utilizando promotores de forças transcricionais diferentes, com cada promotor em um circuito diferente, regulando a expressão de *qdoR*, que regula a expressão de *cheZ*. Com isso, a hipótese é de que dois níveis de expressão de *cheZ* diferentes serão gerados, o que permite uma investigação do comportamento e da relação intraespecífica de populações de

bactérias que respondem de maneira rápida e lenta ao quimioatraente. Os circuitos desenvolvidos nesse trabalho podem fornecer uma estratégia para o melhor entendimento da quimiotaxia bacteriana, bem como melhorar a compreensão a respeito do papel dos flavonoides na seleção de bactérias rizosféricas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIRCUITOS GENÉTICOS RESPONSIVOS A FLAVONOIDEOS

A biologia sintética utiliza diversas ferramentas para programar microrganismos, permitindo que realizem funções específicas e alcancem diversas funcionalidades (Xia *et al.*, 2019). Os circuitos genéticos são uma dessas ferramentas. Consistem em uma combinação de vários genes, elementos reguladores ou partes biológicas de interesse, de modo similar a um circuito elétrico. Nesses circuitos, os sinais de entrada (*inputs*) são recebidos e computados para controlar a expressão de sinais de saída (*outputs*). Os *inputs* geralmente são identificados pelo módulo detector do circuito, que reconhece sinais como substratos celulares e produtos do metabolismo. Já os *outputs* costumam fazer parte de um módulo operador, que processa o sinal recebido e determina a resposta celular. Assim, o sinal de saída ou “repórter” é expresso. Geralmente, esse sinal precisa ter alguma característica detectável, por exemplo uma proteína fluorescente. (Kim *et al.*, 2018).

São frequentes os estudos que utilizam circuitos genéticos que realizam o controle em diferentes níveis (transcricional, traducional etc.) de sequências codificantes, com aplicações voltadas para diagnóstico de doenças (Mckay *et al.*, 2018) e controle da simbiose planta-bactéria (Haskett *et al.*, 2023). Além disso, a partir dos anos 2000, foram feitos diversos estudos envolvendo modificação de bactérias para serem quimiotaticamente atraídas por poluentes industriais, hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, petróleo), herbicidas e seus produtos de degradação (Parales & Harwood, 2002). Dessa forma, a capacidade de reprogramar bactérias para seguirem sinais químicos tem o poder de criar novas oportunidades em biorremediação, bionanotecnologia e na própria biologia sintética (Topp & Gallivan, 2007).

A introdução de flavonoides em circuitos genéticos é relativamente recente na literatura. Considerando a grande importância dos flavonoides na comunicação planta-bactéria através do estabelecimento de relações simbióticas (Mierziak *et al.*, 2014), o sistema QdoR de *B. subtilis* já foi modificado e aplicado para construir biossensores para

detectar a concentração intracelular de quercetina em *E. coli* (Siedler *et al.*, 2014) e monitorar sua concentração no solo (Del Valle *et al.*, 2020). Os biossensores de flavonoides são bastante estudados na literatura (De Paepe *et al.*, 2018; Pini *et al.*, 2017; Siedler *et al.*, 2014). Circuitos genéticos responsivos a naringenina, um flavonoide da classe flavanona, também são bastante promissores. Ao contrário do sistema QdoR que se baseia em um repressor transcricional, o sistema FdeR tem como base um ativador transcricional regulado por naringenina. Esse sistema também tem sido bem explorado recentemente (De Paepe *et al.*, 2018; Kashiwagi *et al.*, 2024; Meyer *et al.*, 2019; Ryu *et al.*, 2020).

Em relação a regulação da expressão gênica utilizando circuitos genéticos responsivos a flavonoides, destaca-se o trabalho de Kashiwagi *et al.* (2021). Os autores utilizaram componentes do sistema QdoR de *B. subtilis* em *E. coli* e construíram circuitos genéticos cujo *output* é a expressão da proteína GFP. Esse sistema, diferente de um biossensor convencional, utilizou uma biblioteca de promotores de diferentes forças transcricionais, demonstrando que para a mesma concentração de quercetina, a expressão de *gfp* ocorre em diferentes níveis dependendo do promotor que regula o repressor QdoR. Os autores ainda misturaram duas estirpes que expressam quantidades altas (regulação pelo promotor J23110) e baixas (regulação pelo promotor J23114) de QdoR e ao induzir com a mesma concentração de quercetina, duas populações estáveis que expressam diferentes níveis de seus genes repórteres foram geradas. Este trabalho representa uma oportunidade para estudar a motilidade direcionada a moléculas específicas, mediante a substituição do gene *gfp* por *cheZ*. Isso permitiria verificar a influência da quimiotaxia na relação competitiva entre bactérias colonizando seus hospedeiros. Além disso, ao obter bactérias rápidas e lentas na mesma população, seria possível analisar se bactérias mais rápidas podem estabelecer uma relação harmônica com as mais lentas, e assim, a quimiotaxia direcionada não seria apenas específica para a população que responde rápido ao indutor.

2.2 VIA METABÓLICA DA QUIMIOTAXIA E MECANISMO DE ADAPTAÇÃO

Para entender o funcionamento da quimiotaxia, é necessário entender seu mecanismo bioquímico de funcionamento (Figura 1), que é bem caracterizado principalmente em *E. coli*, apesar de sua complexidade. Os principais componentes moleculares da via de sinalização de quimiotaxia são conservados em muitas espécies de

bactérias (Alexander & Zhulin, 2007), porém o organismo modelo utilizado nesse trabalho é *E. coli*. O mecanismo molecular da quimiotaxia é ativado e desativado por sucessivas fosforilações e desfosforilações entre as proteínas CheA, CheB, CheR, CheW, CheY e CheZ, que controlam a rotação dos flagelos. Na membrana celular bacteriana, existem pelo menos 5 tipos de quimiorreceptores denominados MCP (*methyl-accepting chemotaxis proteins*) que reconhecem diversos atraentes. Por exemplo, os aminoácidos aspartato e serina são quimioatraentes para *E. coli* (Cremer *et al.*, 2019). Esses receptores se associam às proteínas CheW e CheA. CheW é uma proteína que conecta o quimiorreceptor à CheA, que por sua vez é uma histidina quinase com capacidade de autofosforilação dependendo da ausência ou presença de ligantes no receptor de membrana. Além disso, a metiltransferase CheR é responsável por metilar o receptor associado à molécula atraente e assim estimular a atividade fosforilase de CheA. Como resultado, CheA transfere um grupamento fosforil para a proteína reguladora de resposta, CheY. A forma fosforilada de CheY (CheY-P) liga-se aos motores flagelares e favorece sua rotação no sentido horário. Com isso, a bactéria assume um fenótipo de *tumbling* (quimiotaxia bloqueada, a bactéria se desloca em em volta do seu próprio eixo de rotação). A proteína terminal dessa cascata é a fosfatase CheZ, que atua sobre CheY-P e regula seus níveis de fosforilação. Por outro lado, a quimiotaxia é ativada quando ao redor da bactéria a concentração de quimioatraente diminui e, portanto, diminui a ocupação nos sítios do quimiorreceptor, gerando uma mudança conformacional em CheA, que deixa de se autofosforilar. Isso ocasiona, ao longo do tempo, uma queda nos níveis de CheY-P, devido a ação de CheZ e a falta de reposição de grupos fosforil por CheA. Quando os níveis de CheY-P caem, o motor flagelar é induzido a rotacionar no sentido anti-horário, permitindo à bactéria um fenótipo de *running* (deslocamento direcionado) (Figura 2) (Virgile *et al.*, 2018; Topp & Gallivan, 2007). A atividade de CheZ, portanto, é imprescindível para que haja quimiotaxia, visto que estirpes de *E. coli* $\Delta cheZ$ não são quimiotáticas (Hazelbauer *et al.*, 2008; Virgile *et al.*, 2018; Topp & Gallivan, 2007).

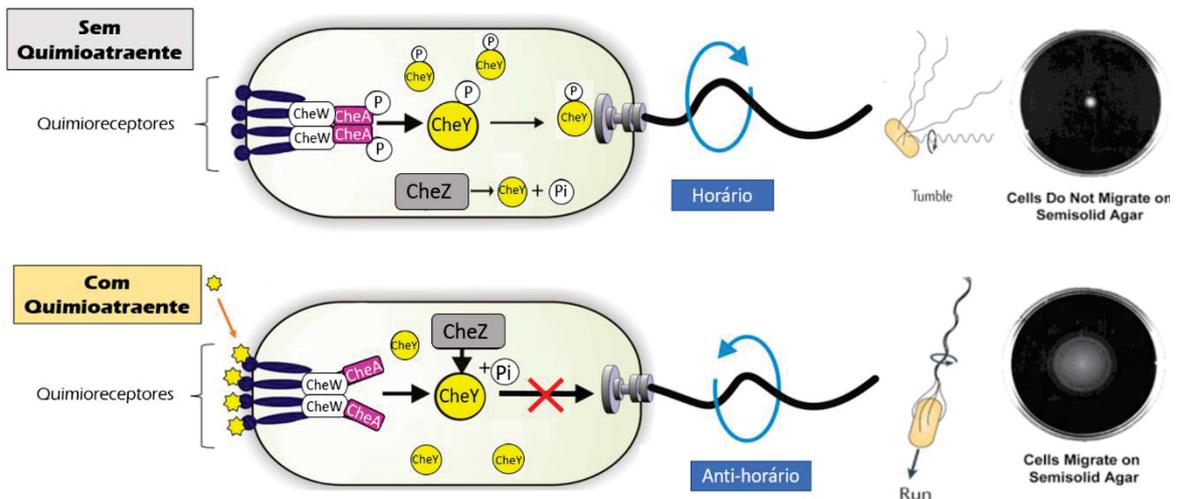


FIGURA 1: MECANISMO MOLECULAR DA QUIMIOTAXIA.

No cenário onde não há quimioatraentes ligados aos quimiorreceptores de membrana, a proteína CheA fica em sua forma ativada e se autofosforila. Esse fosfato é transferido para proteínas CheY, que em sua forma fosforilada (CheY-P) se ligam nos motores flagelares da bactéria, induzindo sua rotação no sentido horário. O resultado é o fenótipo de *tumbling* onde os flagelos não rotacionam em sincronia e não direcionam a célula. De modo contrário, na presença de quimioatraentes se ligando aos receptores, a proteína CheA sofre uma mudança conformacional e perde sua capacidade de autofosforilação. Com o tempo, a fosfatase CheZ remove o grupo fosfato de CheY, liberando os motores flagelares, que sem um CheY-P ligado rotacionam no sentido anti-horário. O resultado é a rotação sincronizada dos flagelos, propulsionando a bactéria em uma direção. Nessa condição, as células se deslocam em busca de nutrientes. Fonte: Adaptado de Topp & Gallivan, (2007).

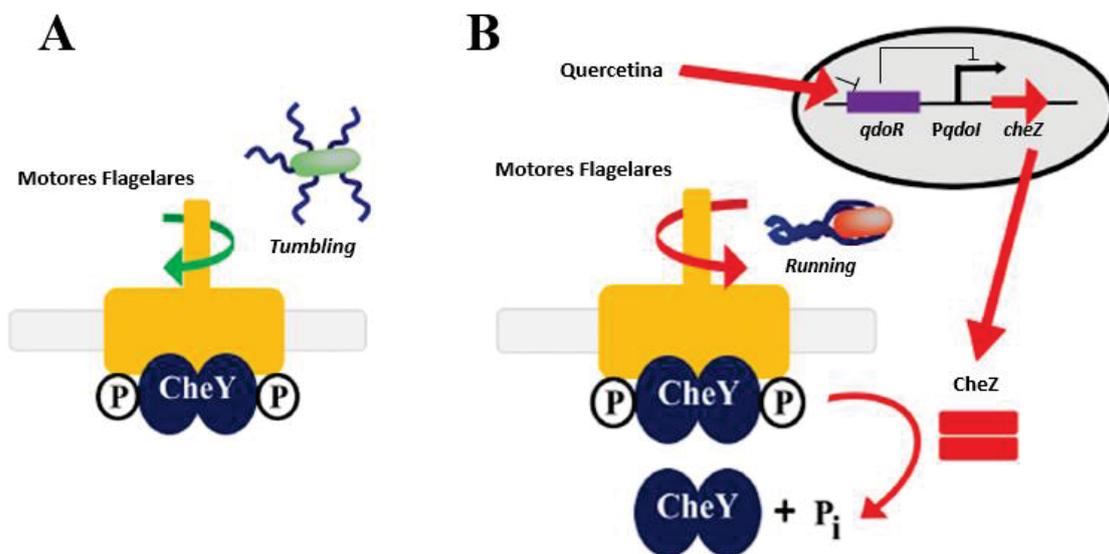


FIGURA 2: INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE *cheZ* NA ROTAÇÃO DOS FLAGELOS DE *E. coli*.

A figura representa em forma ilustrativa a hipótese do trabalho. (A) Espera-se que na ausência de quercetina, as células não expressem *cheZ* e permaneçam em *tumbling*, com CheY-P ligado aos motores flagelares. (B) porém ao adicionar quercetina, a expressão de *cheZ* é liberada para remover o fosfato de CheY, liberando os flagelos e permitindo o fenótipo de *running*. Fonte: Adaptado de Virgile *et al.*, (2018).

A cascata bioquímica da quimiotaxia possui uma regulação adicional por metilações e desmetilações, fornecidas pelas metiltransferases de adaptação CheB e CheR, que tem como objetivo adaptar as células a gradientes de nutrientes. A célula se torna adaptada a um determinado gradiente de nutrientes devido a ação de CheR. CheR adiciona grupamentos metil aos quimiorreceptores já ativados por um ligante, o que induz a reativação de CheA mesmo na presença de quimioatratantes. Essa metilação devolve a capacidade de autofosforilação de CheA, o que também aumenta os níveis de CheY-P e faz a célula aumentar sua frequência de *tumbling* mesmo na presença de quimioatratantes. Esse mecanismo aumenta a probabilidade de a célula permanecer em locais com maior quantidade de nutrientes e evitar pontos onde eles estão em menor quantidade, visando sua sobrevivência. Isso também faz com que a célula busque por concentrações cada vez maiores de nutrientes. A proteína CheB, em contrapartida, realiza a desmetilação dos quimiorreceptores, o que acontece ao longo do tempo quando a célula se desloca de uma região de maior para menor concentração de atraentes (Kanungpean *et al.*, 2011, García-Fontana *et al.*, 2013; Berg, 2000).

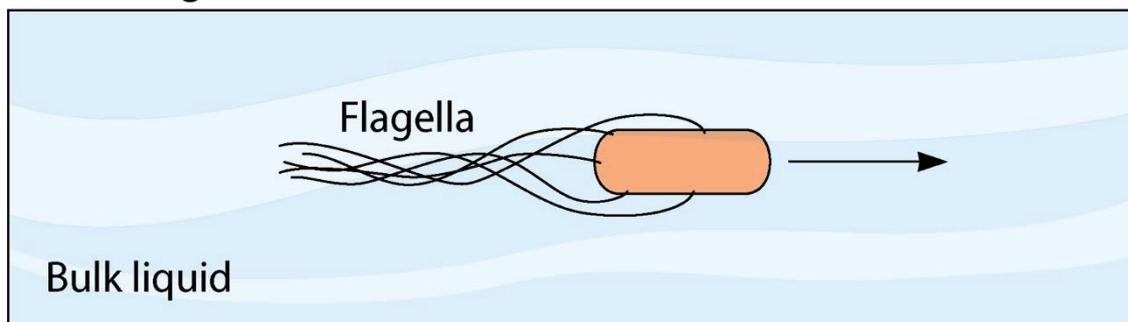
Todas as proteínas da cascata bioquímica da quimiotaxia possuem funções importantes para o seu funcionamento. Mutantes de todos os genes dessa via já foram estudados, todos eles apresentam padrões de motilidade alterados, e geralmente não são quimiotáticos. (Parkinson & Houts, 1982). O gene *cheZ*, no entanto, aparenta ser o mais promissor para a regulação da via, pois sua atividade é decisiva na expressão do fenótipo running. Além disso, os trabalhos que realizaram engenharia da quimiotaxia, em sua maioria utilizam esse gene como resposta a uma molécula indutora (Topp & Gallivan, 2007; Virgile *et al.*, 2014; McKay *et al.*, 2017; McKay *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023). É importante salientar que a concentração das proteínas que compõem a rede pode variar entre uma célula e outra, dentro da mesma população, de modo inevitável. Dessa forma, existem bactérias mais e menos sensíveis aos efeitos de tais proteínas, em uma amostra. Um exemplo dessa variação ocorre quando uma célula se divide, o que faz com que as proteínas solúveis sejam particionadas aleatoriamente. Como a maioria das proteínas envolvidas na sinalização e adaptação são solúveis e estão presentes em apenas algumas centenas de cópias por célula, as suas concentrações variam (Alon *et al.*, 1999).

2.3 REGULAÇÃO DA QUIMIOTAXIA EM *Escherichia coli*

Primeiramente, é necessário esclarecer a diferença entre motilidade e quimiotaxia. A motilidade bacteriana refere-se ao deslocamento não direcionado de células, seja ele pelo mecanismo *swimming* ou *swarming* (Figura 3), utilizando flagelos, pili, entre outras formas de locomoção (Wadhwa & Berg, 2022). Em outras palavras, a motilidade não envolve a ativação de receptores de membrana. Por outro lado, a quimiotaxia é um tipo específico de movimento direcionado em resposta a gradientes químicos no ambiente. As bactérias são capazes de detectar substâncias químicas em seu ambiente e ajustar sua direção de movimento em resposta a esses gradientes químicos. Além disso, na quimiotaxia positiva, as bactérias movem-se em direção a concentrações crescentes de uma substância química (químioatraente), enquanto na quimiotaxia negativa, elas se afastam de concentrações crescentes (quimiorepelente) (Topp & Gallivan, 2007; Wadhwa & Berg, 2022). Recentemente foi demonstrado que a atração por uma molécula de difusão rápida e a repulsão por uma molécula de difusão lenta são combinadas, surge o movimento em uma nova direção e os tempos de interceptação são significativamente reduzidos, ou seja, melhorando a resposta quimiotática (Bloxham *et al.*, 2024).

Os químioatraentes geralmente são compostos energéticos para as bactérias, como glucose e aminoácidos, moléculas que ativam MCPs específicos nas células e induzem a rotação flagelar que impulsiona a bactéria (Virgile *et al.*, 2018).

Swimming



Swarming

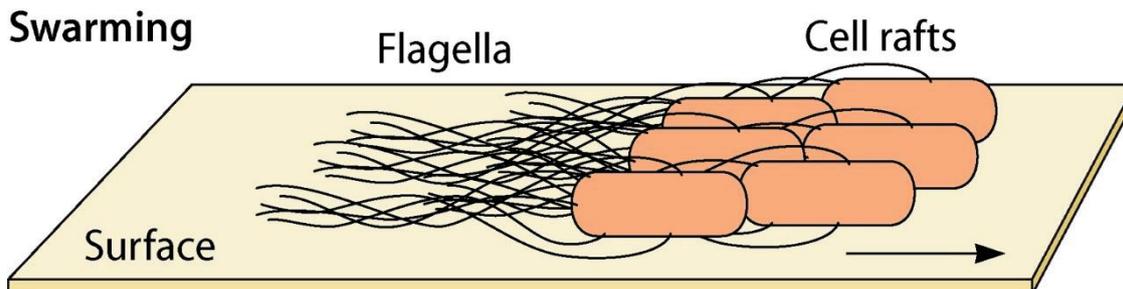


FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA DIFERENÇA ENTRE *SWIMMING* E *SWARMING*.

O fenótipo *swimming* refere-se ao movimento individual de cada célula, reflexo da rotação dos flagelos e ocorre em meio líquido. Já o *swarming* ocorre em superfícies de meios de cultura (semissólidos ou sólidos) e consiste no movimento de “arraste” coletivo das células. Fonte: Wadhwa & Berg, (2022).

É importante antecipar que a utilização de um sistema de expressão induzível por ligantes não-cognatos como os flavonoides, ou seja, não naturais para as bactérias, para controlar a expressão de *cheZ*, denomina-se pseudotaxia. Este sistema é diferente da quimiotaxia clássica de *E. coli*, pois a motilidade celular em direção ao novo ligante seria ditada pela concentração absoluta do ligante em um momento específico, ao invés das diferenças de concentração entre dois pontos no tempo. Além disso, na pseudotaxia os ligantes, na maioria das vezes, não são metabolizáveis pela célula, então não ativam os receptores de membrana. Por isso, para que seja observada a movimentação de bactérias reprogramadas, é necessário haver uma fonte de carbono para ativar o receptor de membrana e o indutor da expressão de *cheZ*, no mesmo meio de cultivo (Topp & Gallivan, 2007; Virgile *et al.*, 2018).

Apesar de a motilidade de *E. coli* também ter sido estudada ao mesmo tempo que a quimiotaxia, a maior parte da atenção no que diz a respeito à estudos de locomoção, possui relação com a cascata bioquímica da quimiotaxia. Entretanto, não é raro encontrar

investigações sobre a regulação da motilidade de *E. coli* através de circuitos genéticos. Para isso, é utilizado como *output* o gene *motA*, cuja expressão gera uma proteína reguladora do torque necessário para a rotação flagelar. Utilizando como *input* o 3-oxo-hexanoil-homoserina (3OC6HSL), um produto metabólico do fitopatógeno *Pantoea stewartii*, Ravichandar *et al.* (2017) condicionaram o movimento de *E. coli* à presença desse composto. Desse modo, na ausência de 3OC6HSL, a expressão de *motA* foi reprimida e a bactéria perdeu a motilidade. Porém, após a adição de 3OC6HSL, a expressão de *motA* foi restaurada, restaurando também a motilidade celular. Entretanto, regular a expressão de *motA* altera apenas a capacidade de motilidade, o que está relacionado a rotação dos flagelos independente de quimioatração. Utilizando esse sistema, seria possível apenas ativar e desativar o movimento da estirpe programada. A capacidade de bactérias em detectar e se mover em direção a moléculas sinalizadoras consiste principalmente na regulação transcricional do gene *cheZ* de *E. coli* (Virgile *et al.*, 2014).

Como mencionado anteriormente, além da expressão de *cheZ*, para que o deslocamento das células aconteça, é necessário a presença de uma fonte de carbono, comumente o aminoácido aspartato, que ativa o receptor de membrana Tar. Com base nisso, Topp & Gallivan (2007) desenvolveram um mRNA regulador (riboswitch), que permite a expressão de *cheZ* somente na presença de um *input*, que nesse caso, induz uma mudança conformacional no riboswitch e libera o sítio de ligação ribossomal do gene *cheZ*, permitindo sua tradução. Esse *input* foi a teofilina, um alcaloide análogo à cafeína, que não é um quimioatraente natural e não é metabolizado por *E. coli*. Mesmo assim, a teofilina foi capaz de induzir essa mudança conformacional aos riboswitches e permitiu a tradução de *cheZ*. Na verdade, o movimento observado pelos autores foi o de pseudotaxia, como mencionado anteriormente. Na presença de aspartato, as bactérias se deslocaram em direção a um gradiente de teofilina. Entretanto, os autores utilizaram glicerol 2% no meio mínimo testado. Isso pode causar interferências nos dados de quimiotaxia, uma vez que o glicerol em baixas concentrações exerce efeito quimioatraente e causa alterações no transporte de elétrons e no potencial de membrana (Rebbapragada *et al.*, 1997).

Os estudos sobre regulação da quimiotaxia em si, são mais frequentes e atuais na literatura do que a motilidade. Aplicações *in vivo* de bactérias modificadas para o diagnóstico e tratamento de doenças são dificultados pela sua acumulação ineficiente em áreas de inflamação. Dessa forma, existem vários estudos utilizando biomarcadores de

inflamação como atratores de *E. coli*. Mediante a expressão de *cheZ* em *E. coli*, dentro de um circuito genético responsivo a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Virgile *et al.* (2018) desenvolveram um sistema no qual *E. coli* foi reprogramada para se mover em direção a H_2O_2 , uma molécula sinalizadora da resposta imune. Isso foi feito utilizando *cheZ* como *output* e um módulo detector composto pelo regulador *oxyR*, relacionado ao estresse oxidativo por meio da detecção de H_2O_2 no ambiente. Entretanto, o H_2O_2 é uma molécula cognata à bactéria, ou seja, existe uma produção endógena, mesmo que baixa, que pode gerar ruídos indesejáveis na expressão de *cheZ* e ativar a quimiotaxia sem especificidade. Por outro lado, o trabalho de McKay *et al.* (2017) foi promissor para regular a quimiotaxia em *E. coli*, através de um circuito genético responsivo a piocianina, uma toxina emitida por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística. Isso foi feito condicionando a expressão de *cheZ* ao promotor *soxRS*, que controla a transcrição do seu próprio repressor SoxR. Assim, quando em contato com a piocianina, SoxR é oxidado e desreprime a expressão de *soxRS*, permitindo a transcrição de *cheZ* e como consequência, ativação da quimiotaxia. Todavia, SoxR também pode ser oxidado por diversas moléculas e agentes oxidantes, o que pode levar a expressão de *cheZ* mesmo na ausência de piocianina.

No trabalho mais recente, *E. coli* foi reprogramada para migrar em direção a tetrionato (um biomarcador de inflamação intestinal), que é regulado pelo sistema de dois componentes TtrSR (TCS) de *Shewanella baltica* (Wang *et al.*, 2023). Os autores introduziram em *E. coli* o cluster de genes *ttrBCA* que expressa a tetrionato redutase de *Salmonella enterica typhimurium*, um importante patógeno que causa inflamação intestinal. Como resultado, a estirpe gerada exibiu tropismo ao tetrionato mediante expressão de *cheZ*, em comparação com a cepa original, e foi capaz de metabolizar a molécula, exibindo uma alta especificidade. Além disso, os autores otimizaram os elementos do circuito construído (RBS, sequências e promotores) para obter uma atividade específica e sensível na detecção e migração em direção ao tetrionato.

Apesar disso, assume-se que sempre haverá um vazamento da expressão de *cheZ*, pois existem muitas variáveis moleculares no estudo dessa via de transdução de sinal (Alon *et al.*, 1999). Analisar a expressão de *gfp* como repórter de um circuito, por exemplo, fornece dados mais confiáveis, pois não há uma sequência de reações enzimáticas até a expressão do fenótipo de fluorescência verde, como há na quimiotaxia. Além disso, também é possível que na mesma população de bactérias reprogramadas, a expressão de *cheZ* e de todas as outras proteínas da quimiotaxia seja diferencial entre as

células individuais, o que é inevitável (Alon *et al.*, 1999). É possível também que haja uma heterogeneidade na expressão do fenótipo devido a variação nas concentrações de proteínas que participam da via da quimiotaxia. Essas variações são comuns em sistemas biológicos (Altschuler & Wu, 2010). Dessa forma, provavelmente que uma bactéria com alta expressão de *cheZ*, ao se deslocar, arraste consigo bactérias com baixa expressão. Essa é uma dinâmica que ainda não foi explorada no campo da quimiotaxia. Portanto, ainda não se conhece a logística que bactérias de uma mesma população assumem quando encontram um atrator, ou seja, as bactérias que respondem rápido influenciam nas que respondem lentamente ou que não respondem? A resposta a essa questão surge como uma oportunidade para estudar a movimentação de bactérias guiadas por moléculas que naturalmente não são reconhecidas pelo organismo em questão.

Por fim, apesar de representarem iniciativas interessantes que podem ser aprimoradas para um mecanismo de entrega de fármacos, diagnóstico e controle de patógenos, ainda não há relatos de circuitos genéticos envolvendo a regulação da quimiotaxia utilizando flavonoides. Sabe-se que a quimiotaxia é um processo importante para o estabelecimento da relação planta-bactéria, como foi introduzido na seção 1, e que muitos flavonoides são naturalmente quimioatraentes para alguns microrganismos. Porém, mesmo assim, a literatura ainda é pobre envolvendo pesquisas sobre a regulação da motilidade em bactérias competindo pela colonização de seus hospedeiros.

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DA QUIMIOTAXIA

O acúmulo de técnicas para o estudo da quimiotaxia acontece desde o século passado (Adler, 1975). Grande parte dos trabalhos relacionados à análise da quimiotaxia em bactérias são focados em análises quantitativas da expressão gênica das proteínas envolvidas em seu mecanismo molecular (Webb *et al.*, 2018), utilizando também modelagem matemática para previsões experimentais (Edginton & Tindall, 2018). Análises qualitativas também são frequentemente realizadas, com o objetivo de verificar visualmente se bactérias possuem quimiotaxia positiva para compostos de interesse (Parales & Harwood, 2002).

Por muitos anos se utilizou como técnica padrão no estudo de quimiotaxia placas de meio semissólido. Entretanto, a modernização tecnológica está favorecendo a predominância de ensaios de microscopia e microfluidica (Long *et al.*, 2017) e capilaridade, que estão substituindo a medida de halos em meio semissólido aos poucos

(Darias *et al.*, 2014). Isso porque provavelmente há muito mais variáveis a serem controladas ao utilizar meios semissólidos, como por exemplo a evaporação da água que é inevitável e altera a concentração de ágar. Isso acaba se tornando uma variável problemática, uma vez que a partir de uma concentração de ágar acima de 0,25%, a probabilidade de observar o fenótipo de deslocamento coletivo de bactérias (*swarming*) é maior (Ha *et al.*, 2014; Kearns, 2010). Além disso, a profundidade no ágar onde as bactérias são inoculadas também pode interferir no tipo de motilidade (Wadhwa & Berg, 2022). Se o inóculo ocorrer na superfície do ágar em forma de gota, sem perfuração, a tendência é que as bactérias se movimentem em *swarming*, ao mesmo tempo que é uma dificuldade inocular bactérias exclusivamente no corpo do meio, evitando que algumas se desprendam e subam para a superfície. Inocular bactérias no fundo da placa também aumenta a chance de observar fenótipos distintos de *swimming*, como o *twiching* e *gliding*, por exemplo (Wadhwa & Berg, 2022). Dessa forma, visualizar exclusivamente fenótipos de *swimming* em meio semissólido acaba se tornando pontual para algumas análises. Neste contexto, os ensaios em meio líquido parecem ser mais adequados para análise quantitativa da quimiotaxia, no fenótipo *swimming*.

Métodos de capilaridade tem sido cada vez mais adotados devido ao seu baixo custo e facilidade de replicação. Além disso, por se tratar de um método vertical, as células migram contra a força gravitacional, o que torna o método sensível. Ainda, a principal forma de comunicação entre as câmaras interna e externa é a capilaridade, portanto, experimentos de capilaridade são sistemas semifechados onde a evaporação do fluido é minimizada. Por fim, não há difusão do quimioatraente colocado nos capilares, em pelo menos 30 minutos de experimento (López *et al.*, 2021).

Análises utilizando microscopia são inovadoras pelo fato de permitirem observar a dinâmica espaço-temporal de células fluorescentes usando microscopia confocal ou microscopia de contraste de fase, por exemplo. Utilizando as imagens obtidas por microscopia, é possível analisar as células individualmente, permitindo caracterizar o movimento aleatório das células e suas trajetórias ao longo do tempo (Cremer *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

A quimiotaxia está entre os mecanismos moleculares mais caracterizados na biologia. É comum visualizar tal mecanismo como uma resposta à diminuição de

nutrientes ou uma forma de escapar de substâncias que representam perigo. Apesar disso, pouco é conhecido a respeito da sua dinâmica dentro de uma população de bactérias. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho foi regular a quimiotaxia de *Escherichia coli* (BW25113 $\Delta cheZ$) através da construção de circuitos genéticos que permitem às células de uma população se locomoverem, em diferentes intensidades, na presença do flavonoide quercetina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i): Construir circuitos genéticos com promotores de diferentes forças regulando a expressão do gene *qdoR*, que por sua vez, controla a expressão de *cheZ*, e transformá-los em BW25113 $\Delta cheZ$.

(ii): Analisar a pseudotaxia das bactérias modificadas, em resposta a quercetina, comparando a influência dos promotores em cada estirpe gerada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Lisogeny Broth) (Extrato de levedura 5 g/L, Triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7) (Sambrook & Russel, 2006) a 37°C sob agitação orbital constante de 120 RPM e em meio sólido LA (LB com 15 g/L de ágar) (Sambrook & Russel, 2006). As células de *E. coli* foram estocadas a -20 °C em glicerol 50%.

Para a execução de todos os experimentos, 5–10µL de *E. coli* armazenada como estoques em glicerol foram inoculadas em placas de meio Lisogeny Broth (LB) sólido, acrescidas do antibiótico correspondente, canamicina (50 µg/mL), gentamicina (15 µg/mL), cloranfenicol (30 µg/mL) e/ou ampicilina (250 µg/mL) e cultivados a 37°C por 14-16 horas. Em seguida, colônias individuais foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB com o respectivo antibiótico e agitadas a 120 RPM a 37°C por 14-16h.

4.2 ESTIRPES, VETORES E CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS

4.2.1 Estirpes Bacterianas Utilizadas

As estirpes de *E. coli* utilizadas estão compiladas na Tabela 1. A estirpe *E. coli* BW25113 (Datsenko & Wanner, 2000) foi utilizada como a estirpe selvagem. Já a estirpe *E. coli* BW25113 $\Delta cheZ$ foi obtida da coleção de mutantes do National BioResource Project (Shizuoka, Japão). Os mutantes dessa coleção foram obtidos pelo método descrito anteriormente para gerar a Keio Collection (Baba *et al.*, 2006). Foi realizado um protocolo de transdução utilizando fago P1 para transferir a mutação em questão para *E. coli* MG1655, porém, a transdução não gerou colônias recombinantes e não foi possível selecionar o mutante $\Delta cheZ$ em *E. coli* MG1655. Dessa forma, a estirpe padrão para os plasmídeos construídos foi a própria BW25113. As construções (clonagens) foram realizadas na estirpe *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Estados Unidos).

Estirpe	Genótipo	Fornecedor
BW25113	$\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-3) \lambda$ - rph-1 $\Delta(rhaD-rhaB)568$ hsdR514	(Invitrogen Co., San Diego, CA)
BW25113 $\Delta cheZ$	$\Delta(araD-araB)567$ $\Delta lacZ4787(::rrnB-3) \lambda$ - rph-1 $\Delta(rhaD-rhaB)568$ hsdR514; $\Delta cheZ$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
TOP10	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara,leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG.	(Datsenko & Wanner, 2000),

TABELA 1: ESTIRPES DE *E. coli* UTILIZADAS NESTE TRABALHO.

4.2.2 Vetores Utilizados

O principal vetor de clonagem foi pSB1C3 (origem de replicação pMB1; alto número de cópias: 100-300 por célula). Entretanto, sabe-se que um plasmídeo de alto número de cópias podem sobrecarregar excessivamente o hospedeiro, ocupando muita maquinaria celular e usando muita energia, enquanto que plasmídeos de baixo número de

cópias podem ser iguais ou até mesmo melhores para expressão de DNA recombinante em *E. coli* (Jones *et al.*, 2000). Por isso, os circuitos finais foram clonados no vetor pSB4C5 (origem de replicação pSC101; baixo número de cópias: ~5 por célula) (Shetty *et al.*, 2008; Sambrook & Russel, 2006).

4.3 MANIPULAÇÃO DE DNA

4.3.1 Método de Clonagem de DNA

Os plasmídeos utilizados neste trabalho foram construídos usando o método de montagem BioBrick (Shetty *et al.*, 2008). As partes genéticas contendo os módulos de *qdoR* e *cheZ* foram obtidas por síntese química pela empresa GenScript Biotech ou através do Registry of Biological Standard Parts (iGEM Repository - <https://parts.igem.org/Catalog>). A sequência de nucleotídeos do gene *qdoR* foi obtida de Kashiwagi *et al.*, (2021) e a do gene *cheZ* através do banco de dados BioCyc (<https://biocyc.org/ECOLI/sequence-rc?type=GENE&object=EG10151>). Essas partes genéticas foram desenhadas para conter o prefixo e o sufixo do BioBricks Standard Assembly, ou seja, um conjunto específico de enzimas de restrição à montante (EcoRI e XbaI) e à jusante (SpeI e PstI). A partir do Registry of Biological Standard Parts, foram utilizados promotores constitutivos sintéticos (BBa_J23114 e BBa_J23110), um RBS (BBa_B0034), um terminador de transcrição (BBa_B0015) e um espaçador (BBa_B0040). Os plasmídeos foram construídos usando pSB1C3 ou pSB1A2 como vetores, contendo uma origem de replicação de alto número de cópias derivada de pUC19 e um marcador de resistência ao cloranfenicol ou ampicilina.

4.3.2 Plasmídeos Construídos

Os plasmídeos construídos neste trabalho estão listados na Tabela 2. A partir do Registry of Biological Standard Parts, citado na seção clonagem, foram utilizados dois promotores constitutivos sintéticos (BBa_J23114 e BBa_J23110), um RBS (BBa_B0034), um terminador de transcrição (BBa_B0015) e um espaçador (BBa_B0040). Todos os plasmídeos foram construídos usando pSB1C3 ou pSB1A2 como vetores, contendo uma origem de replicação de alto número de cópias derivada de pUC19 e um marcador de resistência ao cloranfenicol ou ampicilina.

Plasmídeo	Características Relevantes	Referência
pSB1C3	Cm ^R , Alto número de cópias (100-300 por célula)	iGEM repository
pSB4C5	Cm ^R , Baixo número de cópias (~5 por célula)	iGEM repository
pGPB01	Cm ^R , T- <i>qdoR</i> -RBS- P _{J23110} - Espaçador - P _{qdoI} -RBS- <i>cheZ</i> -T (pSB4C5)	Este trabalho
pGPB02	Cm ^R , T- <i>qdoR</i> -RBS- P _{J23114} - Espaçador - P _{qdoI} -RBS- <i>cheZ</i> -T (pSB4C5)	Este trabalho
pGPB00	Cm ^R , T- <i>qdoR</i> -RBS- P _{J23114} (pSB4C5)	Este trabalho

TABELA 2: PLASMÍDEOS UTILIZADOS E CONSTRUÍDOS NESTE TRABALHO.

"Psubscrito" refere-se ao promotor utilizado. Códigos BioBrick: RBS - B0034, T: B0015. Cm^R: Resistência a cloranfenicol.

Os circuitos regulatórios construídos envolvem o repressor transcricional QdoR e o promotor do gene *qdoI* de *Bacillus subtilis*. Quando QdoR é expresso, liga-se fortemente aos sítios operadores à montante de *qdoI*, porém se desliga quando interage com quercetina. O promotor *qdoI* controla a expressão do gene *cheZ* de *E. coli*. A fosfatase CheZ defosforila a proteína CheY-P e por consequência regula a quimiotaxia, como já mencionado. A construção dos plasmídeos foi pensada para gerar duas estirpes de *E. coli* BW25113 $\Delta cheZ$ que expressam um nível alto e baixo de *cheZ*, de modo que se movimentariam de maneira mais rápida e lenta, respectivamente. Para isso, foram utilizados dois promotores de uma biblioteca chamada Promotores Anderson (<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>) (Figura 4-B). O plasmídeo que confere alta expressão de *cheZ* possui *qdoR* sob regulação do promotor J23114. Já o plasmídeo que confere baixa expressão de *cheZ* possui *qdoR* regulado pelo promotor J23110. Um esquema ilustrando essas duas construções está contido na Figura 4-A.

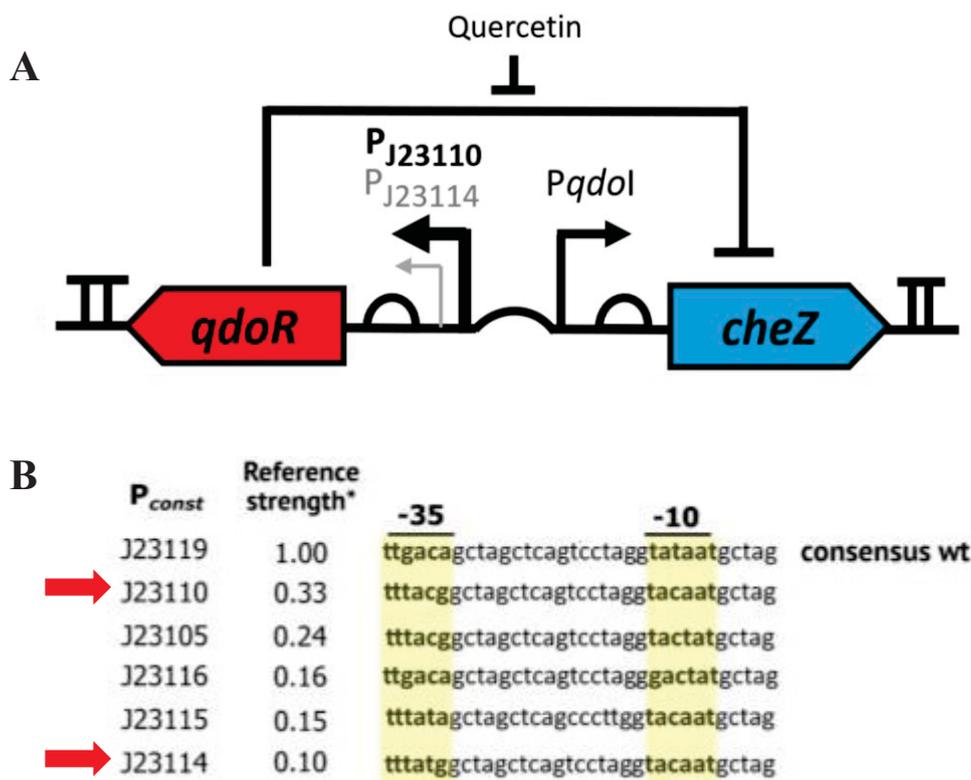


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DOS CIRCUITOS GENÉTICOS CONSTRUÍDOS NESSE TRABALHO.

(A) O funcionamento do circuito deve ser interpretado da seguinte forma: o gene *cheZ* é regulado pelo promotor *PqdoI*, que por sua vez é regulado pelo repressor *qdoR*. A quercetina se liga ao repressor *qdoR* forçando seu desligamento do DNA e permite a expressão de *cheZ*. Em cada circuito, um promotor constitutivo diferente regula a expressão de *qdoR*, gerando dois circuitos diferentes. (B) Biblioteca de Promotores construída por J. Christopher Anderson (Disponível em <http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>) demonstrando as alterações nas regiões -35 e -10 realizadas na sequência consenso, que gera formas alternativas do promotor J23119 com forças transcricionais diferentes. As setas vermelhas indicam os promotores utilizados neste trabalho. O promotor J23110 possui 33% da força do promotor original e o promotor J23114 possui 10%. Fonte: (A) O autor, (B) Kashiwagi *et al.* (2021)

4.3.3 Transformação Bacteriana

4.3.3.1 Preparo de *Escherichia coli* quimiocompetente

Colônias isoladas de *E. coli* TOP10 foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação de 160 RPM por 12 horas. A seguir, foram inoculados 1/100 do volume em 100 mL de meio LB em Erlenmeyer de 500 mL. A cultura foi incubada nas mesmas condições que o inóculo, até DO_{600} de 0,5. Quando a cultura atingiu este estágio, foi transferida para 2 tubos de 50mL estéreis e dispostas em gelo durante 30

minutos. Após isso, os tubos foram centrifugados a 5.000 RPM, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com o mesmo volume de CaCl₂ 0,1M gelado. Na sequência, os tubos foram deixados no gelo por 1 hora e após foram centrifugados nas mesmas condições anteriores, mas dessa vez ressuspensos em 1/100 do volume de CaCl₂ 0,1M/Glicerol 15%. As células foram alíquotadas em Tubos de 1,5 mL (100µL) e armazenadas a -80 °C.

4.3.3.2 Transformação por choque térmico

Alíquotas de 100µL de células quimiocompetentes foram retiradas de armazenamento a -80 °C e descongeladas em banho de gelo (cerca de 10 minutos). Alíquotas de 2µL de plasmídeo ou de 10µL de reação de ligação foram misturadas às células e deixadas em gelo por mais 10 minutos. Em seguida, os tubos foram dispostos a 42°C em Banho Maria, por 50 segundos, e imediatamente colocados de volta ao banho de gelo. Após mais 5 minutos ao gelo, as células foram recuperadas a 30 ou a 37°C em 1mL de meio LB. Após este período, 100µL da mistura foram plaqueados em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Após 16h de crescimento a 30 ou 37 °C, foi observada a formação de colônias.

4.3.3.3 Preparo de *Escherichia coli* eletrocompetente

Colônias isoladas de *E. coli* TOP10 foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubadas a 37 °C sob agitação de 160 RPM por 12 horas. A seguir, foram inoculados 1/100 do volume em 50mL de meio LB em Erlenmeyer de 250mL. A cultura foi incubada nas mesmas condições que o inóculo por 2-3 horas, até atingir a fase exponencial, o que correspondeu a uma DO₆₀₀ de 0,4-0,6. A seguir, a cultura foi transferida para um falcon de 50mL e centrifugada por 5 minutos a 4°C e 6.000 RPM. O sobrenadante foi removido com pipeta. As células foram lavadas com metade do volume de água ultra-pura gelada. Tal lavagem foi repetida 3 vezes, de modo que na última centrifugação, as células foram ressuspensas em 500µL de glicerol 10%. Finalmente, as células preparadas seguiram direto para o protocolo de eletroporação, ou seja, não foram armazenadas para uso posterior.

4.3.3.4 Transformação por eletroporação

Alíquotas de 50 μL de células eletrocompetentes recém preparadas foram misturadas com 1 μL da amostra contendo o DNA a ser transformado, em eppendorfs de 1,5mL. A mistura foi transferida para uma cuveta de eletroporação e submetida a choque de 1.800 volts (25 μF e 200 Ω), depois as células foram movidas para um eppendorf com 1mL de meio SOC para que fossem incubadas a 37 °C durante 1h para recuperação. Após este período, 100 μL da mistura foram plaqueados em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Após 16h de crescimento a 37 °C foi observada a formação de colônias.

4.3.5 Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina

A extração de DNA plasmidial foi feita seguindo o protocolo de Lise Alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). De uma cultura saturada em meio LB, foram coletados 1,5 mL de volume em eppendorfs da mesma capacidade. As células foram centrifugadas a 13.000 RPM por 1 minuto. O precipitado de células foi ressuspendido em 150 μL de solução GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM e Tris-HCl 25 mM, pH 8,0) e a mistura foi brevemente homogeneizada em Vortex. Foram adicionados 150 μL de solução de lise (NaOH 0,2 M e SDS 1%, (m/v) e a mistura foi homogeneizada invertendo o tubo lentamente até observação do aumento de sua viscosidade. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos para ocorrer lise completa. Após a lise, adicionou-se 150 μL de Kacf (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M) e a homogeneização se deu por inversão. Em seguida, foram adicionados 100 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v). A solução foi misturada em vortex e centrifugada por 5 minutos a velocidade máxima. A fase aquosa (400 μL) foi transferida para outro eppendorf e nele foram adicionados 3 volumes de Etanol Absoluto e a solução foi incubada à -20°C por 25 minutos para precipitação do DNA. Após isso, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 14.500 RPM e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado por 5 min a 14.500 RPM. O sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado foi secado a estufa de 37°C por 1 hora. Após secagem, o precipitado foi solubilizado em 20 μL de água ultra-pura. Através desse protocolo, a concentração de DNA plasmidial é alta. Por isso, para a utilização dessa amostra em PCR ou reações de digestão por exemplo, foi necessário diluí-la.

4.3.6 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

A eletroforese de DNA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). O gel foi preparado fundindo a agarose a 1% (m/v) em tampão TAE 1X (TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1 mmol/L pH 8,3) (Sambrook *et al.*, 1989). Para a corrida utilizou-se o mesmo tampão. O DNA a ser analisado foi misturado com 3 μ L de solução FSUDS (azul de bromofenol 0,8% (m/v); ficol 10% (m/v); xileno cianol 0,4% (m/v), SDS 1% (m/v), EDTA 1,8mM; Tris-HCl 65mM, pH 8,0) e aplicado no gel de agarose. As eletroforeses foram realizadas sob voltagem constante de 80 V. Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL para revelação das bandas de DNA. O gel foi incubado por 30 min, depois foi lavado em água destilada por mais 10 min para eliminação do excesso do corante. As bandas foram visualizadas em um sistema de documentação de imagens (UVP UltraViolet Products) irradiando o gel com UV no comprimento de onda de 312 nm.

4.3.7 Reações de Digestão com Endonucleases de Restrição

As digestões de plasmídeos e produtos de PCR foram feitas em tubos Eppendorfs de 1,5 mL. As reações possuíram volume variado, mas em geral o volume final foi de 70 a 100 μ L. Desses, 74 μ L foram água ultra-pura, 10 μ L de tampão de restrição 10X apropriado para a enzima e fornecido pelo fabricante, 15 μ L de DNA plasmidial (0,2 a 1 μ g de DNA) e 1 μ L da enzima de restrição de escolha (10U de enzima). A temperatura e tempo de incubação foram ajustados de acordo com a enzima utilizada, seguindo as especificações do fabricante. Caso fosse necessário, foi feito a precipitação da reação de restrição após a incubação com isopropanol para remover os sais e deixar a amostra mais limpa.

4.3.8 Reações de Ligação de DNA

As reações de ligação foram feitas em um volume final de 10 μ L. Dessa quantidade, 3 μ L foram de DNA do inserto (concentrações ajustadas para 100 ng/ μ L), 2 μ L de vetor (25 ng/ μ L), 1 μ L de T4 DNA ligase (200 U/ μ L) e 1 μ L de tampão T4 DNA ligase (concentração final 1X). A reação de ligação foi incubada em sala climatizada a 16°C por 12 horas. A reação foi transformada em *E. coli* TOP10 quimiocompetente e a

seleção dos plasmídeos recombinantes foi feita após o crescimento das colônias em meio LA contendo o antibiótico apropriado.

4.3.9 Triagem de Plasmídeos Recombinantes

As colônias que cresceram em meio LA foram coletadas e cultivadas em 5mL de meio LB durante 16 h (37°C, 250 rpm), na presença de antibiótico para seleção. Após crescimento, cada colônia teve seu DNA extraído pelo método de Lise Alcalina citado anteriormente. Da mesma forma, cada DNA extraído foi submetido a reação de restrição com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem. Essa reação foi adaptada para um volume de 5µL, incubados a 37°C por 3 horas e posteriormente aplicados em eletroforese em gel de agarose para seleção dos recombinantes pelo tamanho do fragmento de DNA. Adicionalmente foram feitas reações de sequenciamento desses plasmídeos pelo método de Sanger, que confirmaram todas as partes genéticas em ordem correta.

4.2.10 Reação em cadeia da polimerase (PCR).

As reações de amplificação de DNA foram realizadas utilizando DNA genômico ou DNA plasmidial purificado. O sistema de reação, com volume final de 20µL conteve 1-4 ng/mL de DNA plasmidial, 0,5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador ou primer, 0,2mM de dNTPs, tampão de reação XF 10X (Nørholm, 2010), 2,5 mmol/L de MgCl₂ e 0,2µL de Pfu DNA Polimerase (Nørholm, 2010). A amplificação foi realizada em 25 ciclos: 20 segundos a 96 °C, 20-15 segundos para anelamento dos primers na temperatura adequada para cada par e 30- 120 segundos a 72 °C para extensão. Os primers utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 3.

Primer	Sequência (5' -> 3')	Referência
FW-cheZ-Biobrick	TGCTTCTAGATGATGCAACCATCAA	Este trabalho
REV-cheZ-Biobrick	GTTTCTTCCTGCAGCGGCCGCTACT	Este trabalho
VF2	TGCCACCTGACGTCTAAGAA	iGEM repository
VR	ATTACCGCCTTTGAGTGAGC	iGEM repository
cheZ_interno	CATCTGCACAACATAGTAC	Este trabalho
Fw_RBS-cheZ-T	TGCTTCTAGAGCTTAAAGAGGAGAAATAC	Este trabalho

TABELA 3: OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS) UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

4.3.11 Integração de *sfGFP* cromossomal - sistema CRIM

O sistema CRIM (conditional-replication, integration, and modular) é uma ferramenta versátil e rápida para gerar mutações e inserções de genes no cromossomo de estirpes de *E. coli*. Esse sistema consiste na transformação da estirpe de interesse com um plasmídeo chamado pHI80, que contém o gene *sfGFP*. Ele possui também um sítio de ligação de fago (*attP*), que sinalizará a integração desse plasmídeo no loci $\phi 80$ do cromossomo de *E. coli*. Além disso, o plasmídeo contém uma origem de replicação condicional (RK6) que o torna replicativo apenas em estirpes *pir+* e uma marca de seleção ao antibiótico gentamicina. Para que a integração gênica aconteça no cromossomo, é necessário o uso de um plasmídeo *helper* (pAH123), que possui os elementos para a expressão de uma integrase que reconheça os sítios *attP* e catalizem a integração. Esse plasmídeo possui origem de replicação pSC101, que é termosensível, ou seja, ao cultivar as células em temperatura maior que 37°C, as bactérias começam a perder o plasmídeo. É importante salientar que as estirpes a receber a integração precisam ser *pir-*, pois, caso contrário, o plasmídeo pHI80 irá se replicar dentro das células (Ceroni *et al.*, 2015; Haldimann & Wanner, 2001).

A primeira etapa da integração foi a transformação por choque térmico das estirpes de interesse com o plasmídeo pAH123, cultivando a 30°C para evitar a perda do plasmídeo. Após isso, foram preparadas células eletrocompetentes e eletroporou-se (1.8 kV, 25 μ F, 200 Ω) (Lessard C., 2013) o plasmídeo de inserção pHI80, adicionando ampicilina (250 μ g/mL) no tubo de recuperação. As células foram recuperadas a 37°C por uma hora e a 42°C por 30 minutos, com o objetivo de eliminar o plasmídeo *helper*, uma vez que a reação de integração já ocorreu. Na sequência, as bactérias foram plaqueadas em meio com gentamicina e cultivadas a 37°C. Com as colônias que cresceram, foi verificada a perda do plasmídeo *helper* através do cultivo em ampicilina e gentamicina. As colônias que não crescerem em ampicilina e crescerem em gentamicina, expressando fluorescência verde, foram selecionadas como recombinantes. (Ceroni *et al.*, 2015; Haldimann & Wanner, 2001).

4.4 ENSAIOS DE PSEUDOTAXIA

Com exceção dos ensaios em placas de meio semissólido, os experimentos foram feitos na presença de casaminoácidos como fonte de carbono, para a ativação dos quimiorreceptores das células, enquanto a quercetina foi adicionada para induzir a expressão de *cheZ* nas estirpes carregando os circuitos construídos.

4.4.1 Ensaios em Placas de Meio Semissólido

Para o preparo desses experimentos, as estirpes contendo as construções da tabela 1 foram cultivadas em meio LB overnight com o antibiótico apropriado. No dia seguinte, a cultura foi diluída 100x em meio LB e cultivada novamente em shaker a 37°C e a 120 RPM até atingir fase logarítmica ($DO_{600} \sim 0,3$). As células foram centrifugadas a 5.000 RPM por 5 minutos, uma rotação baixa para manter a integridade dos flagelos. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em tampão de quimiotaxia (10 mM K_2HPO_4 ; 10 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EDTA;) (O'Neal *et al.*, 2018) e a DO_{600} foi ajustada para 0,1 (Long *et al.*, 2017). Essa solução de pH 6,9 teve como objetivo manter um pH adequado para os testes, fornecer fontes minerais garantindo o funcionamento da via da quimiotaxia. O EDTA previne a degradação de ácidos nucleicos por ser um agente quelante (desativa nucleases). As placas foram preparadas com o meio LB contendo a concentração de 0,2% de ágar. O meio foi vertido nas placas logo após sair da autoclave, ainda derretido, minimizando a evaporação de água. O antibiótico apropriado foi adicionado e as placas foram deixadas secar em temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos. A seguir, um papel filtro estéril com corte padronizado de 1 cm² foi colocado a 1 cm de distância à direita do centro (distância previamente calculada e demarcada na placa). Sob o papel, foi adicionada uma gota de quercetina (concentração do estoque 1 mM). A placa foi deixada em descanso por mais 30 minutos a temperatura ambiente, para o preparo das células mencionado no início do parágrafo. Após o término da lavagem e correção da DO_{600} , as células foram inoculadas nas placas com auxílio de um palito de dente, um método que maximiza a quantidade de células que são dispostas dentro do ágar e minimiza as células que ficam na superfície. As placas foram finalmente incubadas a 37°C fechadas em uma caixa contendo um recipiente com água, para evitar a secagem das placas e manter a umidade. Após 24 a 30 horas, as placas foram analisadas, o registro fotográfico foi feito em uma câmara UVP e os halos foram medidos no software ImageJ.

4.4.2 Ensaio de Pseudotaxia em Capilares

4.4.2.1 Capilares inseridos em pipetadora multicanal – Contagem de UFC

Esta metodologia foi adaptada de López *et al.* (2021) e está representada na Figura 5. As estirpes contendo as construções da Tabela 1 foram cultivadas em meio LB até a fase logarítmica ($DO_{600} \sim 0,3$) e centrifugadas a 5.000 RPM por 5 minutos, uma rotação baixa para manter a integridade dos flagelos. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em tampão de quimiotaxia (10 mM K_2HPO_4 ; 10 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM EDTA) (O'Neal *et al.*, 2018) e a DO_{600} foi ajustada para 0,1 (Long *et al.*, 2017). Na sequência, alíquotas de 200 μ L foram distribuídas em uma fileira de 8 poços de uma placa de 96 poços. Uma pipetadora multicanal de 10 μ L foi carregada com os capilares (Figura 5-A) (pipetas de pontas longas de 10 μ L), os quais foram acrescidos de 10 μ L (volume final) das seguintes soluções: polivinilpirrolidona 0,05% (utilizada para minimizar a adsorção de células na parede do capilar (Berg & Linda, 1990)), casaminoácidos 0,1% como fonte de carbono (Cremer *et al.*, 2019), 100 μ M de quercetina (Kashiwagi *et al.*, 2021) solubilizada em Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich) (diluição de 10x a partir de uma solução estoque de 1mM em DMSO) e tampão de quimiotaxia. O controle negativo foi feito na mesma condição, porém apenas com o solvente DMSO, sem quercetina. Em seguida, os capilares foram submersos em cada poço contendo as bactérias. O aparato foi apoiado em um suporte que permitiu a permanência estática do experimento por 30 minutos em estufa de 30°C. Passado esse tempo, foi feita diluição seriada das soluções contidas nos capilares e uma gota de 5 μ L de cada diluição foi aplicada em placas de meio LB sólido com o antibiótico apropriado. Essas placas foram incubadas 16 h a 30°C para que na manhã seguinte a contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) pudesse ser realizada com as colônias ainda pequenas, evitando contagem equivocada de colônias fusionadas.

4.4.2.2 Capilares inseridos em seringas – Contagem por Citometria de Fluxo

Este ensaio teve como objetivo melhorar o ensaio de capilar utilizando pipetadora multicanal. Para isso, ao invés de utilizar a pipetadora, que limita o número de amostras ao número de pipetas que encaixam nela, foram utilizadas seringas de plástico estéreis de 1mL. Além disso, foi utilizado um suporte de pipetas para manter as seringas na posição vertical. Ponteiras longas de 10 μ L foram inseridas nas seringas e seladas com esmalte para evitar entrada de ar. A ponta de cada ponteira foi planejada para permanecer

mergulhada na altura correta de um poço preenchido com 200 μL de meio ou tampão contendo células marcadas com GFP cromossomal em uma placa de 96 poços (Figura 5-B). Os capilares foram carregados com tampão de quimiotaxia, filtrado em membrana de 0,45 μM , na presença ou ausência de 100 μM de quercetina. Enquanto isso, as bactérias a serem submetidas ao experimento foram lavadas como citado na seção anterior e a DO_{600} foi ajustada para 0,1. As soluções de células foram acrescidas de polivinilpirrolidona 0,05% (utilizada para minimizar a adsorção de células na parede do capilar (Berg & Linda, 1990)) e casaminoácidos 0,1% como fonte de carbono (Cremer *et al.*, 2019). Finalmente, as células foram fracionadas em 200 μL em uma segunda placa de 96 poços estéril. O experimento se iniciou com o acoplamento do suporte contendo os capilares inseridos nas seringas às bactérias aliqüotadas na segunda placa de 96 poços. Esse dispositivo foi incubado a 30°C por 30 minutos. Após a incubação, o líquido dos capilares foi coletado em tubos de 1,5 mL contendo 200 μL de tampão de quimiotaxia e 90 μL canamicina a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a fixação das células (amostras dos capilares foram diluídas 10x). A contagem de células foi obtida por citometria de fluxo (BD Accuri™ C5 Flow Cytometer). Os filtros utilizados foram FL1-H que mede a intensidade de fluorescência, no eixo X, e FSC-A, que mede o tamanho relativo de partículas da amostra, no eixo Y. O volume de amostra utilizado para leitura foi de 10 μL por amostra, e a velocidade de fluxo foi média. A normalização das amostras no equipamento foi feita com uma solução contendo os mesmos componentes presentes nos capilares, livre de células, e também com células não fluorescentes. Por fim, os gráficos gerados foram divididos em 4 quadrantes, utilizando como padrão a fluorescência emitida pela amostra de bactérias fluorescentes. Com isso, os eventos resultantes apresentaram-se também em 4 quadrantes, porém foram contabilizados somente aqueles presentes no quadrante de fluorescência.

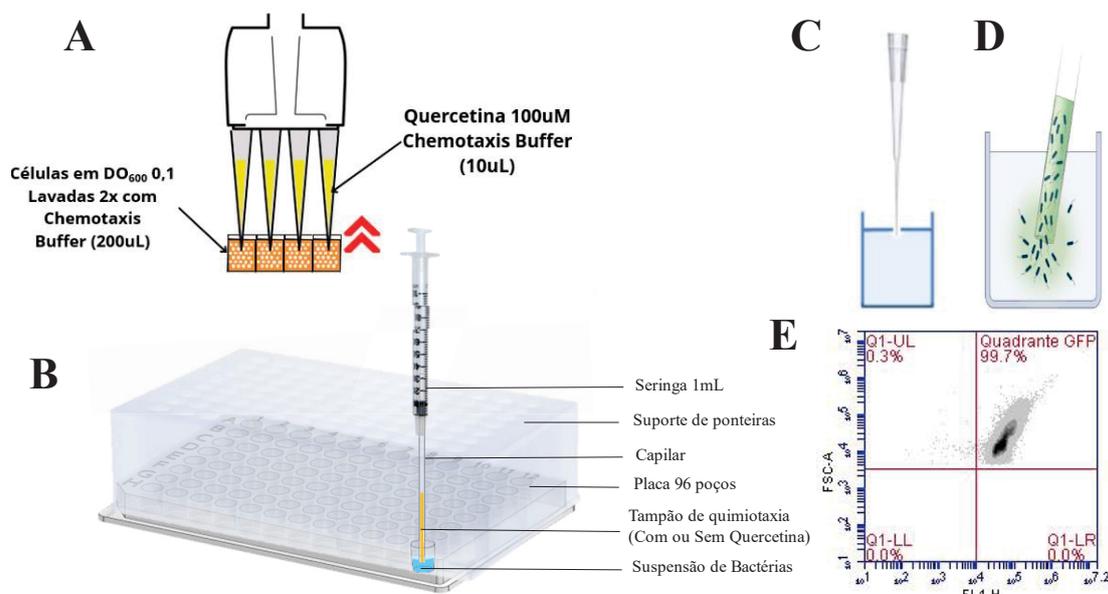


FIGURA 5: ESQUEMA DOS ENSAIOS DE QUIMIOTAXIA DE *E. coli* PELOS MÉTODOS DE CAPILARIDADE.

(A) Método de capilaridade utilizando pipetadora multicanal. Para estes experimentos, a contagem das células foi feita por UFC, que reflete a quantidade de células dentro dos capilares. As setas vermelhas indicam a direção de migração esperada das células. (B) Método de capilaridade utilizando seringas e um suporte de pipetas para acoplar os capilares. Este método pode abrigar até 48 seringas (amostras) ao mesmo tempo e permite a colocação e a retirada de todas elas ao mesmo tempo, graças ao suporte que encaixa em placas de 96 poços. (C) Esquema geral de uma amostra preparada no dispositivo gerado neste trabalho. Esta imagem mostra a altura ideal de acoplamento do capilar ao ficar mergulhado nos poços, não deve ficar até o fundo pois estimula a migração de células por ação de empuxo. (D) A figura mostra o comportamento esperado das células neste tipo de ensaio. (E) Imagem exemplo dos gráficos gerados em citometria após a passagem das amostras presentes nos capilares. Como as células utilizadas estavam marcadas com GFP, foi possível isolar essas células das partículas não fluorescentes, isso foi feito através da divisão do gráfico em quadrantes. O equipamento fornece a contagem apenas do quadrante GFP.

4.4.3 Ensaios em Microscopia Confocal

4.4.3.1 Ensaios em Lâminas

Para os experimentos em microscopia confocal utilizando lâminas, foi utilizada uma estirpe de *E. coli* que expressa *sfGFP* cromossomal como marcador fluorescente. As lâminas foram preparadas no momento do experimento. Para deixar as células nadarem livremente em três dimensões, uma câmara de amostra foi construída com duas lamínulas e fita durex de 1 mm de espessura como espaçador (Figura 6). Esse sistema também minimiza a existência de arraste das bactérias pelo líquido em movimento, permitindo que o único movimento observado seja advindo da movimentação flagelar em 3D das bactérias (Cremer *et al.*, 2018; Huo *et al.*, 2021). A preparação das células foi iniciada com um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada em placa de cada estirpe testada, em meio LB, com o antibiótico correspondente e sob agitação de 150 RPM a 37°C por

aproximadamente 16 horas. No dia seguinte, as cultura foram diluídas 100x no mesmo meio de cultura e induzidas com 0 μM (controle) e 100 μM de quercetina por 15-30 minutos em shaker nas mesmas condições de inóculo (Virgile *et al.*, 2018). As células cresceram até chegar em fase estacionária (aproximadamente 3 horas, DO_{600} 0,4). Em seguida, as células foram lavadas 3x com tampão de quimiotaxia (10mM K_2HPO_4 ; 10mM KH_2PO_4 ; 0,1mM EDTA) (O'Neal *et al.*, 2018). Cada lavagem consistiu em uma centrifugação em Minispin a 5.000 RPM por 5 minutos e ressuspensão gentil em tampão de quimiotaxia, tomando esses cuidados importantes para não prejudicar a integridade dos flagelos. Na última lavagem, a DO_{600} foi ajustada para 0,2 para melhor visualização no microscópio. Além disso, foi adicionado Polivinilpirrolidona 0,05% (Berg & Linda, 1990) para minimizar a aderência das células na lâmina e lamínula, casaminoácidos a 0,1% para ativar os receptores de membrana e 100 μM de quercetina nas amostras, quando aplicável. 50 μL dessas células foram colocadas nas lâminas confeccionadas, imediatamente vedadas com esmalte transparente e analisadas em microscópio confocal (microscópio invertido ECLIPSE Ti-E, Confocal A1R-MP equipado com Nikon).

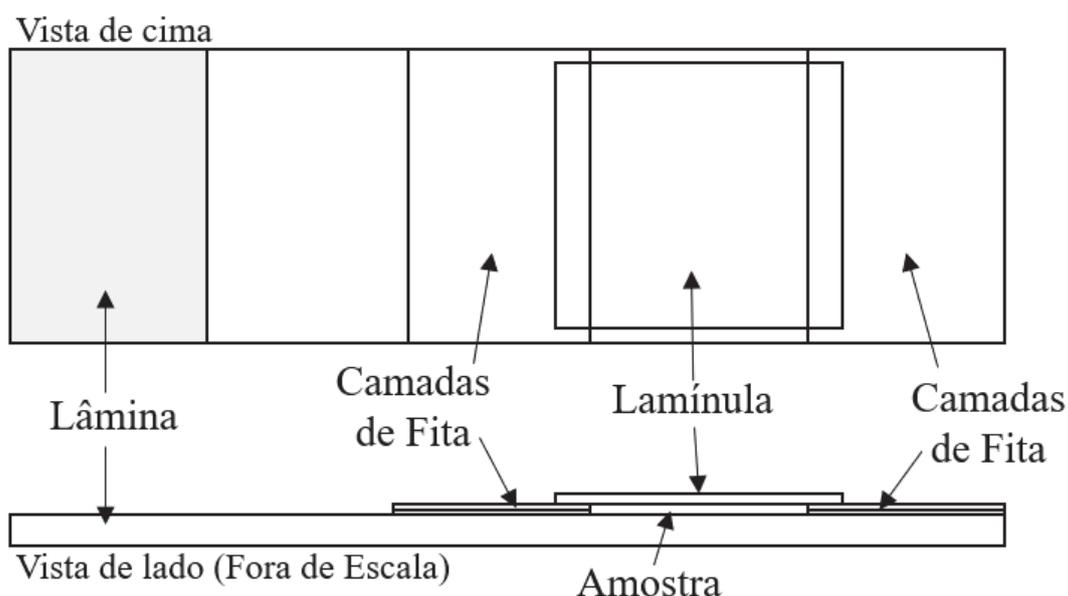


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO DE UMA LÂMINA DE MICROSCÓPIO CUSTOMIZADA PARA EXPERIMENTOS DE CONFOCAL.

A customização foi realizada nas lâminas de microscópio para lidar com amostras de células permitindo sua movimentação em 3D, livre de arraste. Foram colocadas três camadas empilhadas de fita adesiva em duas posições de sua extremidade, criando uma depressão. Uma lamínula foi colocada exatamente em cima dessas duas elevações de fita. Isso evita que a suspensão de células na amostra fossem comprimidas pelo peso da lamínula, o que teria resultado em medições errôneas. O espaço criado pelas pilhas de fitas possuiu

uma altura de aproximadamente 180 μ m. Para a visualização no microscópio confocal, as lâminas foram vedadas com esmalte, deixando um pequeno espaço para a introdução das células no momento da obtenção das imagens. Fonte: Adaptado de Padron, (2004).

4.4.3.2 Vídeos de Motilidade e *Cell tracking*

Essa técnica foi adaptada a partir de estudos anteriores (Cremer *et al.*, 2019; Virgile *et al.*, 2018). Vídeos de 100 frames foram gravados em 3 posições diferentes de cada amostra para posterior análise. Para essa análise foi utilizado o Plukin TrackMate do programa Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012), que utiliza algoritmos e filtros para reduzir o ruído do fundo da imagem e detectar pontos fluorescentes em cada frame do vídeo. Foi aplicado um filtro de tamanho de 6 μ m, excluindo da análise partículas maiores. Além disso, foi notado que a detecção de células é encerrada quando as células se movem para fora do plano focal do microscópio confocal. Para obter a leitura ao longo das direções horizontais, foram consideradas apenas trajetórias que permaneceram no plano focal durante o tempo de 10 s (Cremer *et al.*, 2019). Outro ajuste feito, foi a remoção da análise de células que não possuíam movimento ao longo dos 10 s, indicando que estão mortas ou presas em alguma partícula da amostra (Cremer *et al.*, 2019). Para a confecção de gráficos do *Cell tracking*, foram selecionadas 12 células de forma aleatória ao longo das posições capturadas, e a média de distância percorrida com desvios padrão de cada amostra foi plotada para as estirpes construídas.

4.4.3.3 Microscopia confocal em placas de Petri com fundo de vidro

Para essa metodologia, foram utilizadas placas de Petri de 4 mm (SPL Life Sciences) adaptadas para microscopia. Elas possuem um recorte no fundo, onde é colada uma lâminula, permitindo a passagem de luz e visualização do conteúdo em microscópios invertidos. O preparo consistiu na transferência de 0,27 mL de meio LB semissólido (ágar 0,2%) ainda quente para uma placa de Petri com fundo de vidro e deixadas secar em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos (Cremer *et al.*, 2019). A quercetina 100 μ M foi adicionada quando necessário, junto ao meio ainda quente. A espessura final do ágar foi de aproximadamente 1,2 mm. A observação de expansão usando microscopia confocal iniciou-se quando 1 μ l de cultura de células em DO₆₀₀ 0,2 marcadas com GFP ou RFP no plasmídeo secundário pSB1A2 foram inoculadas no centro da placa. A placa foi então acoplada ao microscópio confocal e disposta dentro de uma

câmara que mantém a temperatura a 37°C. O microscópio foi programado para realizar registros a cada 15min. A partir dos vídeos em time-lapse gerados, a dinâmica de expansão foi analisada observando os perfis de intensidade espacial emergentes.

4.4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no Software Prism (GraphPad Prism v9.0). Os dados foram apresentados como médias \pm , de modo que (n.s.) $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Os experimentos foram feitos utilizando de 3 a 5 replicatas biológicas para os ensaios de capilaridade, e 3 para os ensaios de Meio semissólido e *Cell tracking*. Essas análises foram feitas utilizando teste t bicaudal de duas amostras independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS DE PSEUDOTAXIA EM PLACAS DE MEIO SEMISSÓLIDO

Os ensaios de pseudotaxia em meio semissólido demonstram primeiramente um halo uniforme, reflexo da busca por nutrientes da estirpe selvagem BW25113 (Figura 7-A), e o fenótipo defeituoso e não móvel da estirpe $\Delta cheZ$ (Figura 7-B). Essas duas estirpes foram comparadas em um registro feito em 24 horas de incubação, um tempo onde o halo da estirpe BW25113 estava visível. Em 30 horas, esse halo já havia atingido as bordas dificultando a visualização. Foi possível observar também que as estirpes de *E. coli* $\Delta cheZ$ transformadas com os plasmídeos que expressam *cheZ* foram capazes de se mover em meio LB semissólido após adição de quercetina, restaurado sua motilidade após 30 horas de incubação. Apesar disso, o circuito cujo promotor expressa *qdoR* mais em maior quantidade foi capaz de regular a expressão *cheZ* e liberá-la apenas na presença de quercetina (Figura 7-D). No entanto, com o circuito expressando *qdoR* sob regulação do promotor fraco J23114, provavelmente houve um vazamento na expressão de *cheZ*, resultando em motilidade basal mesmo na ausência de quercetina (Figura 7-E). Este comportamento, também chamado de ruído, já foi relatado para circuitos semelhantes (Kashiwagi *et al.*, 2021).

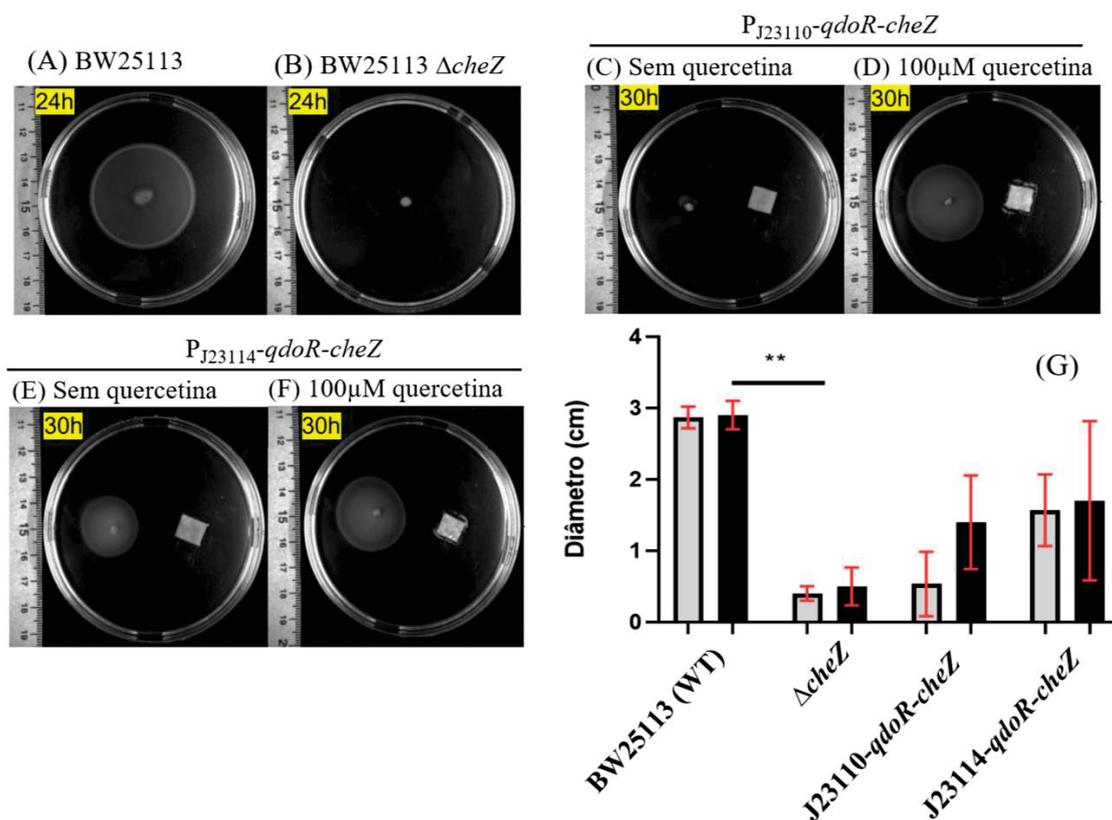


Figura 7- ENSAIOS DE PSEUDOTAXIA EM MEIO SEMISSÓLIDO.

Ensaio de motilidade (A e B) e pseudotaxia (C-F) executados em meio LB contendo 0,2% ágar e em temperatura de 37°C. Em A e B, as estirpes foram inoculadas no centro da placa com auxílio de um palito de dente estéril. Em C-F o inóculo ocorreu a 1cm à esquerda do centro, da mesma maneira. Os quadrados a 1cm à direita do centro correspondem ao papel filtro contendo a quercetina. Em (G) medições do diâmetro para cada estirpe, após 30 horas, na ausência e presença de 100 μ M de quercetina.

Apesar disso, a grande quantidade de variáveis desse tipo de experimento, mesmo que controladas, dificultaram sua reprodutibilidade, reflexo do alto desvio padrão observado nas estirpes construídas (Figura 7-G). Esse desvio está presente em condições semelhantes observadas por outros autores que realizaram o controle da expressão de $cheZ$ induzida por moléculas de interesse, mas não é tão acentuado (Virgile *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023). Outro fator que pode ter contribuído para a limitação da técnica foi a difusão da quercetina no meio semissólido. O flavonoide foi completamente solubilizado apenas em DMSO, enquanto que em água Mili-Q, a maior solubilidade alcançada foi na concentração de 100 μ M. No ágar, mesmo que em concentração baixa, essa difusão pode ter sido diminuída. considerando que ao adicionar menos do que 100 μ M de quercetina a indução do circuito não seria a máxima, observada em uma caracterização anterior

(Kashiwagi *et al.*, 2021). Apesar disso, é provável que exista uma quantidade diferencial de células sendo inoculadas em cada placa, pois com o emprego do palito de dente nessa técnica, não há garantia que a mesma quantidade de células foi colocada em cada placa. Por isso, foi decidido adotar métodos que são de fato quantitativos e utilizar preferencialmente meio líquido para melhor caracterizar os circuitos. Dessa forma, diversas variáveis seriam eliminadas, como por exemplo a diferença entre *swimming* e *swarming*, e a dificuldade da difusão da quercetina em ágar. É importante salientar também que a quantidade de DMSO contida nas amostras tanto nos controles quando na presença de quercetina, foi de 10%. De acordo com a literatura, esse solvente é considerado pouco tóxico (Mi *et al.*, 2016) ou até mesmo atóxico para *E. coli* (Brito *et al.*, 2017). Dessa forma, é possível que o DMSO tenha uma influências apenas física nas amostras, pelo fato de aumentar levemente a viscosidade do meio.

5.2 ENSAIOS EM CAPILARES

5.2.1 Sistema utilizando contagem de UFC

A partir dos experimentos em capilares com contagem de UFC foi possível quantificar a pseudotaxia das estirpes de *E. coli* em meio líquido, o que é mais confiável considerando que praticamente anula-se o fenótipo *swarming*. Nos resultados das triplicatas biológicas da Figura 8, foi possível observar que as estirpes BW25113 (WT) e o mutante $\Delta cheZ$, não demonstraram alterações em sua motilidade com a adição de quercetina. Apesar disso, a estirpe $\Delta cheZ$ apresentou, ainda que baixa, uma taxa de passagem para dentro dos capilares, indicando que há uma certa difusão e arraste de células. Mesmo assim, as estirpes transformadas com os plasmídeos deste trabalho responderam ao flavonoide, aumentando sua motilidade de maneira significativa na presença do ativador dos circuitos. Além disso, foi possível verificar uma taxa maior e significativa de motilidade entre a estirpe contendo a construção J23114-*qdoR-cheZ* e tanto ao mutante $\Delta cheZ$ quanto a construção J23110-*qdoR-cheZ*, o que é consistente com dados publicados previamente (Kashiwagi *et al.*, 2021). Outro ponto importante é a diferença entre a estirpe J23110-*qdoR-cheZ* e o mutante $\Delta cheZ$, que não foi significativa entre as condições de ausência e presença de quercetina. Isso ocorreu porque existem diversas variáveis que devem ser consideradas, até a atividade de CheZ faça efeito na cascata de ativação da quimiotaxia de *E. coli*. Um dado que reforça essa hipótese é que,

para a concentração de quercetina de 100 μM , em dados anteriores (Kashiwagi *et al.*, 2021), esse circuito atinge a expressão máxima do *output* (no caso, GFP). Ao considerar que a fluorescência mediada por GFP não está envolvida em uma cascata como a quimiotaxia envolvendo a expressão de CheZ, esses dados fazem sentido. Em suma, esses resultados iniciais sustentam a hipótese de que a indução de *cheZ* mediada por quercetina está reativando a motilidade da estirpe ΔcheZ . Outro ponto que é válido mencionar, é se as bactérias realmente estão sentindo os 100 μM de quercetina que foram dispostos nos capilares. É possível que o indutor esteja sendo diluído com o tempo, ou ainda esteja vazando para o poço, e assim não esteja desativando *qdoR* e permitindo a expressão de *cheZ*. Essa discussão é cabível para essa e para as próximas técnicas também.

Ainda assim, essa metodologia pode ser melhorada em relação à contagem de células. Considerando que a forma de contagem por UFC considera apenas as células viáveis dentro do capilar, e que uma quantidade de células pode morrer durante o tempo de incubação ou ainda se dividir, um método que considere as células vivas e mortas poderia ser mais indicado neste caso. Além disso, nos meios tempos que o experimento possui, as células podem realizar divisão celular, aumentando em quantidade nos capilares. A contagem por citometria de fluxo, por outro lado, seria mais exata, pois o citômetro realiza a contagem de células vivas e mortas. Isso permite fixar o número de células imediatamente após o período de incubação, utilizando um inibidor de crescimento bacteriano, a canamicina, como descrito na seção de metodologia. Essa abordagem evitaria a contagem equivocada de células que se dividiram ou que morreram durante a execução dos experimentos.

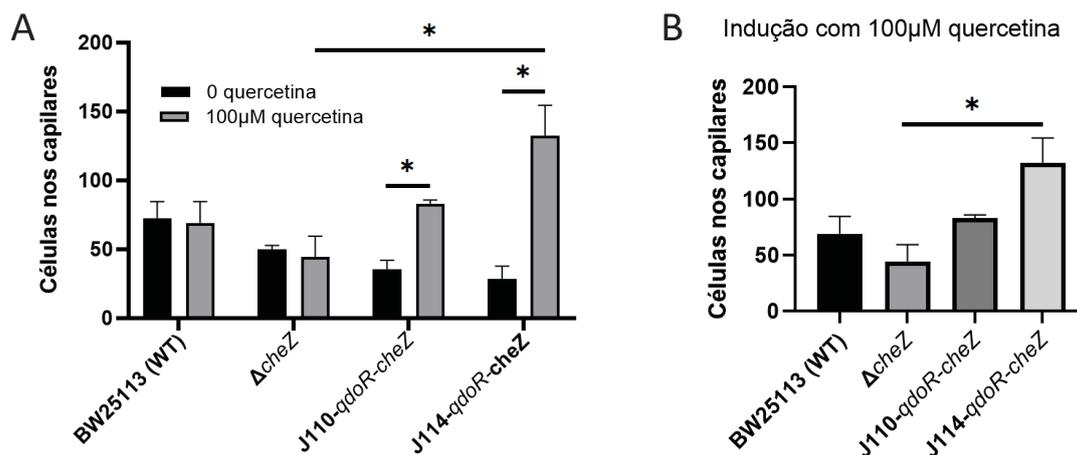


FIGURA 8: PSEUDOTAXIA DAS ESTIRPES DE *E. coli* UTILIZANDO A TÉCNICA DE CAPILARIDADE E TENDO NO EIXO Y A CONTAGEM DE UFC NOS CAPILARES.

Ensaio de pseudotaxia realizados nas estirpes BW25513, BW25113 $\Delta cheZ$, J23110-*qdoR-cheZ* e J23114-*qdoR-cheZ*. (A) Controles negativos e tratamentos com quercetina no eixo X (B) Estirpes na condição de indução com 100μM de quercetina. A contagem de células ocorreu a partir do plaqueamento de gotas de 5μL das células submetidas ao experimento, em triplicatas biológicas e considerando as diluições feitas.

5.2.2 Sistema utilizando contagem por Citometria de Fluxo

Como mencionado na seção anterior, a contagem por citometria de fluxo representaria uma forma mais sensível e menos suscetível a erros experimentais na obtenção de dados. Entretanto, foi observado um aumento nos desvios padrão gerais, o que pode ser devido ao fato da contagem considerar células vivas e mortas, que variaram entre as amostras. Os resultados da Figura 9 foram obtidos a partir de 5 replicatas biológicas e se mostraram similares aos resultados utilizando a técnica anterior, exceto pelo fato de que ambas as estirpes construídas (J23114-*qdoR-cheZ* e J23110-*qdoR-cheZ*) perderam a diferença estatística entre o controle negativo e na presença de 100μM de quercetina. Essa diferença entre as duas técnicas provavelmente é consequência do fato de o citômetro considerar na contagem células vivas e mortas, enquanto que a contagem de CFU considera apenas células viáveis. Sendo assim, a expressão basal de *cheZ* pode estar se intensificando nessa técnica, e isso é válido tanto para o estado induzido quanto não induzido. O perfil exibido por estes resultados também indicam que a quercetina não foi capaz de ativar a expressão de *cheZ* na construção regulada pelo promotor J23110. De modo contrário, foi observada uma migração maior das células reguladas pelo promotor J23114, tanto no controle negativo quanto na presença da quercetina. Isso ressalta o vazamento da expressão de *cheZ* no circuito onde *qdoR* é regulado por esse promotor, um

dados que também possui compatibilidade com estudos anteriores (Kashiwagi *et al.*, 2021). O gráfico da figura 9-B demonstra que houve diferença significativa ao comparar a construção J23114-*qdoR-cheZ* às demais estirpes, na condição de 100 μ M de quercetina, sustentando a ideia de que esse promotor gera de fato uma estirpe com maior capacidade de se movimentar na presença do indutor. Essa diferença merece um destaque adicional em relação a estirpe BW25113, que possui a maquinaria de quimiotaxia original de *E. coli*, sugerindo que a estirpe construída teve uma capacidade de migração ainda maior que a estirpe selvagem.

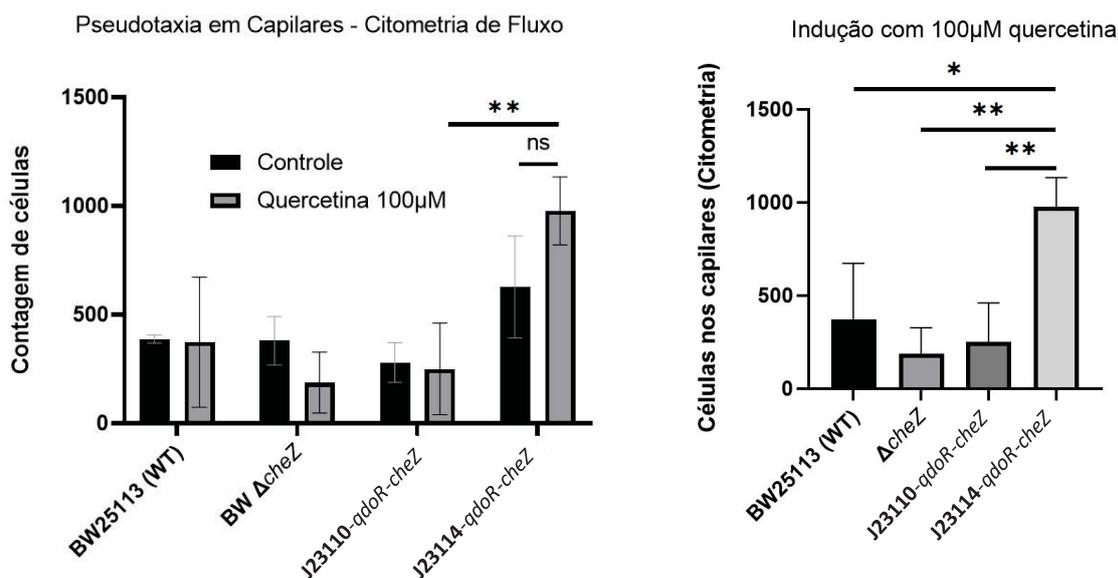


FIGURA 9: PSEUDOTAXIA DAS ESTIRPES DE *E. coli* UTILIZANDO A TÉCNICA DE CAPILARIDADE E TENDO NO EIXO Y A CONTAGEM DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Ensaios de pseudotaxia realizados nas estirpes BW25113, BW25113 Δ cheZ, J23110-*qdoR-cheZ* e J23114-*qdoR-cheZ*. (A) Controle negativo e o tratamento com quercetina (B) Estirpes na condição de indução com 100 μ M de quercetina. A contagem de células fluorescentes (estirpes expressando *sfGFP* cromossomal) foi realizada em citometria de fluxo com a solução presente dentro dos capilares, em 5 replicatas biológicas e considerando a diluição aplicada.

5.3 ENSAIOS DE MOTILIDADE EM MICROSCOPIA CONFOCAL

5.3.1 Vídeos de Motilidade e *Cell tracking*

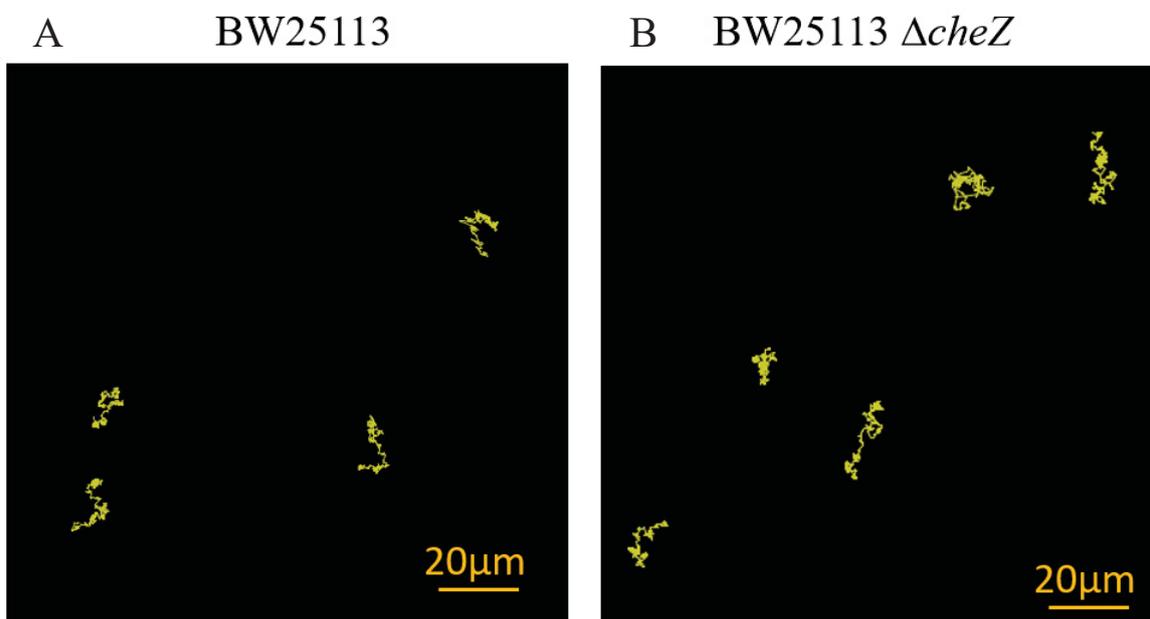
Com o objetivo de analisar o movimento das bactérias tendo a certeza que o fenótipo observado é o *swimming*, foram feitos experimentos em 2D utilizando vídeos de motilidade celular feitos em microscopia confocal. Para isso, foram utilizadas estirpes de *E. coli* expressando *sfGFP* cromossomal. A partir das imagens obtidas, a trajetória de 4 a 5 células aleatórias em 3 regiões aleatórias das amostras foram “rastreadas”, gerando

imagens com traços representativos dessas trajetórias (Figura 10). Analisando os traços gerados, foi possível diferenciar células móveis ou em *running*, quando o traço representa uma espiral ou uma linha nítida, de células não-móveis ou em *tumbling*, representadas pelas linhas mais trêmulas (Virgile *et al.*, 2018). Os dados qualitativos obtidos reforçam os resultados dos experimentos de capilaridade. Os fenótipos visualizados na estirpe J23114-*qdoR-cheZ* (Figura 10- E, F) são heterogêneos, ou seja, existem células tanto em *running* quanto em *tumbling*. Essa questão de variação na quantidade de células em *running/tumbling* na mesma população é compatível a experimentos anteriores (Kashiwagi *et al.*, 2021) e também se reflete nos dados quantitativos mostrados na seção seguinte. Além disso, na presença de quercetina, a proporção de células em *running* fica discretamente maior, ainda considerando a estirpe cujo circuito é regulado pelo promotor J23114. Por outro lado, para a estirpe J23110-*qdoR-cheZ* (Figura 10- C,D), a motilidade foi homogênea, não havendo células em *running* em nenhuma das condições testadas, o que provavelmente é efeito da maior expressão de *qdoR* seguida da repressão de *cheZ*. Como discutido anteriormente, é provável que isso aconteça devido à complexidade relacionada a via de transdução de sinal da quimiotaxia, de modo que leva um tempo até que a atividade de CheZ seja observada no mecanismo molecular. Quando a expressão de *cheZ* é baixa, essa atividade pode demorar mais ainda.

O plugin TrackMate utilizado também quantifica alguns parâmetros das imagens e os disponibiliza na forma de tabelas. Com isso, para cada vídeo analisado, foram registradas as distâncias percorridas (em μm) de 12 células aleatórias por amostra. Esses dados geraram a figura 11, que reforça a ideia de boa resposta na presença de quercetina da estirpe regulada por J23114, mas também seu alto vazamento na expressão de *cheZ* e motilidade na ausência de quercetina. Apesar disso, foi experimentado a utilização da estirpe BW15113 como um controle positivo, na presença de casaminoácidos e aspartato, um forte quimioatratante (Figura 10-A). Entretanto, essa estirpe não demonstrou células em *running* durante os registros em microscopia, provavelmente indicando que o mecanismo de adaptação da quimiotaxia pelas metilações advindas de CheR, mantiveram as células em *tumbling*. Isso talvez seja uma sugestão de que a motilidade dessa estirpe em um meio líquido contendo uma quantidade estática de nutrientes não traz a necessidade de ativar o fenótipo de *running*, de modo que os MCP's das células estão sempre metilados para evitar que se movam para zonas onde não há nutrientes. Além disso, a expressão de *cheZ* nessa estirpe possui a regulação original, então nessa condição haverá CheY-P

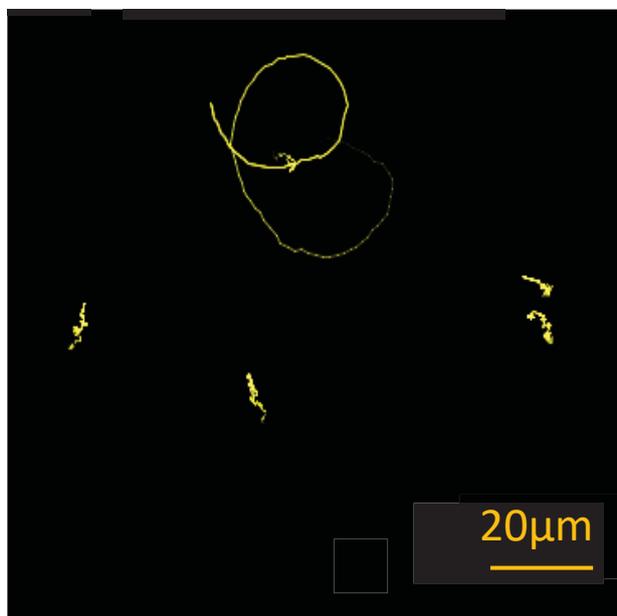
praticamente a todo momento se ligando aos receptores. Provavelmente, o *running* dessa estirpe seria visualizado em uma concentração menor de nutrientes.

Um ponto de vista que merece destaque é em relação ao grande desvio padrão observado nos gráficos quantitativos de *Cell tracking*, e que também podem ser vistos nas imagens qualitativas. Claramente há uma diferença na distância percorrida entre cada célula, principalmente já estirpe J23114-*qdoR-cheZ*, o que provavelmente está ocorrendo devido a variação na expressão de *cheZ* dentro da população de bactérias. Sob alta repressão (Figura 10 – E;F)), quando a expressão de *cheZ* é induzida, muitas moléculas de QdoR ainda podem se ligar aos operadores e bloquear a transcrição de *cheZ*, o que atrasa mais ainda a expressão do fenótipo de *running*. Esse estado inicial altamente reprimido torna a população mais homogênea, assim como visto no trabalho de Kashiwagi *et al.*, (2021). Por outro lado, sob baixa repressão (Figura 10 – C;D), o cenário é inverso; existem poucas moléculas QdoR para reprimir a expressão de *cheZ* no estado não induzido, o que leva ao ruído e a observação de células em *running*. A indução com quercetina aumenta a homogeneidade da população, uma vez que existem moléculas de quercetina suficientes para ligar a maioria das moléculas QdoR (Kashiwagi *et al.*, 2021).

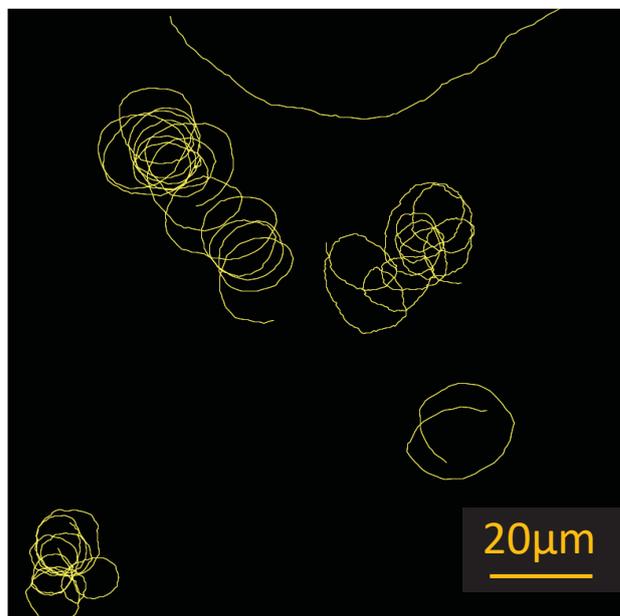


P_{J23114} -*qdoR-cheZ*

C 0 μ M quercetina

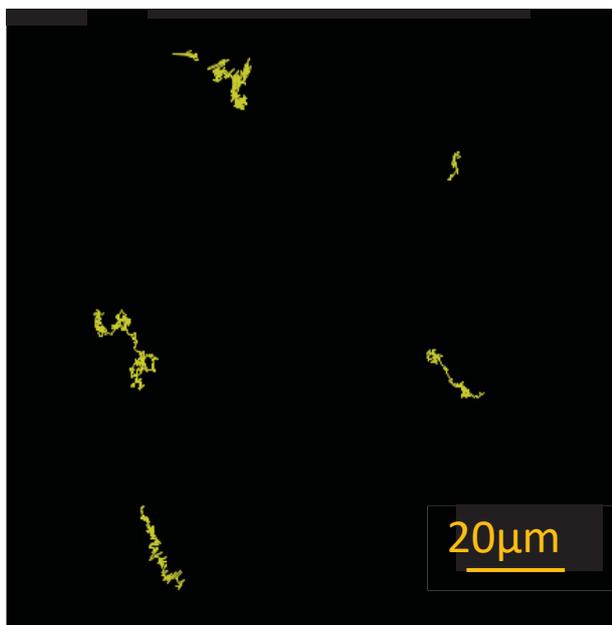


D 100 μ M quercetina



P_{J23110} -*qdoR-cheZ*

E 0 μ M quercetina



F 100 μ M quercetina

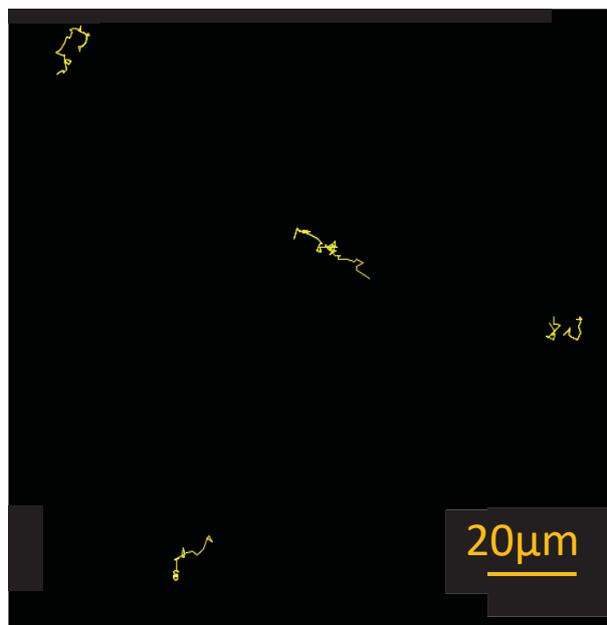


FIGURA 10: *CELL TRACKING* QUALITATIVO DAS ESTIRPES BW25113, BW25113 Δ *cheZ* E DAS ESTIRPES CONSTRUÍDAS NESTE TRABALHO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE 100 μ M DE QUERCETINA.

“Cell tracking” refere-se ao rastreamento de células individuais em vídeos de motilidade bacteriana obtidos por microscopia confocal. Regiões contendo 4 -5 células foram selecionadas aleatoriamente e os traços de suas trajetórias foram obtidos pelo Plugin TrackMate no Software Fiji – ImageJ. As linhas amarelas representam o deslocamento de cada célula ao longo de 100 frames. Linhas contínuas representam células em *running*, enquanto linhas trêmulas e curtas representam *tumbling*.

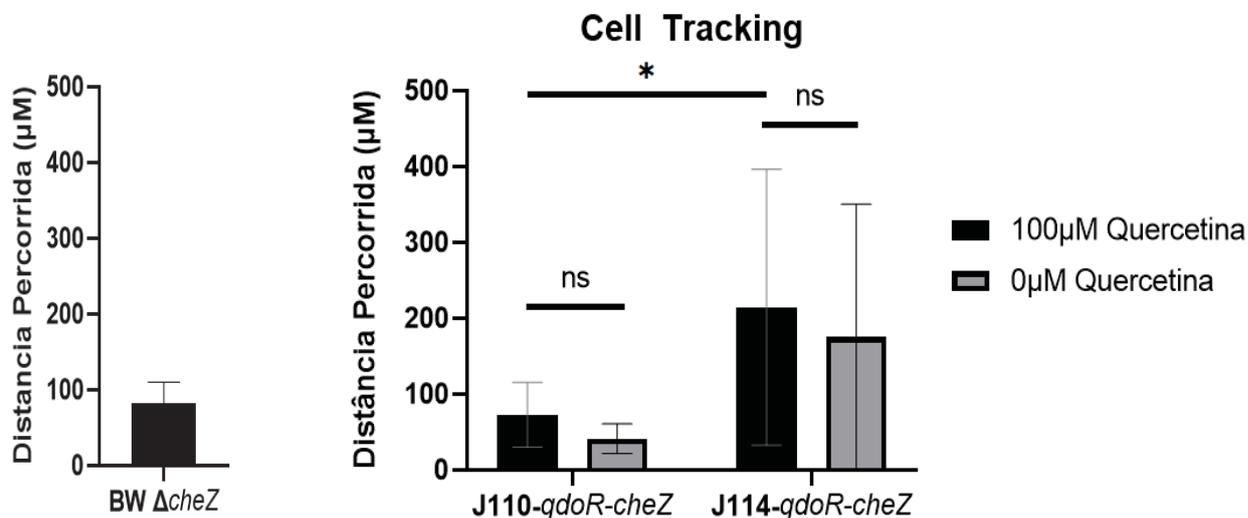


FIGURA 11: CELL TRACKING QUANTITATIVO DAS ESTIRPES CONSTRUÍDAS NESTE TRABALHO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE 100µM DE QUERCETINA.

Dados obtidos através de vídeos de motilidade bacteriana obtidos por microscopia confocal. Por meio do Plugin TrackMate no Software Fiji – ImageJ, os dados de distância percorrida de cada célula presente no vídeo foram planilhados. Para plotar este gráfico, foram selecionadas 12 células aleatórias por amostra (4 por Replicata). Time-Lapse disponível em: https://drive.google.com/file/d/16lAHPw7WzvtLTfEJUza1Gc2QSHsMZg5m/view?usp=drive_link

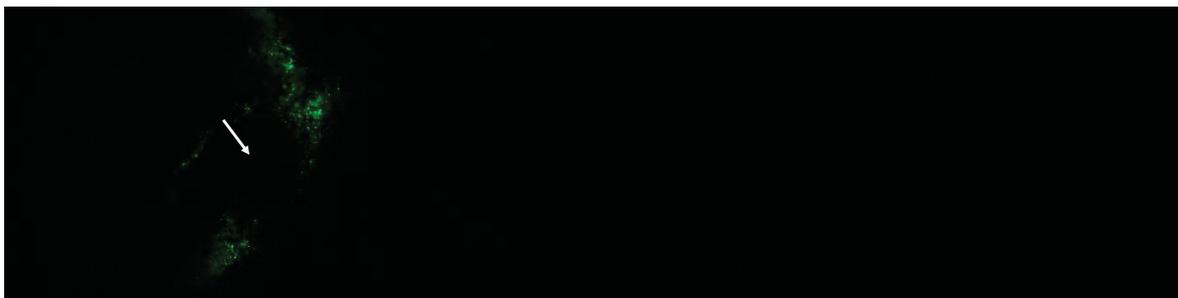
5.3.2 Microscopia confocal em placas de Petri com fundo de vidro

O objetivo deste experimento foi analisar a dinâmica de expansão de células fluorescentes carregando os circuitos construídos, utilizando meio semissólido (Ágar 0,2%) em uma placa adaptada para microscopia confocal. Dito isso, a figura 12 representa a motilidade da estirpe J23114-*qdoR-cheZ* na presença de 100 µM de quercetina, ao longo de 40 horas de obtenção de imagens. As células demonstraram um padrão de deslocamento por aglomerados, pontos verdes de diferentes tamanhos, o que pode ser um indicativo de aumento da concentração do ágar devido a evaporação da água, considerando que a placa e o volume de meio utilizado são pequenos. Observando o time-lapse desse registro (imagens feitas a cada 15 min) é possível notar que esses pontos verdes surgem, crescem de forma independente, e depois se conectam. Ao retirar a placa do microscópio, no fim do experimento, foi notado que o meio estava nitidamente mais

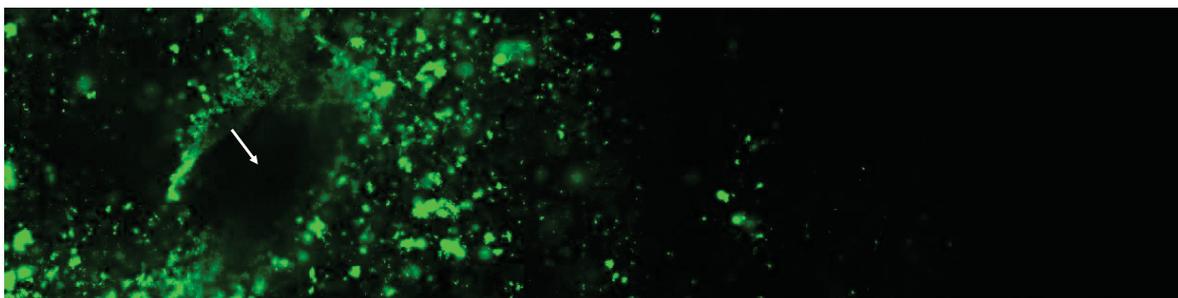
rígido do que um meio semissólido. Dessa forma, é plausível tentar reproduzir este experimento a 30°C, e dessa vez utilizando um inóculo duplo com a estirpe J23110-*qdoR-cheZ* marcada com RFP. Como uma perspectiva futura, isso permitiria analisar a dinâmica da expansão de uma população de células expressando *cheZ* em diferentes níveis.

FIGURA 12: ENSAIO DE MOTILIDADE EM PLACA DE MICROSCOPIA

T= 0 horas



T= 40 horas



CONFOCAL.

Dinâmica de expansão da estirpe BW25113 J23114-*qdoR-cheZ* fluorescente em placa de Petri de fundo de vidro, durante 40 horas a 37°C em meio LB 0,2% contendo 100 µM de quercetina. As setas brancas indicam o mais aproximado do centro da placa, onde foi feito um inóculo de 1 µL de células em DO₆₀₀ 0,2. O final da borda à direita da imagem representa uma distância de 0,5cm a partir do meio. As imagens foram capturadas com objetiva de 20x de aproximação.

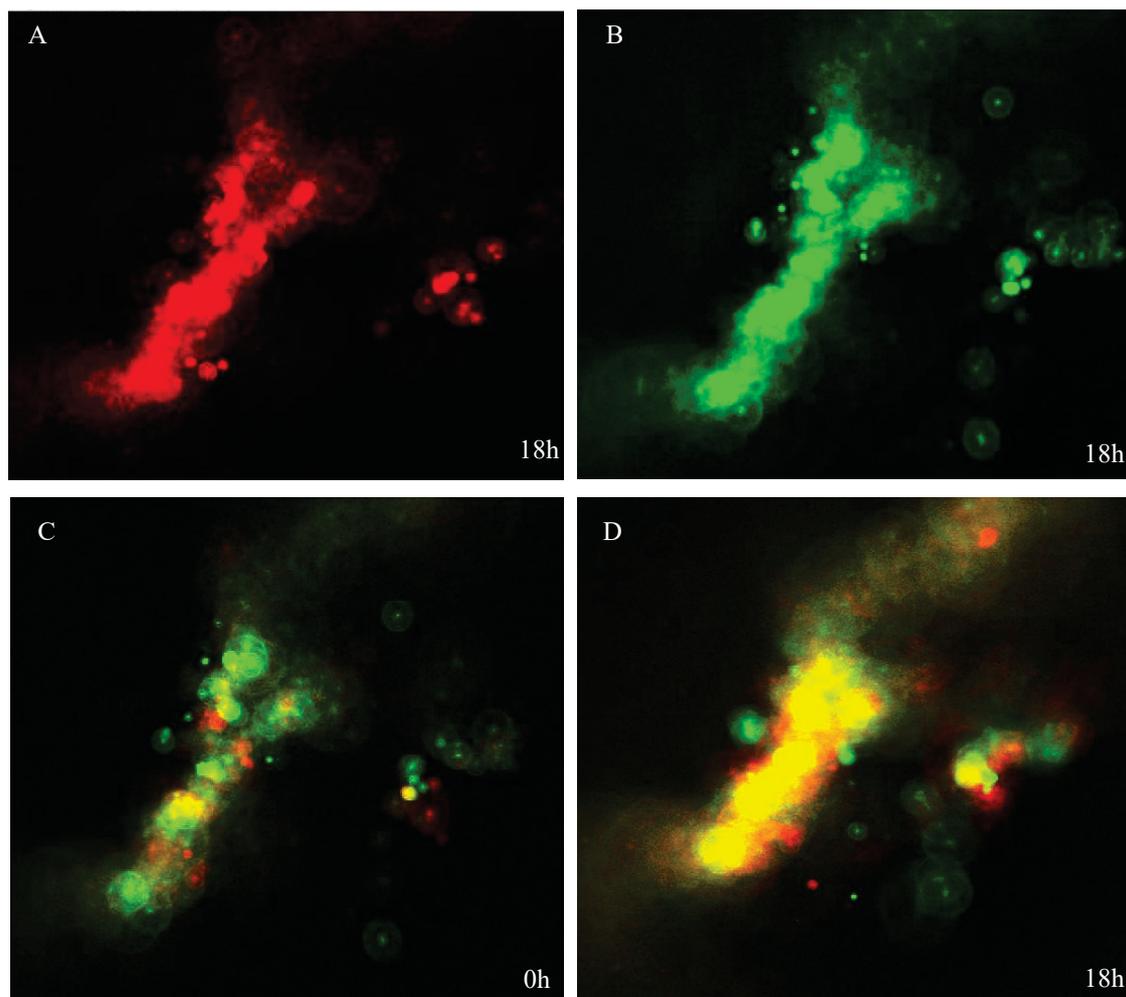


FIGURA 13: ENSAIO DE CO-CULTIVO EM PLACA DE MICROSCOPIA CONFOCAL.

Dinâmica de expansão das estirpes BW25113 $\Delta cheZ$ contendo os circuitos J23114-*qdoR-cheZ* (RFP) e J23110-*qdoR-cheZ* (GFP) inoculadas em proporções iguais em placa de Petri de fundo de vidro durante 18 horas a 37°C, em meio LB 0,2% ágar e com 100 μ M quercetina. No software ImageJ é possível visualizar cada filtro separadamente e conjuntamente, função que gerou essa figura. Todas as imagens representam o mesmo experimento, de modo que (A) mostra apenas a estirpe regulada por J23114 a 18h (no final do experimento), (B) apenas a estirpe regulada pelo promotor J23110 no mesmo tempo, (C) ambas as estirpes com suas respectivas fluorescências ao mesmo tempo no início do experimento, a 0h e (D) ambas as estirpes no final do experimento a 18h. As imagens foram capturadas com objetiva de 20x de aproximação.

A figura 13 contém o último experimento realizado, um co-cultivo das duas estirpes reguladas por circuitos genéticos induzidos por quercetina. É possível observar uma boa proximidade de proporção das duas estirpes entre as figuras A e B. Além disso, nota-se a presença de células individuais no início do experimento que vão perdendo resolução ao longo das 18h, consequência da divisão celular. Isso quer dizer que é necessário um tempo maior de experimento para que seja possível analisar o deslocamento das estirpes, assim como no experimento da Figura 12, que foi feito em um

tempo ideal. Esse segundo experimento, por imprevistos técnicos do microscópio, foi realizado em apenas 18h. Entretanto, esses dados sugerem que a técnica é promissora que pode ser considerada em uma perspectiva futura, se for executada de maneira adequada. Exemplo de adequações seriam cultivos a 30°C para evitar o ressecamento do ágar e eventualmente um gradiente de fonte de carbono em apenas um ponto da placa, com a quercetina em concentração constante. Vale ressaltar também que de acordo com um estudo recente, proteínas codificadas por plasmídeos secundários atenuam a velocidade de natação e o crescimento de *E. coli*, devido ao aumento do fardo metabólico gerado (Virgile *et al.*, 2023). Dessa forma, é viável realizar marcações cromossômicas de RFP nas estirpes deste trabalho, lembrando que de GFP já foi feito.

Para estudar mais adequadamente a dinâmica de bactérias rápidas e lentas na mesma população, ainda é necessário aprimorar os circuitos para extrapolar alguma hipótese a respeito. Por enquanto, o que se pode explorar é o contexto de aprimoramento do sistema de expressão de *cheZ* na estirpe J23114-*qdoR-cheZ*, controlando seu vazamento. Existem diferentes formas de se fazer isso, como por exemplo adicionando um segundo nível de regulação, um nível traducional utilizando sRNA por exemplo (Caron *et al.*, 2012).

No design do circuito ainda existem alternativas que podem melhorar a regulação e expressão do *output*, como por exemplo o sentido das sequências de DNA (Martins, 2011). Os circuitos apresentados aqui possuem o repressor *qdoR* em um sentido e o gene *cheZ* em outro, o que é chamado sistema divergente. Entretanto, sistemas convergentes podem ser viáveis também. Adicionar RBS e terminador de transcrição mais eficientes também seria uma indicação plausível (Wang *et al.*, 2023). Por fim, existe um sistema de regulação da expressão gênica mediado por flavonoides que parece tão versátil quanto o sistema QdoR. Trata-se do sistema FdeR, original de *Herbaspirillum seropedicae*, porém é responsivo a naringenina e se baseia no ativador de transcrição *fdeR* (Kashiwagi *et al.*, 2024).

Uma possível aplicação dos circuitos construídos neste trabalho seria para o melhor entendimento da dinâmica de bactérias colonizando seus hospedeiros. Seria possível entender se a quimiotaxia guiada por quercetina confere uma vantagem para as bactérias que respondem rapidamente ao flavonoide, em relação as que respondem lentamente. Além disso, também seria possível verificar se as bactérias rápidas podem

estabelecer relações harmônicas com bactérias lentas ou não-móveis durante esse processo de colonização, e assim essa quimiotaxia não seria específica apenas para a estirpe que responde rápido ao atrator.

6. CONCLUSÃO

A estirpe $\Delta cheZ$ teve sua motilidade restaurada após a inserção do gene *cheZ* no circuito genético regulado pelo promotor J23114, que permite maior expressão circuitos construídos neste trabalho. O promotor J23110, por outro lado, demonstrou alta repressão nas condições testadas e não houve migração significativa de *cheZ* nos circuitos regulados por esse promotor, para todas as técnicas testadas com excessão de capilaridade por contagem de UFC.

A presença de 100 μM de quercetina foi suficiente para que a estirpe regulada pelo promotor J23114 apresentasse maior taxa de migração em relação às estirpes BW25113 (WT) e $\Delta cheZ$, na maioria das metodologias testadas. Apesar da expressão basal de *cheZ* na ausência do indutor, bactérias carregando essa construção tiveram sua taxa de pseudoaxia aumentada após a adição de quercetina.

Os experimentos de capilaridade em meio líquido e de *cell tracking* se mostraram sensíveis na detecção do fenótipo *swimming*, em relação à técnica de meio semissólido, pois captam dados de células individuais dentro de uma população. Com os resultados dessas técnicas, é possível concluir que o promotor J23114 é de fato ruidoso, devido a heterogeneidade de fenótipos visualizados na mesma população, principalmente após adição de quercetina. Já o promotor J23110 gera uma população mais homogênea com menor ruído que, no geral, não demonstrou alteração após adição de quercetina

Os ensaios de microscopia confocal em placa de Petri de fundo de vidro se mostraram visualmente promissores para analisar um co-cultivo entre bactérias rápidas e lentas. Entretanto, ainda é necessário otimizar os circuitos utilizados, principalmente reduzindo sua taxa de vazamento, para que a dinâmica entre bactérias rápidas e lentas possa ser estudada mais a fundo, para que essa análise seja feita de forma mais confiável.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADIEVA, M. M. *et al.* Strain specific motility patterns and surface adhesion of virulent and probiotic *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

ADLER, Julius. Chemotaxis in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 341-356, 1975.

AHEMAD, Munees; KHAN, Mohammad Saghir. Pesticides as antagonists of rhizobia and the legume-Rhizobium symbiosis: a paradigmatic and mechanistic outlook. **Biochem Mole Biol**, v. 1, p. 63-75, 2013.

AHUJA, Ishita; KISSEN, Ralph; BONES, Atle M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.

ALEXANDER, Roger P.; ZHULIN, Igor B. Evolutionary genomics reveals conserved structural determinants of signaling and adaptation in microbial chemoreceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 8, p. 2885-2890, 2007.

ALON, Uri *et al.* Robustness in bacterial chemotaxis. **Nature**, v. 397, n. 6715, p. 168-171, 1999.

ALTSCHULER, Steven J.; WU, Lani F. Cellular heterogeneity: do differences make a difference?. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 559-563, 2010.

BABA, Tomoya *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Molecular systems biology**, v. 2, n. 1, p. 2006.0008, 2006.

BERG, Howard C. Motile behavior of bacteria. **Physics today**, v. 53, n. 1, p. 24-29, 2000.

BLOXHAM, Blox; LEE, Hyunseok; GORE, Jeff. Repulsion from slow-diffusing nutrients improves chemotaxis towards moving sources. **bioRxiv**, p. 2024.01. 25.577248, 2024.

BRITO, Raquel *et al.* **Standardization of the safety level of the use of DMSO in viability assays in bacterial cells.** 2017.

CARON, Marie-Pier *et al.* Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. E3444-E3453, 2012.

CESCO, S. *et al.* Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 2, p. 123-149, 2012.

COMPTON, K. Karl *et al.* An updated perspective on *Sinorhizobium meliloti* chemotaxis to alfalfa flavonoids. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 581482, 2020.

CERONI, Francesca *et al.* Quantifying cellular capacity identifies gene expression designs with reduced burden. **Nature methods**, v. 12, n. 5, p. 415-418, 2015.

CREMER, Jonas *et al.* Chemotaxis as a navigation strategy to boost range expansion. **Nature**, v. 575, n. 7784, p. 658-663, 2019.

DARIAS, José Antonio Reyes *et al.* Qualitative and quantitative assays for flagellum-mediated chemotaxis. **Pseudomonas Methods and Protocols**, p. 87-97, 2014.

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

DE PAEPE, Brecht *et al.* Modularization and response curve engineering of a naringenin responsive transcriptional biosensor. **ACS synthetic biology**, v. 7, n. 5, p. 1303-1314, 2018.

DEL VALLE, Ilene *et al.* Soil organic matter attenuates the efficacy of flavonoid-based plant-microbe communication. **Science advances**, v. 6, n. 5, p. eaax8254, 2020.

EDGINGTON, Matthew P.; TINDALL, Marcus J. Mathematical analysis of the *Escherichia coli* chemotaxis signalling pathway. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 80, n. 4, p. 758-787, 2018.

FENG, Haichao *et al.* Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: The first step towards root–microbe rhizosphere interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6655, 2021.

GARCÍA-FONTANA, Cristina *et al.* High specificity in CheR methyltransferase function: CheR2 of *Pseudomonas putida* is essential for chemotaxis, whereas CheR1 is involved in biofilm formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 18987-18999, 2013.

GÓMEZ-GÓMEZ, José-María *et al.* A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. **BMC biology**, v. 5, p. 1-15, 2007.

GRENIER, Frédéric *et al.* Complete genome sequence of *Escherichia coli* BW25113. **Genome announcements**, v. 2, n. 5, p. e01038-14, 2014.

HA, Dae-Gon; KUCHMA, Sherry L.; O'TOOLE, George A. Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Pseudomonas methods and protocols**, p. 59-65, 2014.

HALDIMANN, Andreas; WANNER, Barry L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6384-6393, 2001.

HASKETT, Timothy L. *et al.* Rhizopine biosensors for plant-dependent control of bacterial gene expression. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 383-396, 2023.

HAZELBAUER, Gerald L.; FALKE, Joseph J.; PARKINSON, John S. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. **Trends in biochemical sciences**, v. 33, n. 1, p. 9-19, 2008.

HIROOKA, Kazutake *et al.* Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *yxaGH* operons and *yxaF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxaF, in response to flavonoids. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5170-5182, 2007.

HIROOKA, Kazutake. Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion. **Bioscience, biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 9, p. 1471-1484, 2014.

HUO, Haiyan *et al.* Swimming *Escherichia coli* cells explore the environment by Lévy walk. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 6, p. e02429-20, 2021.

JONES, Kristala L.; KIM, Seon-Won; KEASLING, J. D. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. **Metabolic engineering**, v. 2, n. 4, p. 328-338, 2000.

KANUNGPEAN, Doungjit; KAKUDA, Tsutomu; TAKAI, Shinji. Participation of CheR and CheB in the chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1279-1289, 2011.

KASHIWAGI, Fernanda Miyuki *et al.* Control of Gene Expression With Quercetin-Responsive Modular Circuits. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, p. 802, 2021.

KASHIWAGI, Fernanda Miyuki *et al.* The naringenin-dependent regulator FdeR can be applied as a NIMPLY gate controlled by naringenin and arabinose. **Synthetic Biology**, p. ysae001, 2024.

KEARNS, Daniel B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634-644, 2010.

KIDD, P. S. *et al.* The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 359, p. 1339-1352, 2001.

KIM, Seong Gyeong *et al.* Molecular parts and genetic circuits for metabolic engineering of microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 17, p. fny187, 2018.

KUMAR, Pankaj et al. Effect of Quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 3, p. 127-134, 2003.

LONG, Zhicheng *et al.* Cell-cell communication enhances bacterial chemotaxis toward external attractants. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12855, 2017.

LÓPEZ, Emilia Díaz *et al.* Chemotaxis in *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Evaluation by the two-chamber capillary assay. **MethodsX**, v. 8, p. 101223, 2021.

MARTINS, Leonardo Pedro Donas-Boto de Vilhena. **Stochastic model of transcription initiation of closely spaced promoters in *Escherichia coli***. 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

MCKAY, Ryan *et al.* Controlling localization of *Escherichia coli* populations using a two-part synthetic motility circuit: An accelerator and brake. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 12, p. 2883-2895, 2017.

MCKAY, Ryan et al. A platform of genetically engineered bacteria as vehicles for localized delivery of therapeutics: Toward applications for Crohn's disease. **Bioengineering & translational medicine**, v. 3, n. 3, p. 209-221, 2018.

MI, Hongfei et al. Dimethyl sulfoxide protects *Escherichia coli* from rapid antimicrobial-mediated killing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5054-5058, 2016.

MIERZIAK, Justyna; KOSTYN, Kamil; KULMA, Anna. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240-16265, 2014.

MOREIRA, Andrea J. et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF- κ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 10, p. 1939-1946, 2004.

NARASIMHAN, Kothandaraman *et al.* Enhancement of plant-microbe interactions using

a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 146-153, 2003.

NØRHOLM, Morten HH. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC biotechnology**, v. 10, p. 1-7, 2010.

O'NEAL, Lindsey; MUKHERJEE, Tanmoy; ALEXANDRE, Gladys. Analyzing chemotaxis and related behaviors of *Azospirillum brasilense*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 3E. 3.1-3E. 3.11, 2018.

PADRON, Gustavo A. **Effect of surfactants on drop size distributions in a batch, rotor-stator mixer**. 2004. Tese de Doutorado.

PARALES, Rebecca E.; HARWOOD, Caroline S. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 266-273, 2002.

PARKINSON, JOHN S.; HOUTS, SUSAN E. Isolation and behavior of *Escherichia coli* deletion mutants lacking chemotaxis functions. **Journal of bacteriology**, v. 151, n. 1, p. 106-113, 1982.

PINI, Francesco *et al.* Bacterial biosensors for in vivo spatiotemporal mapping of root secretion. **Plant Physiology**, v. 174, n. 3, p. 1289-1306, 2017.

POOLE, Philip. Shining a light on the dark world of plant root–microbe interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, p. 4281-4283, 2017.

REBBAPRAGADA, Anuradha *et al.* The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 20, p. 10541-10546, 1997.

POOLE, Philip. Shining a light on the dark world of plant root–microbe interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, p. 4281-4283, 2017.

RAVICHANDAR, Jayamary Divya *et al.* Transcriptional control of motility enables directional movement of *Escherichia coli* in a signal gradient. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHINDELIN, Johannes *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.,

SHETTY, Reshma P.; ENDY, Drew; KNIGHT, Thomas F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of biological engineering**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2008.

SIEDLER, Solvej *et al.* Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into *Escherichia coli*. **Metabolic engineering**, v. 21, p. 2-8, 2014.

TOPP, Shana; GALLIVAN, Justin P. Guiding bacteria with small molecules and RNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 21, p. 6807-6811, 2007.

VIRGILE, Chelsea *et al.* Engineering bacterial motility towards hydrogen-peroxide. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0196999, 2018.

VIRGILE, Chelsea *et al.* Plasmid-encoded protein attenuates *Escherichia coli* swimming velocity and cell growth, not reprogrammed regulatory functions. **Biotechnology progress**, v. 35, n. 3, p. e2778, 2019.

WADHWA, Navish; BERG, Howard C. Bacterial motility: machinery and mechanisms. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 3, p. 161-173, 2022.

WANG, Xin-Ge *et al.* Construction of an Engineered *Escherichia coli* with Efficient Chemotactic and Metabolizing Ability toward Tetrathionate. **ACS Synthetic Biology**, v. 12, n. 11, p. 3414-3423, 2023.

WEBB, Benjamin A.; ARAPOV, Timofey D.; SCHARF, Birgit E. Quantification of bacterial chemotaxis responses at the mouths of hydrogel capillaries. In: *Bacterial Chemosensing*. **Humana Press, New York, NY**, 2018. p. 33-45.

XIA, Peng-Fei *et al.* Synthetic genetic circuits for programmable biological functionalities. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107393, 2019.

YANG, Yiling *et al.* Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. **Molecular microbiology**, v. 96, n. 6, p. 1272-1282, 2015.