

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Comunicação inter-específica e o seu efeito na
taxa de mutação**

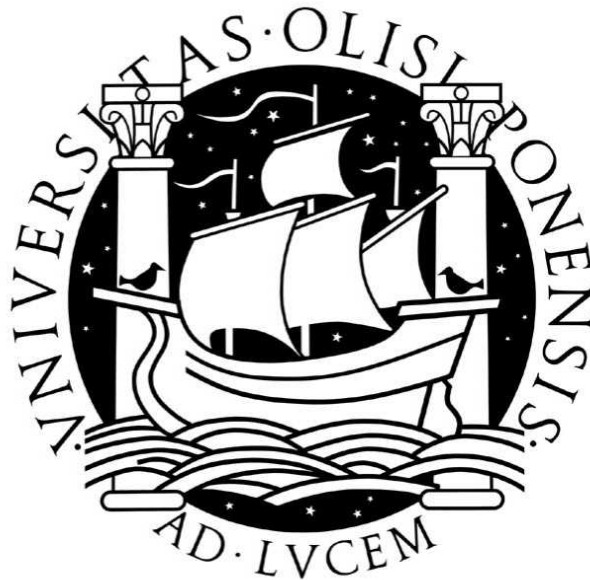
Bruno Alexandre Caetano Afonso

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Comunicação inter-específica e o seu efeito na
taxa de mutação**

Bruno Alexandre Caetano Afonso

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Orientadores:
Doutora Karina Xavier
Doutor Francisco Dionísio

2009

Aos meus pais

“Parece-me que o mundo natural é a maior fonte de excitação, a maior fonte de beleza visual, a maior fonte de interesse intelectual. É a maior fonte de tanto na vida que faz valer a pena viver.”

Sir David Attenborough

Índice

Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas.....	vii
Resumo	viii
Abstract.....	ix
Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. O custo de genes regulatórios do operão regulado por LuxS (<i>l_{sr}</i>) em <i>Escherichia coli</i>	5
Introdução.....	5
Material e métodos	6
Resultados e Discussão.....	7
Capítulo 3. O efeito da comunicação inter-específica na taxa de mutação em <i>Escherichia coli</i> abordado por testes de flutuação clássicos	10
Introdução.....	10
Materiais e Métodos	12
Resultados e discussão	14
Capítulo 4. Utilização do protocolo de Jones/Gerrish na estimação de taxas de mutação em <i>Escherichia coli</i>	19
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	21
Capítulo 5. Considerações finais	24
Referências	26
Anexos.....	30

Agradecimentos

Esta tese tem muito das pessoas que me acompanharam neste período e às quais quero muito agradecer.

Desde já, à minha orientadora interna, Doutora Karina Xavier, pela dedicação, pela imensa paciência ao longo deste ano de trabalho e por todas as vezes que leu esta tese; a sua marca está aqui bem presente. Ao meu orientador interno, Doutor Francisco Dionísio, pela disponibilidade conseguida na discussão dos resultados deste trabalho. À Doutora Isabel Gordo, pela colaboração e extensa contribuição que deu em sugestões e aconselhamento.

Ao António Santos, que tão bem me recebeu no laboratório e pela ajuda incansável nos primeiros passos; ganhei com ele também uma boa amizade, regada a espaços com massacres musicais ao som de Interpol. Ao João Marques, pelo legado que me deixou e pelas longas horas dispensadas a transmitir-mo, nas quais se incluem a adaptação do estimador clássico de máxima verosimilhança da taxa de mutação em MATLAB e todas as vezes que lidou com os meus dados em MATLAB ou até mesmo em placas de Petri. Ao Doutor Philip Gerrish, pelo estimador modificado de máxima verosimilhança e pela ajuda na análise dos meus resultados com o seu algoritmo. Ao Doutor Paul Sniegowski e ao Doutor François Taddei, por esclarecimentos importantes quanto a estimação de taxas de mutação. À Sandra Trindade, que mesmo depois das minhas chacinas psicológicas ainda me esclareceu dúvidas importantes. À “Dona Isabel”, que muitas placas de LB fez para mim e arranjava sempre tempo para as fazer mesmo quando algumas vezes lhas pedia à última da hora. À Catarina Pereira, pelo auxílio que sempre me prestou em todas as fases deste trabalho, pela conversa fiada na sala de estudantes enquanto escrevia esta tese e por ser detestável de tão adorável; dela guardo uma lastimável amizade.

À Inês Fragata, por acreditar no meu trabalho e por ter revisto exaustivamente a redacção desta tese; a sua marca nesta tese é considerável. À Ângela Crespo, pelo contributo inestimável que deu à minha vida. Ao Ricardo Martins, por acreditar em mim quase incondicionalmente. À minha grande família, com destaque para os meus avós maternos, por sempre me ter incentivado a trilhar o meu caminho profissional. À minha irmã, por ser ainda mais chata do que eu. Aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim até hoje; para com eles estarei sempre em dívida.

Lista de Figuras

Figura 1 – A via metabólica que leva à formação do autoindutor-2 (AI-2).	2
Figura 2 – Modos conhecidos de resposta ao autoindutor-2.	3
Figura 3 – A actividade de AI-2 no meio extracelular numa cultura de <i>Escherichia coli</i> de genótipo selvagem.	4
Figura 4 – Coeficientes de selecção de estirpes mutantes em genes envolvidos na regulação do operão <i>lsr</i> , por cada geração.	9
Figura 5 – Testes de Luria-Delbrück preliminares.	11
Figura 6 – Electroforese após PCR que confirma a deleção do gene <i>rbsD</i> no respectivo mutante obtido.	15
Figura 7 – Perfil de acumulação extracelular de AI-2 nas estirpes em análise.	16
Figura 8 – Taxas de mutação estimadas em dois ensaios independentes nas estirpes selvagem (WT), mutantes em <i>luxS</i> ($\Delta luxS$) e em <i>rbsD</i> ($\Delta rbsD$).	16
Figura 9 – Perfil de acumulação extracelular de AI-2 nas estirpes com plasmídios.	18
Figura 10 – Comparação, por Gerrish (2008), das funções de verosimilhança obtidas a partir do protocolo modificado e as obtidas pelo protocolo clássico.	20
Figura 11 – Taxas de mutação estimadas pelo algoritmo de Gerrish.	22

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estirpes utilizadas neste trabalho.	6
Tabela 2 – Estirpes de <i>Escherichia coli</i> K-12 utilizadas neste estudo.	12

Resumo

As bactérias são capazes de sinalizar entre diferentes espécies pela produção e libertação de um sinal de comunicação inter-específica, o autoindutor-2 (AI-2). No entanto, a função deste sistema conhece-se em poucas espécies. Em *Escherichia coli*, a produção de AI-2 activa a expressão do operão *lsr*, o qual regula a internalização e processamento do sinal. Nenhuma outra função é conhecida para o AI-2 nesta espécie. Foi demonstrado anteriormente que a *E. coli* remove o AI-2 do meio ambiente, sendo assim capaz de interferir no ciclo de virulência de *Vibrio cholerae*. Porém, o benefício do sistema do AI-2 em *E. coli* nunca foi quantificado. Neste trabalho, os custos da ausência de AI-2 e de genes fundamentais do operão *lsr* nesta espécie foram determinados *in vitro* por ensaios de competição e tais custos, embora baixos, são significativos, o que sugere que em *E. coli* este sistema confere um benefício.

Nesta espécie, a internalização e o processamento do AI-2 pelo sistema *lsr* leva à produção do composto mutagénico metilglioal, o que levou à hipótese de o AI-2 aumentar a taxa de mutação. A confirmar-se, o AI-2 poderia ser fulcral no potencial adaptativo de populações da espécie ao ambiente, ao aumentar a variabilidade genética por mutação. Tal hipótese foi apoiada por dados preliminares que mostravam que a estirpe selvagem tinha uma taxa de mutação três vezes superior à das estirpes mutantes no sistema do AI-2. Porém, a hipótese foi aqui testada com testes de flutuação e foi rejeitada. Foi também utilizado o método de Jones, optimizado por Gerrish, que permitiria o uso de um algoritmo alegadamente mais preciso de estimação da taxa de mutação, mas as estimações assim obtidas não foram suficientemente robustas para uma resposta conclusiva. Mesmo assim, pode-se concluir que o AI-2 dificilmente pode aumentar a taxa de mutação em *E. coli*.

Expressões-chave: *Escherichia coli*; autoindutor-2; operão *lsr*; taxa de mutação; testes de flutuação.

Abstract

Bacteria are capable of signalling between different species by production and release of an inter-species communication signal called autoinducer-2 (AI-2). Yet, the function of this system is only known in very few species. In *Escherichia coli*, AI-2 production activates the expression of the *lsr* operon, which regulates AI-2 uptake and processing. No functions other than these are known for AI-2 in this species. Previously, it was shown that *E. coli* removes AI-2 from the environment and hence interferes with the virulence cycle of *Vibrio cholerae*. However, the benefit of the AI-2 system in *E. coli* had never been quantified. Here, the costs of the absence of AI-2 and of fundamental genes of the *lsr* system were determined in this species by competition assays *in vitro* and those costs were found to be low, but significant, suggesting that *E. coli* gains benefits from this system.

In this species, AI-2 internalization and processing via the Lsr system leads to the production of the mutagenic compound methylglyoxal. This has led to the hypothesis that AI-2 could increase mutation rate. If so, AI-2 could be of paramount importance on adaptive potential of populations of the species, increasing genetic variation by mutation. This hypothesis was supported by preliminary data showing that the wild-type strain had a mutation rate three-fold higher than mutants in AI-2 system. Yet, this hypothesis was tested here using fluctuation tests and it was rejected. The Jones method optimized by Gerrish was also tested, which should have implied the use of a more precise mutation rate estimation algorithm. Unfortunately, with this method the mutation rate estimations were not robust enough to effectively re-test the hypothesis. Even though, we can conclude that AI-2 can hardly affect mutation rate in *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*; autoinducer-2; *lsr* operon; mutation rate; fluctuation tests.

Capítulo 1. Introdução

As bactérias são reconhecidas como uma das formas de vida mais simples que povoam o nosso planeta, não só por serem unicelulares, mas também por serem formas de vida de dimensões muito reduzidas. Por este motivo, foram vistas como seres puramente individualistas e incapazes de comunicar entre si. No entanto, sabe-se hoje que as bactérias comunicam entre si libertando e detectando sinais químicos, com os quais medem a densidade populacional e respondem fisiologicamente de acordo com esta. Este processo denomina-se detecção de quórum e, para além de ser considerado um processo comum à generalidade das bactérias (5), também ocorre em fungos (49), em rotíferos (28) e até em insectos sociais (29), sendo natural a possibilidade de os processos dependentes da densidade populacional terem uma origem antiga e comum.

Quando uma população bacteriana aumenta, a concentração de sinal no meio aumenta proporcionalmente até o quórum ser atingido, ou seja, até a população atingir uma densidade suficiente e a concentração de sinal atingir um valor crítico acima do qual se desencadeia uma alteração drástica da expressão génica em todos os indivíduos da população. Nesta fase, ocorrem alterações na transcrição de genes que regulam processos como a esporulação, a secreção de factores de virulência, a competência, a bioluminescência e a formação de biofilmes (5, 49), consoante a espécie. Os processos regulados por detecção de quórum só são produtivos quando iniciados por um colectivo, ou seja, um quórum. Este quórum permite às bactérias funcionarem quase como um organismo multicelular, obtendo benefícios que nunca obteriam isoladamente.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem sinais de natureza química muito diferente para comunicação entre indivíduos da mesma espécie (comunicação intra-específica): as primeiras secretam oligopéptidos, por vezes modificados com grupos tiolactona, e as segundas secretam lactonas de homoserina (55). Em ambos os casos, estes sinais são diferentes consoante a espécie e a sua detecção por indivíduos de espécies diferentes é rara (5).

Por outro lado, as bactérias são também capazes de comunicar entre diferentes espécies através de um sinal que se crê como universal no domínio procariota (45). Este sinal denomina-se autoindutor-2 (AI-2) e regula a expressão génica de várias espécies de bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas (59). Deste modo, uma espécie bacteriana é capaz de interferir no perfil de expressão génica de outra manipulando a concentração de AI-2 no meio ambiente (58). O autoindutor-2 é uma dihidroxipentanediona cíclica, um composto com cinco átomos de carbono e que tem uma estrutura algo semelhante à de uma pentose. O AI-2 é produzido a partir da enzima S-ribosil-homocisteína liase (LuxS), codificada pelo gene *luxS*, e resulta da fracção ribosídica da S-ribosil-homocisteína (SRH) após a acção da enzima. A SRH, por sua vez, é um produto secundário da transferência de grupos metilo tendo a S-adenosil-L-metionina (SAM) como dadora (Figura 1) (45, 57).

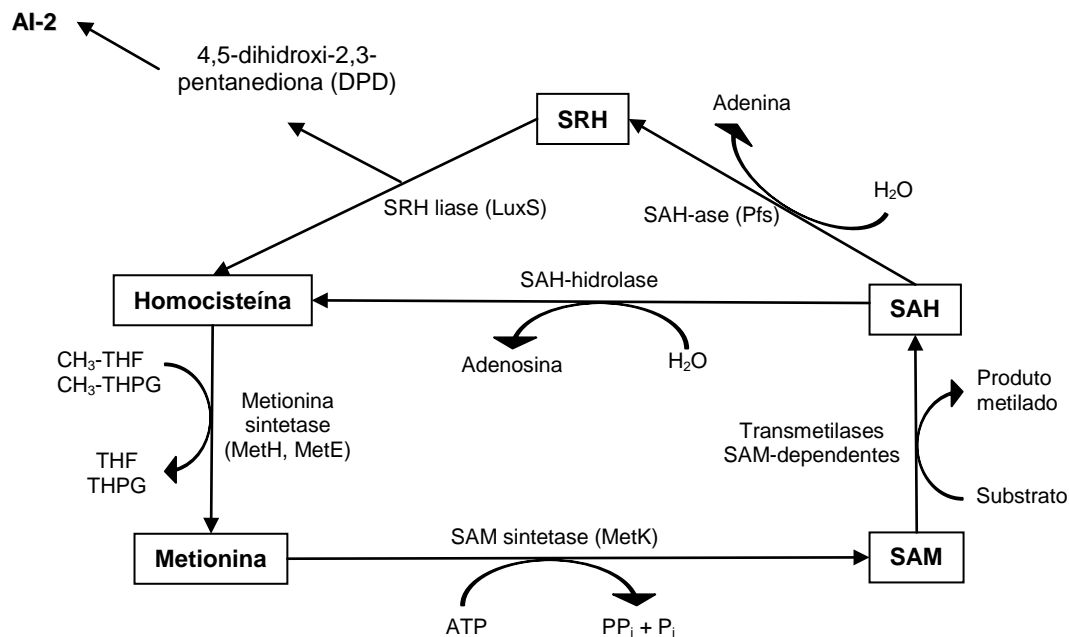


Figura 1 – A via metabólica que leva à formação do autoindutor-2 (AI-2). A S-adenosilmetionina (SAM), quando transfere um grupo metilo para um determinado metabolito (produto metilado), dá origem a S-adenosilhomocisteína (SRH), que depois sofre uma hidrólise catalisada pela S-adenosilhomocisteinase (SAH-ase ou Pfs) e origina S-ribosilhomocisteína (SRH). Este composto é o substrato da enzima S-ribosilhomocisteína liase (LuxS), que origina homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona, a qual se cicliza espontaneamente em AI-2. [Imagem adaptada da referência (57).]

A sinalização mediada pelo AI-2 tem sido estudada sobretudo em Gram-negativas, com destaque para as vibriónicas como *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* e *Vibrio cholerae* e para as enterobacteriáceas como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Nas Vibriónicas, o AI-2 é detectado pelo receptor LuxP, o que leva à activação de outra proteína, LuxQ, que deixa de funcionar como uma cinase e passa a fosfatase quando o quórum é atingido. Nessa altura, ocorre desfosforilação de um conjunto de proteínas de forma sucessiva, o que contribui para a estabilização do RNA mensageiro do factor de transcrição LuxR, que actua em genes alvo. Nas enterobacteriáceas, por seu turno, existe um operão activado pelo AI-2 – operão *lsr* (do inglês *LuxS-regulated*) – e as proteínas que este codifica parecem estar envolvidas na detecção, regulação da concentração do sinal e na sua modificação por fosforilação. O AI-2 é detectado por ligação à proteína periplasmática LsrB, sendo depois internalizado por um transportador ABC (codificado também pelo operão *lsr*) e fosforilado pela enzima LsrK. É a forma fosforilada que se mantém no interior da célula e afecta genes alvo (Figura 2) (51, 54). Os receptores LsrB das enterobacteriáceas e LuxP das vibriónicas, apesar de partilharem semelhanças estruturais, são pouco semelhantes a nível genético, pois os genes que os codificam os respectivos receptores se assemelham em apenas 11% (38) e os locais de ligação do AI-2, tendo em conta a estrutura de cada receptor, são bastante diferentes (34).

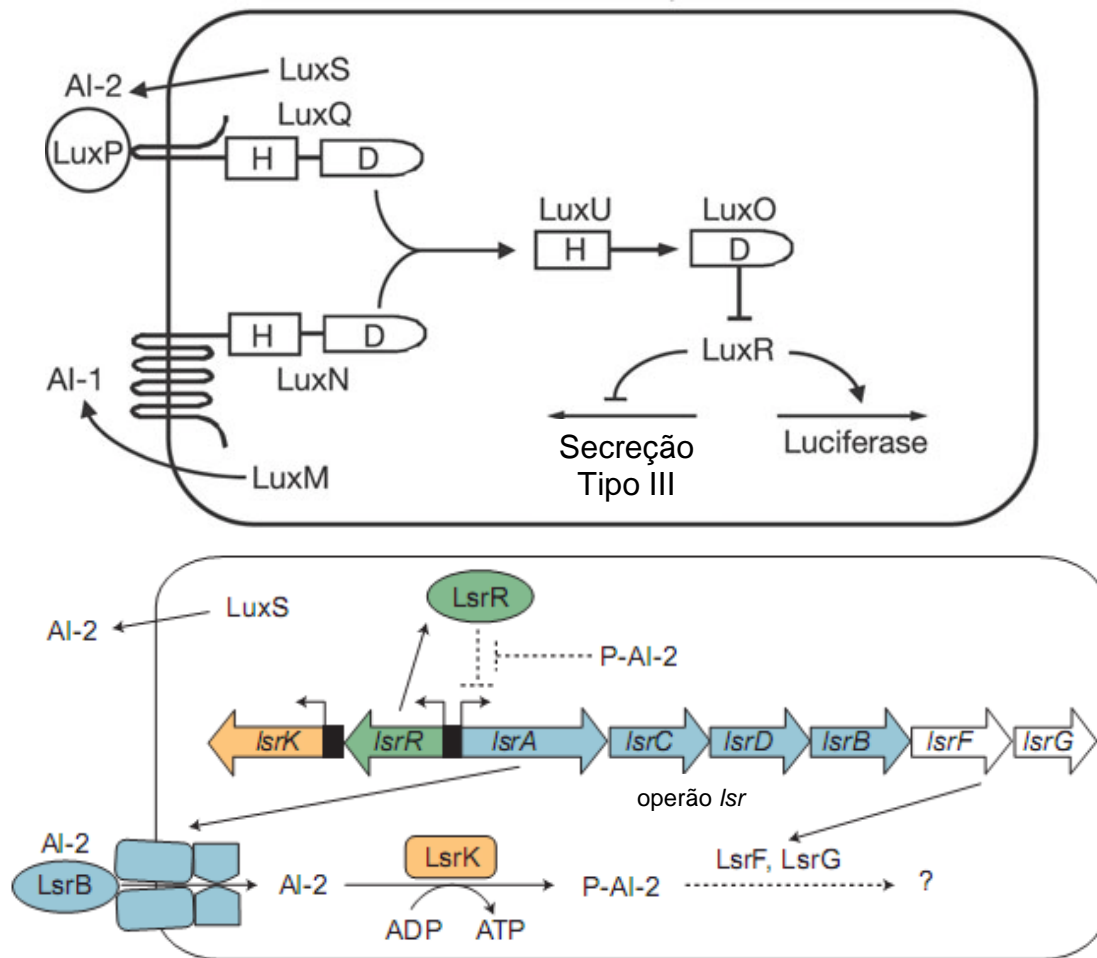


Figura 2 – Modos conhecidos de resposta ao autoindutor-2. O limite rectangular representa o espaço citosólico, sendo a linha a membrana plasmática. No citoplasma, a enzima LuxS converte a S-ribosilhomocisteína (SRH) em 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD), que se cicliza em AI-2. Nas Vibrionáceas (em cima), o AI-2 é detectado pela proteína periplasmática LuxP. Esta interage com LuxQ e induz uma alteração conformacional que lhe confere uma actividade de fosfatase quando a concentração de AI-2 está acima do valor crítico que define o quórum. Esta fosforilação retira um grupo fosfato da LuxU que, por sua vez, desfosforila o regulador de resposta LuxO, inactivando-o. Em contrapartida, a baixa densidade populacional, todas estas proteínas LuxO, LuxU e LuxQ actuam como cinases e LuxO é fosforilado. O LuxO fosforilado é um activador transcripcional que de uma forma indirecta reprime a expressão do activador transcripcional LuxR (HapR em *Vibrio cholerae*), destabilizando-o (55). Em suma, LuxR é reprimido a baixa densidade populacional. Quando o quórum é atingido, LuxO é inactivado e permite a estabilização do mRNA de *luxR*, o qual vai interagir com genes alvo. A via de sinalização do AI-2 converge com a via de sinalização intra-específica (do AI-1). Nas enterobacteriáceas (em baixo), o AI-2 liga-se à proteína LsrB no periplasma e é internalizada por um transportador acoplado a uma ATPase (transportador ABC), composto pelas proteínas LsrA, LsrC e LsrD. Estas duas últimas formam um canal heterodimérico e LsrA é a presumível ATPase (52). Depois de entrar na célula, o AI-2 é fosforilado pela cinase LsrK. O AI-2-fosfato activa a expressão do operão *lsr* por inibição do repressor LsrR. Pensa-se que o AI-2-fosfato é degradado com envolvimento das proteínas LsrF e LsrG. [Imagens adaptadas das referências (58, 60).]

Ao contrário do que acontece com a comunicação intra-específica, em que sabe que a sinalização promove processos a nível de grupo como a bioluminescência em *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi* (55), a produção de factores de virulência e de biofilmes em *Vibrio cholerae* (63) ou a esporulação e a competência na Gram-positiva *Bacillus subtilis* (55), ainda se sabe pouco sobre o efeito do AI-2 na generalidade das bactérias e as vias de sinalização em que este está envolvido. Por um lado, o efeito do AI-2 nas

vibrionáceas parece similar ao efeito das moléculas de sinalização intra-específica, uma vez que as vias de sinalização do AI-2 e destas moléculas convergem, intervindo todas na regulação do factor de transcrição LuxR. No entanto, nalgumas delas, como *Vibrio vulnificus*, há factores de virulência cuja expressão é activada pelo AI-2, não tendo ainda sido detectadas lactonas de homoserina (27). Portanto, no caso das vibrionáceas parece claro que o AI-2 regula mecanismos a nível colectivo, tipicamente derivados da detecção de um quórum. Por outro lado, nas enterobacteriáceas, apenas a internalização de AI-2 está bem estudada; a entrada de AI-2 aumenta a expressão do operão *lsr*, leva à intensificação dessa mesma entrada, num efeito de retroacção positiva (52, 61). Isto significa que até agora o que se sabe nas enterobacteriáceas é que o AI-2 é formado como produto secundário da reacção catalisada pela enzima LuxS, é exportado para o exterior durante a fase exponencial de crescimento da população e quando chega à fase estacionária volta a ser incorporado rapidamente, porque uma molécula de AI-2, uma vez incorporada, favorece a incorporação de mais moléculas (Figura 3) (61). Fora este mecanismo, não se conhece outro mecanismo regulado pelo AI-2 nestas bactérias.

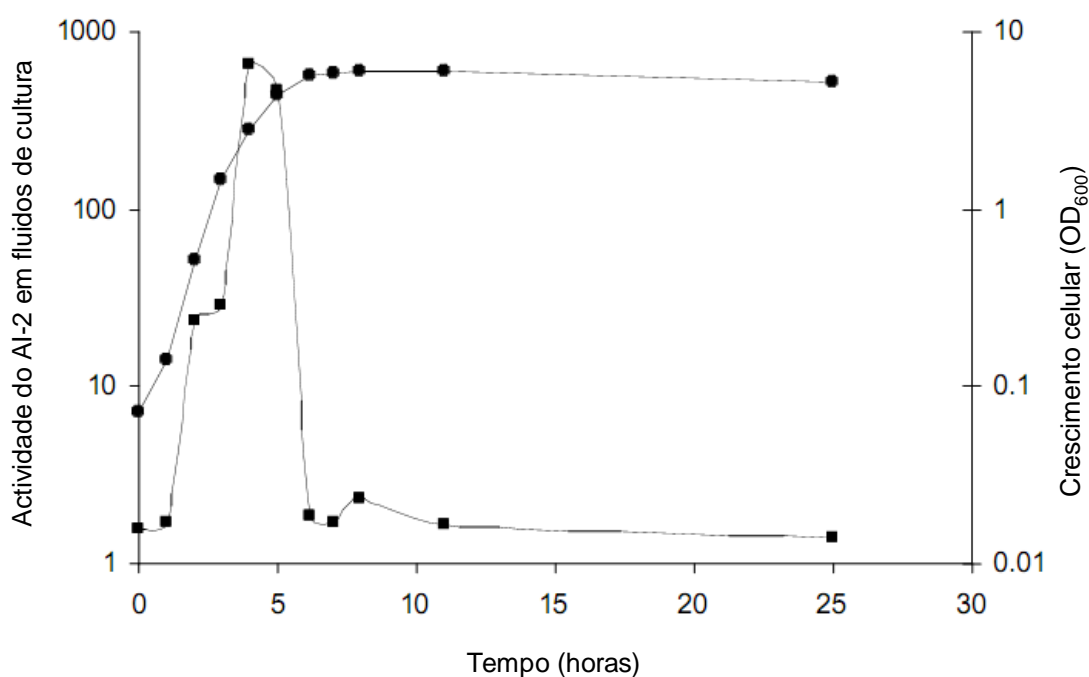


Figura 3 – A actividade de AI-2 no meio extracelular numa cultura de *Escherichia coli* de genótipo selvagem. A curva com quadrados corresponde à curva de actividade de AI-2 e a curva com círculos corresponde à curva de crescimento. Durante a fase exponencial, o AI-2 é produzido e exportado para o meio exterior e à chegada da fase estacionária este mesmo AI-2 é massivamente internalizado. [Imagem adaptada da referência (61).]

Este trabalho incide sobretudo na enterobacteriácea *Escherichia coli*. Esta bactéria é anaeróbia facultativa e existe em simbiose com animais ao nível do tracto intestinal inferior. Todavia, sobrevive também no solo em vida livre quando expelida através das fezes, o que lhe permite propagar-se por novos hospedeiros (2). Nesta bactéria, pensa-se que o AI-2 pode regular a formação de biofilmes. Estes são estruturas de aderência a superfícies (bióticas ou abióticas) com matriz extracelular e DNA e que podem albergar várias espécies diferentes, formando uma comunidade relativamente independente do ambiente que os envolve. Foi proposto que esta regulação da formação

de biofilmes fosse mediada pelo AI-2-fosfato, o qual activaria o gene *mqsR*, que regula a mobilidade das células pela produção de flagelos (18). No entanto, esta relação ainda não está bem estabelecida, porque não está confirmada a dependência da formação de biofilmes relativamente ao AI-2 produzido endogenamente, nem a função de cinase do AI-2 como sendo a única desempenhada pela enzima LsrK. De qualquer das formas, ainda há muito por esclarecer acerca do alcance da acção do operão *lsr*. Esta tese procura desvendar outros mecanismos concretos que o AI-2 possa regular, para além da síntese do seu próprio transportador para o interior da célula. Esses mecanismos conferiam um valor adaptativo consistente para o uso da comunicação inter-específica por parte da *Escherichia coli*.

Capítulo 2. O custo de genes regulatórios do operão regulado por LuxS (*lsr*) em *Escherichia coli*

Introdução

Desde a descoberta de que o AI-2 produzido numa espécie de bactérias tem efeitos numa espécie diferente (4), se tem levantado a hipótese de existir comunicação entre diferentes espécies de bactérias. No entanto, a comunicação só se considera como tal se o sinal envolvido beneficia quer o seu emissor, quer o seu receptor, o que permite dizer que o processo de transferência da molécula sinalizadora pode ter valor adaptativo em ambiente natural e evoluiu devido aos efeitos que produz (25, 35). A demonstração da importância do AI-2 na formação de biofilmes na cavidade bucal humana tornou real comunicação inter-específica, uma vez que parece haver uma acção cooperativa na formação dos biofilmes orais, o que beneficia as espécies envolvidas (41). Este caso constitui dos poucos em que se confirmou um fenómeno de comunicação entre espécies bacterianas.

Em *Escherichia coli*, apesar de o modo de internalização do AI-2 ser já conhecido, pouco mais se sabe para além de que a entrada do AI-2 promove a síntese do seu próprio transportador, como já foi referido no capítulo anterior. Sabe-se, porém, que no intestino dos mamíferos esta espécie pode interferir com o ciclo de virulência de *Vibrio cholerae* (58), só que com tal acção não se conhecem benefícios para qualquer das espécies. Na verdade, ainda não está estabelecido qualquer benefício derivado do sistema de detecção de quórum LuxS/AI-2 em *Escherichia coli* em nenhum ambiente. Em condições *in vitro*, já foram comparados os *fitnesses* absolutos das estirpes selvagem e mutante em *luxS* por comparação de taxas de crescimento e não se detectaram diferenças estatisticamente relevantes em meio completo de Luria-Bertani (LB) (S. Trindade, dados não publicados).

A análise das curvas de crescimento é uma forma superficial de comparar *fitnesses* em bactérias. Por isso, neste trabalho pretende-se averiguar a existência de um benefício trazido pela sinalização através do AI-2 em *Escherichia coli* recorrendo a ensaios de competição *in vitro* com uma estirpe de referência, a MG1655 Δara . Estes ensaios são muito mais sensíveis a diferenças de *fitness* do que os ensaios derivados da determinação da taxa de crescimento.

Material e métodos

Estirpes utilizadas. As estirpes utilizadas de *Escherichia coli* K-12 estão listadas na tabela 1 e derivam, em última análise, da estirpe MG1655. Esta é uma estirpe laboratorial pouco manipulada geneticamente, tendo sofrido apenas remoção do bacteriófago temperado λ do genoma por radiação ultravioleta e do plasmídeo F com laranja de acridina (2).

Tabela 1 – Estirpes utilizadas neste trabalho.

Nome	Genótipo	Estirpe parental [‡]	Fonte
MG1655	Selvagem		(7)
KX1228	$\Delta luxS$	KX1200	Karina Xavier [†]
KX1448	$\Delta lsrK$	KX1440	(61)
JCM11	$\Delta lsrG$	JCM8	João Marques [†]
AS10	$\Delta lsrR$	KX1320	António Santos [†]

[‡]Todas estas estirpes derivam da estirpe selvagem MG1655.

[†]Estirpes construídas como descrito em (61).

Ensaio de competição. Para medir o custo em *fitness*, cada estirpe foi colocada em competição contra a estirpe de referência *Escherichia coli* K-12 MG1655 Δara em meio de Luria-Bertani (LB) – um meio completo. Esta estirpe de referência tem a propriedade de formar colónias de cor vermelha em placas de tetrazolium arabinose (TA) agar, enquanto que as estirpes em teste (que são *ara*⁺) aparecem em cor branca (30), o que permite a sua distinção e contagem diferenciada. As culturas de cada estirpe foram primeiro lançadas individualmente a partir de uma pequena porção de um congelado em 5 mL de LB e incubadas a 37 °C com agitação a 240 rpm, durante 16 horas. Passado este primeiro período de crescimento, 50 μ L de cultura foram transferidos para 5 mL de LB fresco e submetidos a uma segunda incubação em tudo semelhante à primeira. Após este segundo período de crescimento, cada estirpe em teste foi misturada com a estirpe de referência numa razão inicial aproximada de 1:1 e uma diluição desta mistura foi plaqueada em TA agar para determinar de forma exacta essa razão inicial. Posteriormente, 50 μ L de cada mistura foram inoculados em cinco tubos independentes com 5 mL de LB e as competições assim lançadas foram incubadas a 37 °C e 240 rpm, durante 18 horas. Após este período, foram plaqueadas diluições apropriadas em placas de TA agar para a obtenção das razões finais entre estirpes em teste (*ara*⁺) e a estirpe de referência (Δara). O custo em *fitness* de cada estirpe de teste por geração – ou seja, o coeficiente de selecção de cada estirpe – foi estimado pela equação

$$s_x = \frac{1}{G} \frac{\ln\left(\frac{N_f(x)}{N_f(ref)}\right)}{\ln\left(\frac{N_i(x)}{N_i(ref)}\right)} \quad \text{(Equação 1) (11, 20)}$$

O valor s_x é o coeficiente de selecção em que a *fitness* da estirpe Δara se subtrai à *fitness* da estirpe de teste, ou seja, é um coeficiente de selecção que tem como padrão a *fitness* da estirpe de referência. Este valor vai depender das razões final e inicial (numerador e denominador da equação 1, respectivamente) entre o número de células das estirpes de teste e de referência e também depende do número de gerações de competição (G). Este parâmetro é calculado pela seguinte equação

$$G = \log_2 \frac{N_f}{N_i} \text{ (Equação 2) (11, 20)}$$

Porém, o valor que interessa é o coeficiente de selecção tendo como padrão a *fitness* da estirpe selvagem e para tal é necessário alterar a *fitness* padrão para que seja a da estirpe selvagem, o que é feito pela definição de um coeficiente de selecção s'_x da seguinte forma

$$s'_x = s_x - s_{WT} \text{ (Equação 3)}$$

Assim, o valor do coeficiente de selecção para a estirpe selvagem passa a ser zero (é a estirpe padrão) e o coeficiente de selecção das restantes estirpes em teste estará relacionado com a *fitness* da estirpe selvagem. Um valor positivo de s'_x significa que a *fitness* da estirpe em causa é superior à da estirpe selvagem e vice-versa; um valor nulo significa que a *fitness* da estirpe em causa e a da estirpe selvagem são iguais. Os coeficientes de selecção obtidos são a média das cinco competições independentes realizadas com cada estirpe em teste.

Para saber se os coeficientes de selecção obtidos eram estatisticamente significativos, isto é, que eram estatisticamente diferentes de zero, determinaram-se as *fitnesses* relativas das estirpes em teste (w_x), tendo como padrão a estirpe de referência Δara , da seguinte maneira

$$w_x = 1 + s_x \text{ (Equação 4)}$$

Os valores de *fitness* relativa foram comparados com recurso à ANOVA simples e à estatística *t* de Student. Na realização múltiplos testes de ANOVA, a correcção de Bonferroni foi utilizada.

Resultados e Discussão

A remoção de genes do operão *lsr* interfere com a quantidade de AI-2-fosfato que se obtém no interior da célula, o que faz com que a expressão operão *lsr* também seja alterada. Por seu turno, a deleção em *luxS* leva à total ausência de de AI-2 e, consequentemente, também de AI-2-fosfato, o que faz com que o operão *lsr* também não seja expresso. Se o AI-2 e o operão *lsr* tiverem um papel relevante em *Escherichia coli*, então a perturbação da sua acção de qualquer destes terá que incorrer num custo. Neste trabalho testaram-se os mutantes em *luxS*, *lsrK*, *lsrR* e *lsrG*, sendo que todos estes genes estão envolvidos na regulação do operão *lsr*. A *fitness* destas estirpes foi determinada em competição com a estirpe de referência MG1655 Δara em LB, um meio rico.

Como se pode ver pela análise da figura 4, a remoção de qualquer gene do operão *lsr* leva a um decréscimo na *fitness* de *Escherichia coli* em LB. No entanto, este decréscimo é reduzido – menor do que 4% – como se pode observar pelos coeficientes de selecção obtidos. Sabe-se, por estudos genéticos, que as deleções nos genes *lsrG* e *lsrR* levam ao aumento da expressão do operão *lsr*. O gene *lsrG* codifica uma enzima que degrada o AI-2-fosfato, o indutor do operão *lsr*, e portanto pensa-se que num mutante com a deleção deste gene a expressão do operão *lsr* é mais elevada porque neste mutante a concentração de AI-2-fosfato aumenta no interior da célula. Por outro lado, a deleção em *lsrR* faz com que o repressor do operão *lsr* deixe de existir; como o

AI-2-fosfato activa o operão por inibição do repressor LsrR, a deleção do gene que codifica o repressor LsrR faz com que o operão *lsr* passe a ser constitutivamente expresso no seu nível máximo e de forma independente do AI-2-fosfato. Tal como acontece em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (51), a expressão do operão *lsr* no mutante em *lsrR* é muito superior à verificada no mutante *lsrG* em *Escherichia coli* (A. Santos, dados não publicados). Ambas as deleções incorrem num custo em *fitness* de 3,96% e 3,32%, respectivamente, valores que são estatisticamente semelhantes ($p=0,542$, ANOVA simples com correcção de Bonferroni; figura 4). Assim, existe um custo associado à sobre-expressão do operão *lsr*.

A remoção do gene *lsrK*, por sua vez, permite saber qual o custo da inactivação geral do operão *lsr* porque neste mutante o AI-2 não é fosforilado sem LsrK e o operão não é activado sem AI-2-fosfato (52, 61). Esta deleção incorreu num custo muito inferior (0,75%), embora estatisticamente assinalável (Figura 9; $p<0,026$, teste *t* com diferentes variâncias). Em suma, aumentar a expressão do operão *lsr* tem um custo em LB superior ao de diminuir a sua expressão. Numa perspectiva simplista, estes resultados parecem indicar que os custos observados correspondem ao desperdício energético associado à transcrição e tradução dos produtos do operão. Esta hipótese parece plausível porque os custos observados nas deleções de *lsrR* e *lsrK* são da ordem de grandeza dos verificados nas deleções de genes do operão *lac* (Stoebel *et al.*, 2008), mesmo apesar de os custos determinados para o operão *lac* terem sido determinados noutro meio que não LB. No entanto, tal interpretação não basta porque embora o custo da deleção de *lsrK* seja muito menor que a deleção dos outros genes do operão, ainda é um custo. Este custo significa tão simplesmente que a expressão de *lsrK* – e, conseqüentemente, a entrada de AI-2 em *Escherichia coli* – tem um benefício, mesmo em LB, ou seja, mesmo em condições *in vitro*. Uma vez que o AI-2 não constitui uma fonte de carbono para a bactéria (52), existe a possibilidade de o AI-2-fosfato estar a regular mais do que só a expressão do operão *lsr* e, assim, ser realmente um sinal que regula processos que vão para além da sua própria produção e degradação. Desta forma, fica em aberto a possibilidade de este sinal permitir a comunicação inter-específica, uma vez que se pressupõe que o processo de comunicação tem um benefício para o emissor do sinal de comunicação (25).

A deleção em *luxS*, por seu turno, traz um custo muito superior ao da deleção de *lsrK* ($p=1,58\cdot 10^{-5}$, teste *t*; figura 4). Isto significa que esta deleção causa mais do que a inactivação do operão *lsr* porque caso contrário o custo desta deleção seria igual ao custo da deleção de *lsrK*. Por um lado, este facto pode ser explicado pelo envolvimento de LuxS no processo metabólico de reciclagem de aceitadores de grupos metilo – pela produção de homocisteína –, para além do envolvimento na activação do operão *lsr* pela produção de AI-2. Por outro lado, o AI-2 pode estar envolvido também noutro sistema que seja independente do operão *lsr* e que até ao momento se desconheça, mas que seja importante para a sua *fitness* inclusivamente neste meio.

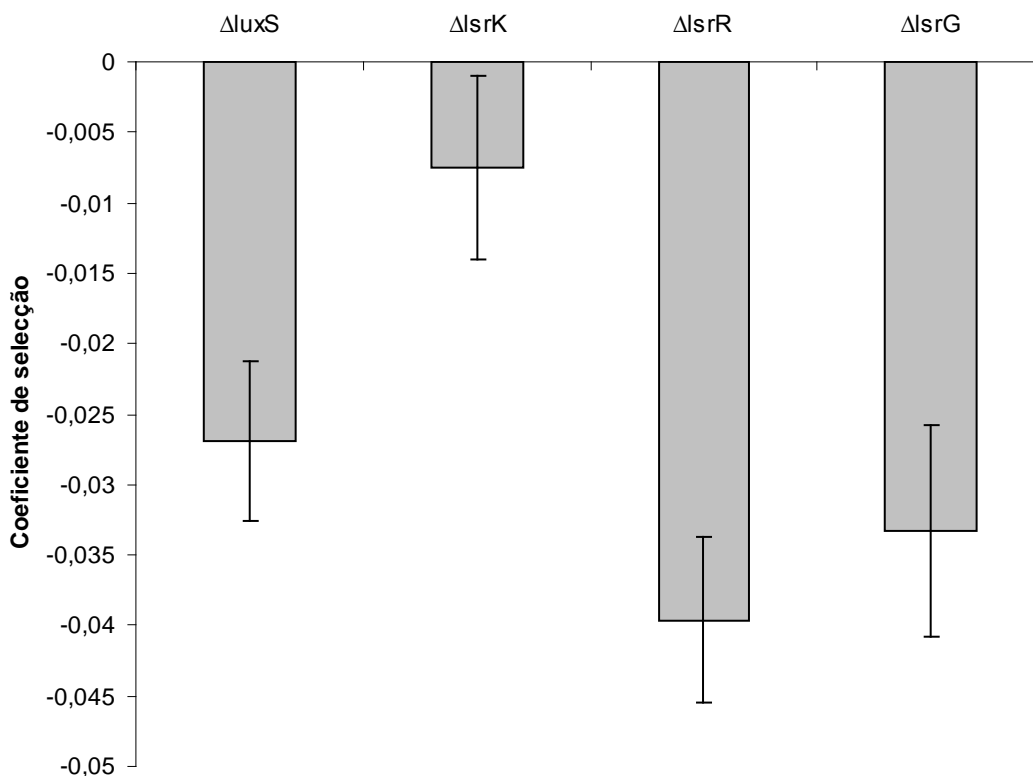


Figura 4 – Coeficientes de selecção de estirpes mutantes em genes envolvidos na regulação do operão *lsr*, por cada geração. Estes valores resultam da subtração da *fitness* relativa da estirpe selvagem às respectivas estirpes em análise (Equação 3). As barras de erro correspondem ao dobro do erro padrão relativo a cinco competições independentes realizadas no mesmo dia.

Fica por testar a vantagem deste operão *lsr* noutros ambientes, como o ambiente natural – incluindo o tracto intestinal –, no qual os factores bióticos e abióticos são totalmente diferentes. Para testar tal hipótese, o custo deste gene pode também ser medido em competição inter-específica, usando como competidores espécies como *Lactobacillus reuteri* (53), que em ambiente natural provavelmente coexistem e interagem com *Escherichia coli*. De outra forma, poder-se-ia também testar esse custo no intestino de mamíferos após a sua colonização, embora este caminho seja experimentalmente difícil, uma vez que a interacção entre as diferentes espécies é difícil de manter e observar (16).

O custo associado à sobre-expressão do operão pode ser explicado pelo desperdício de recursos energéticos ou por outro efeito. Uma vez que pode existir uma associação (se bem que ainda não está bem estabelecida) entre a entrada de AI-2 e a formação de biofilmes (18), é possível que um aumento na expressão leve a uma morte celular mais extensa para se libertar DNA, essencial à formação de biofilmes (6, 56). Não existindo vantagem na formação de biofilmes que compense o sacrifício de alguns indivíduos neste ambiente *in vitro*, pareceria natural a existência deste custo do aumento da expressão do operão *lsr*, porque o aumento de morte celular reduziria o tamanho final da população da estirpe, reduzindo a sua *fitness*. Todavia, mesmo que se confirme a ligação entre o AI-2 e a formação de biofilmes em *Escherichia coli* e esta hipótese seja plausível, tal não justificaria o custo da deleção de *lsrK*, uma vez que tal deleção, ao impedir a formação de biofilmes, reduziria a morte celular. Nesta perspectiva, o AI-2-fosfato resultante da acção da proteína LsrK teria que estar envolvido noutra função para além da activação do operão *lsr*, função essa que, em falta, traria um custo superior

ao benefício resultante da ausência de morte celular. Esta nova função hipotética ainda se desconhece, pelo que a existência de outros fenótipos da deleção em *lsrK* teria de ser averiguada.

Nas condições *in vitro* usadas, a função de LuxS pode ser explicada exclusivamente pelas suas funções metabólicas e o autoindutor-2 formado parece ter uma relevância menor em *Escherichia coli*, mas significativa. O aumento da expressão do operão *lsr* incorre num custo geral entre os 3% e os 4%, mas a diminuição da sua expressão também traz um custo, embora muito menor. Este facto será mais facilmente explicável se o AI-2-fosfato produzido a partir da LsrK tiver um papel importante na *Escherichia coli*, o que abre a possibilidade de uma comunicação inter-específica efectiva.

Capítulo 3. O efeito da comunicação inter-específica na taxa de mutação em *Escherichia coli* abordado por testes de flutuação clássicos

Introdução

O efeito da sinalização a partir do AI-2 nas enterobacteriáceas passa pela acção do AI-2 depois de este entrar na célula pelo transportador ABC. Como referido anteriormente, o AI-2 é fosforilado após entrar na célula por acção da enzima LsrK e posteriormente exercerá o seu efeito. Este efeito tanto pode ser directo – pela acção do AI-2-fosfato em si – ou pelas moléculas que deste derivam. Se, por um lado, não se tem vislumbrado mais nenhum efeito concreto do AI-2-fosfato de forma directa, a verdade é que o seu efeito indirecto nunca foi analisado, especialmente no que diz respeito ao efeito dos produtos do catabolismo do AI-2. Como já foi mencionado no primeiro capítulo, este catabolismo está a cargo das proteínas LsrF e LsrG (51, 60) codificados no operão *lsr* pelos respectivos genes *lsrF* e *lsrG* (Figura 2). A proteína LsrF tem homologia com uma aldolase e, embora pareça ser funcional na degradação do AI-2 fosfato em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (51), a sua funcionalidade em *Escherichia coli* permanece dúbia (A. Santos, dados não publicados), se bem que parece actuar sobre os produtos da reacção da LsrG. A LsrG cataliza uma reacção química que tem o AI-2-fosfato como substrato e leva à formação de fosfoglicolato (60). Este composto, que também é produzido durante alguns mecanismos de reparação de DNA (37), é posteriormente desfosforilado em glicolato e integrado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, sendo assim metabolizado (19). Estudos posteriores desta reacção enzimática desempenhada pela LsrG em condições aeróbias revelaram fortes indicações da formação de outros compostos, para além do fosfoglicolato, como acetato e metilglioxal (32). O acetato é considerado um importante precursor de ácidos gordos e colesterol (33). O metilglioxal (cuja designação IUPAC é -oxo-propanal), por seu turno, é um produto secundário do catabolismo da glucose e de ácidos gordos e proteínas (24). A importância fisiológica da sua formação ainda se desconhece, mas pensa-se que a sua formação permite a manutenção de uma reserva de fosfato livre no citosol, até porque a sua formação é inibida por fosfato (21). No entanto, sabe-se que o metilglioxal é mutagénico – reagindo extensamente com a guanina (36) e podendo mesmo induzir quebras no cromossoma (9) – sendo até letal a concentrações mais elevadas (15). Deste modo, a formação de metilglioxal a partir do AI-2-fosfato levantou a hipótese de a degradação do AI-2-fosfato levar ao aumento da taxa de mutação em *Escherichia coli*. Houve inclusivamente experiências preliminares com teste de flutuação de Luria-Delbrück que pareciam apoiar esta hipótese, dado que a taxa de

mutação da estirpe selvagem parecia ser superior à das estirpes que não formavam metilgloxal a partir do AI-2-fosfato (Figura 5). A confirmar-se, a entrada de AI-2 nesta bactéria teria outra consequência importante para além da regulação do operão *lsr* e o possível envolvimento na formação de biofilmes. O aumento da taxa de mutação tem uma importância evolutiva tremenda, uma vez que a mutação é geralmente a fonte primordial de diversidade genética numa população e o aumento da taxa de mutação, ao aumentar a taxa de geração de diversidade, pode acelerar o processo de adaptação, especialmente numa população bacteriana (50).

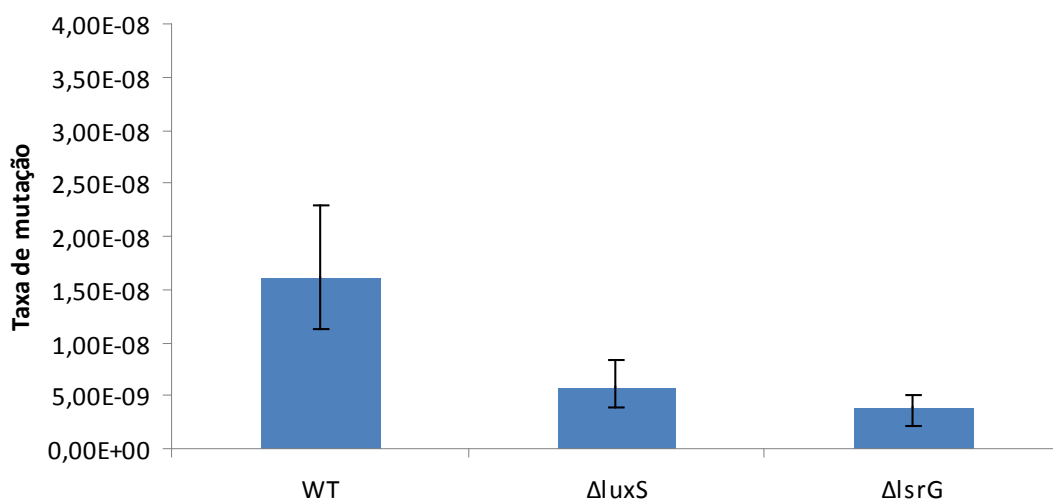


Figura 5 – Testes de Luria-Delbrück preliminares. A taxa de mutação das estirpes selvagem (WT), da estirpe mutante que não produz AI-2-fosfato ($\Delta luxS$) e da estirpe mutante que não produz a enzima LsrG ($\Delta lsrG$). As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% em torno da estimativa de cada taxa de mutação. [J. Marques, dados não publicados]

Neste trabalho pretende-se repetir estas experiências de forma sistematizada, de modo a perceber se existe, de facto, este efeito indirecto do AI-2 na taxa de mutação de *Escherichia coli*. Para tal, será usada uma abordagem experimental clássica, com testes de flutuação para estimar a taxa de mutação. Experimentalmente, lança-se uma população de tamanho inicial conhecido em crescimento (neste caso de *Escherichia coli*), durante o qual as mutações surgem. Chegada a cultura à fase estacionária, determina-se o tamanho final da população e esta é submetida a num meio selectivo, sendo os mutantes resistentes a este meio são quantificados (31). O meio selectivo utilizado foi escolhido de forma a que a sobrevivência ou resistência a este meio possa resultar de mutações pontuais no DNA, para que se possa quantificar a taxa de mutação por cada par de base (39). Neste trabalho em concreto, utilizou-se rifampicina no meio selectivo. A rifampicina é um antibiótico que afecta a subunidade β da RNA polimerase em *Escherichia coli*, afectando a capacidade catalítica da RNA polimerase. A subunidade β é codificada pelo gene *rpoB* e conhecem-se pelo menos cinco mutações pontuais que levam à substituição de um aminoácido e que conferem resistência à rifampicina, levando à perda de afinidade desta com a subunidade β (47). O meio selectivo poderia ter sido feito com uso de outros antibióticos como o ácido nalidíxico (8) ou a estreptomomicina (46), em que também existem mutações pontuais que conferem resistência em *Escherichia coli* à acção destes antibióticos.

Materiais e Métodos

Estirpes utilizadas. As estirpes utilizadas de *Escherichia coli* K-12 estão listadas na Tabela 2 e derivam, em última análise, da estirpe MG1655.

Tabela 2 – Estirpes de *Escherichia coli* K-12 utilizadas neste estudo.

Nome	Genótipo relevante	Plasmídeo	Marcador ¹	Estirpe parental	Fonte
MG1655	Selvagem				(7)
KX1228	$\Delta luxS$			KX1200	Karina Xavier [†]
BA4	$\Delta rbsD$			BA2	Este estudo
BA17	$\Delta luxS$	pCA24N	cm	KX1228	Este estudo
BA18	$\Delta luxS$	pCA24N	cm	KX1228	Este estudo
BA19	Selvagem	pCA24N	cm	MG1655	Este estudo
BA20	Selvagem	pCA24N	cm	MG1655	Este estudo
BA21	Selvagem	pCA24N_ <i>luxS</i>	cm	MG1655	Este estudo
BA22	Selvagem	pCA24N_ <i>luxS</i>	cm	MG1655	Este estudo
CSP23	Selvagem	pUC18_ <i>sraD</i> , <i>luxS</i>	amp	CJG66	Catarina Pereira [†]
CSP25	Selvagem	pUC18	amp	CJG66	Catarina Pereira [†]
CSP27	$\Delta luxS$	pUC18_ <i>sraD</i> , <i>luxS</i>	amp	CJG72	Catarina Pereira [†]
CSP29	$\Delta luxS$	pUC18	amp	CJG72	Catarina Pereira [†]
CSP48	Selvagem	pBR322	amp, tet	MG1655	Catarina Pereira [†]
CSP55	Selvagem	pBR322_ <i>sraD</i> , <i>luxS</i>	amp	MG1655	Catarina Pereira [†]
MBS1	<i>luxS::cm</i>	pQE30-CLPY	cm, amp	FED001	Michal Sagie [†]

¹ Genes que conferem resistência a antibióticos: cloranfenicol (cm), ampicilina (amp) e tetraciclina (tet).

[†] Estirpes construídas como descrito em (61).

Manipulações genéticas. Para a obtenção do mutante $\Delta rbsD$ foram necessários dois passos. O primeiro passo partiu de uma estirpe cujo gene *rbsD* foi substituído por um gene que conferia resistência à canamicina (*rbsD::kan*) pelo método *Red Swap* (12) e proveio da Keio Knockout Collection (<http://www.openbiosystems.com/GeneExpression/Non-Mammalian/Bacteria/Keio/>). Esta estirpe foi lisada com fago P1 e este lisado foi usado para uma transdução na estirpe selvagem MG1655 para induzir recombinação no locus de *rbsD*. Na nova estirpe *rbsD::kan* obtida (BA2) realizou-se o segundo passo, que foi retirar o gene de resistência à canamicina. Tal foi conseguido por electroporação e indução do plasmídeo pCP20 (12). Este plasmídeo contém genes que conferem resistência à ampicilina e ao cloranfenicol; a sua replicação e a síntese de FLP recombinase estão sob controlo de uma origem de replicação e um promotor sensíveis à temperatura, sendo só induzidos a uma temperatura permissiva (43 °C). A esta temperatura, a FLP recombinase é então expressa e recombina nos locais FRT homólogos e que ladeiam o gene de resistência ao antibiótico, o que leva à deleção deste mesmo gene, formando-se o mutante $\Delta rbsD$. As restantes estirpes foram obtidas a partir de estirpes anteriormente obtidas através do método de *Red Swap* nas quais também foi electroporado o plasmídeo pCP20 para retirar o gene que conferia resistência a um antibiótico. Todas as deleções nas estirpes foram confirmadas por PCR com os seguintes *primers* P1 – AGGATTAAGTGTGGGTCAGCG e P2 – CTGAAGTAATGCTTCCATGACG, que ladeavam o gene *rbsD*. As estirpes com os respectivos plasmídios pCA24N, pUC18 e pBR322 foram obtidas com a introdução destes por electroporação na estirpe parental. Todos os plasmídios foram purificados usando Qiaprep Spin Miniprep Kit [250] (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

Testes de flutuação de Luria e Delbrück. Os testes de flutuação foram efectuados da mesma forma que Luria e Delbrück (31) os realizaram. Neste caso, foram iniciadas culturas de *Escherichia coli* K-12 de estirpes selvagem, $\Delta luxS$ e $\Delta rbsD$. As culturas de cada estirpe foram iniciadas em 5 mL de LB e incubadas a 37 °C e a 240 rpm durante 16 horas. De seguida, 50 μ L desta cultura foram transferidas para 5 mL de LB fresco e novamente incubadas a 37 °C durante 16 horas. Depois deste segundo período de 16 horas, iniciadas cinquenta culturas de cada estirpe em tubos Eppendorf de 2 mL por inoculação de 2 μ L da diluição 10^{-2} da cultura anterior em 500 μ L de LB. Para a contagem do número inicial de células que foi inoculado em cada uma das culturas iniciadas foram também retirados 10 μ L da cultura original e plaqueados em LB agar após diluição apropriada em $MgSO_4$. Estes tubos foram incubados a 37 °C e 240 rpm durante 18 horas. Ao fim deste tempo, foram retirados 10 μ L para a contagem do número final de células viáveis por diluição apropriada em $MgSO_4$ e plaqueamento em LB agar. A cultura restante foi integralmente plaqueada em LB + Rifampicina 100 mg L^{-1} para contar o número de mutantes resistentes à rifampicina.

Estimação da taxa de mutação. Importa distinguir claramente mutações e mutantes no contexto deste capítulo. Aqui define-se mutação como o evento molecular que se traduz na alteração genotípica e mutante como o indivíduo possuidor desta modificação genética. O número de mutantes que aparecem nas placas de LB + Rifampicina não corresponde ao número de mutações ocorridas, uma vez que as células que sofreram mutação vão dividir-se e atingir o número de mutantes que serão observados na placa, ou seja, o número de mutantes é maior que o de mutações.

A taxa de mutação é calculada através da equação

$$\mu = \frac{m}{N_f - N_i} \text{ (Equação 5) (31)}$$

que mostra essencialmente que é o número de mutações (m) por nova célula que surgiu: N_f é o número final de células e N_i o número inicial. Desta forma, é necessário traduzir o número de mutantes obtidos (por norma denotado r) no número de mutações (m) que os originaram. O número de mutantes tem uma distribuição de Luria-Delbrück – assim chamada por ter sido descrita por ambos – que se caracteriza por uma variância bastante superior ao valor médio, enquanto que o número de mutações ocorridas tem uma distribuição de Poisson, caracterizada por uma variância igual ao valor médio (31). O número de mutações (m) das três estirpes anteriormente referidas foi então estimado com base no número de mutantes existentes nas cinquenta culturas pelo método de máxima verosimilhança a partir de um algoritmo desenvolvido por Zheng (62) e que foi adaptado para MATLAB® 7.0. Depois de obtidos os limites de um intervalo de confiança de 95% e o estimador de verosimilhança máxima, os três estimadores do número de mutações foram usados para obter três estimadores da taxa de mutação (μ) através da Equação 4.

Determinação da actividade de AI-2 no meio extracelular. O método utilizado para determinar a concentração extracelular de AI-2 e inferir a sua entrada numa cultura de *Escherichia coli* K-12 baseia-se num método desenvolvido por Rajamani e colaboradores (40) e utiliza a proteína LuxP (proteína de ligação ao AI-2) de *Vibrio harveyi* fundida com duas proteínas fluorescentes, uma amarela (YFP) e outra azul (CFP). Esta proteína, denominada CLPY (CFP-LuxP-YFP), foi desenvolvida de forma a

que YFP e CFP estivessem próximas, de tal forma que a fluorescência azul da CFP seja transferida por ressonância na ausência de AI-2. Quando o AI-2 se liga à CLPY, a CFP e a YFP distanciam-se fisicamente de tal forma que a ressonância já não ocorre e apenas a CFP vai evidenciar fluorescência. Assim, a CLPY permite avaliar quantitativamente a concentração de AI-2 no meio extracelular a partir da extensão da fracção de AI-2 que se lhe liga. Esta propriedade é a base do ensaio de transferência de energia por fluorescência de ressonância, do acrónimo FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Este ensaio, foi utilizado para determinar a produção de AI-2 por todas as estirpes da tabela 2. Cada uma delas foi iniciada em 5 mL de LB (estirpes sem plasmídeo) ou LB + ampicilina 100 mg L⁻¹ (estirpes com plasmídeo) a partir de uma colónia em placa e incubada a 37 °C e 240 rpm por uma noite. No dia seguinte, 100 µL de cada cultura foram adicionados a 10 mL de meio fresco e novamente incubados nas mesmas condições. Durante o crescimento, foram sendo retiradas amostras periódicas da cultura e retirados os sobrenadantes por filtração para uma placa de 96 poços. No que diz respeito especificamente às estirpes de BA17 a BA22, com plasmídios pCA24N, seguiu-se o mesmo procedimento à excepção do facto de se ter adicionado isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) à concentração final de 0,1 mM com os 100 µL de cada cultura no dia do ensaio. Este procedimento foi adoptado para induzir a expressão de *luxS* que nestes plasmídios depende de um promotor induzido por IPTG. Por fim, foi adicionada a proteína CLPY em todos os poços da placa e o quociente de fluorescências YFP/CFP foi determinado a partir da medição das respectivas fluorescências no Victor³. Este quociente é traduzido em concentração de AI-2 através de uma recta de calibração realizada com amostras de AI-2 sintetizado *in vitro* e de concentração conhecida. Paralelamente à recolha periódica de amostras para o FRET, foram também recolhidas amostras para medição da densidade óptica a 600 nm para obter curvas de crescimento das estirpes.

Resultados e discussão

No âmbito da análise da acção do AI-2 na taxa de mutação, compararam-se a estirpes selvagem com as mutantes em *luxS* e em *rbsD*. O mutante em *luxS* não produz AI-2, como já mencionado, logo neste mutante não há qualquer acção do AI-2. Por outro lado, o mutante *rbsD* foi usado como controlo, porque é um mutante no qual o equilíbrio entre isómeros da ribose é afectado (42), constituindo assim um controlo importante na medida em que a ribose é a pentose estruturalmente mais semelhante ao AI-2. Espera-se que a mutação neste gene tenha um efeito neutro nas condições experimentais utilizadas, uma vez que os meios utilizados durante a experiência não contêm ribose. O mutante em *luxS* já tinha sido obtido anteriormente, mas o mutante em *rbsD* foi obtido no âmbito deste trabalho. A deleção do gene *rbsD* foi confirmada nesta estirpe através de PCR (Figura 6).

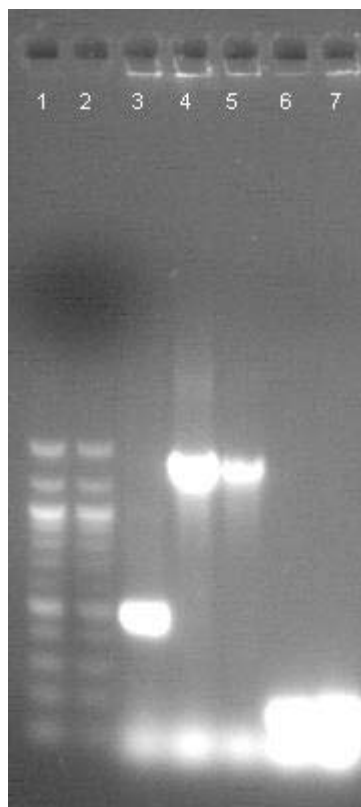


Figura 6 – Electroforese após PCR que confirma a deleção do gene *rbsD* no respectivo mutante obtido. Nos poços estão representados DNA marcador de 100 pb (1 e 2), estirpe selvagem (MG1655; 3), estirpes BA1 e BA2 (*rbsD::kan*; 4 e 5) e estirpes BA3 e BA4 ($\Delta rbsD$; 6 e 7).

Em primeiro lugar, determinaram-se os níveis de produção de AI-2 e o seu perfil de acumulação extracelular nestas três estirpes. Para tal, utilizou-se o ensaio de FRET com a proteína de fusão CLPY e verificou-se que o AI-2 era internalizado de forma semelhante na estirpe selvagem e na mutante em *rbsD*, enquanto que no mutante em *luxS*, que não produz AI-2, este não é detectado (Figura 7). Deste modo, confirmou-se que o perfil extracelular de AI-2 corresponde ao esperado, ou seja, o AI-2 é inicialmente exportado nas estirpes selvagem e $\Delta rbsD$ e posteriormente, a meio da fase exponencial, o AI-2 é removido do meio extracelular. Nada disto aconteceu no mutante em *luxS*, já que este não produz AI-2, sendo os valores observados sempre próximos de zero.

Da comparação entre as taxas de mutação das estirpes selvagem e dos mutantes quer em *luxS* quer em *rbsD*, é notório que os dois ensaios realizados mostram consistentemente que os valores de taxa de mutação são iguais nas três estirpes, uma vez que os intervalos de confiança de 95% são em larga medida sobreponíveis não só entre as diferentes estirpes, mas também na mesma estirpe nos dois ensaios (Figura 8).

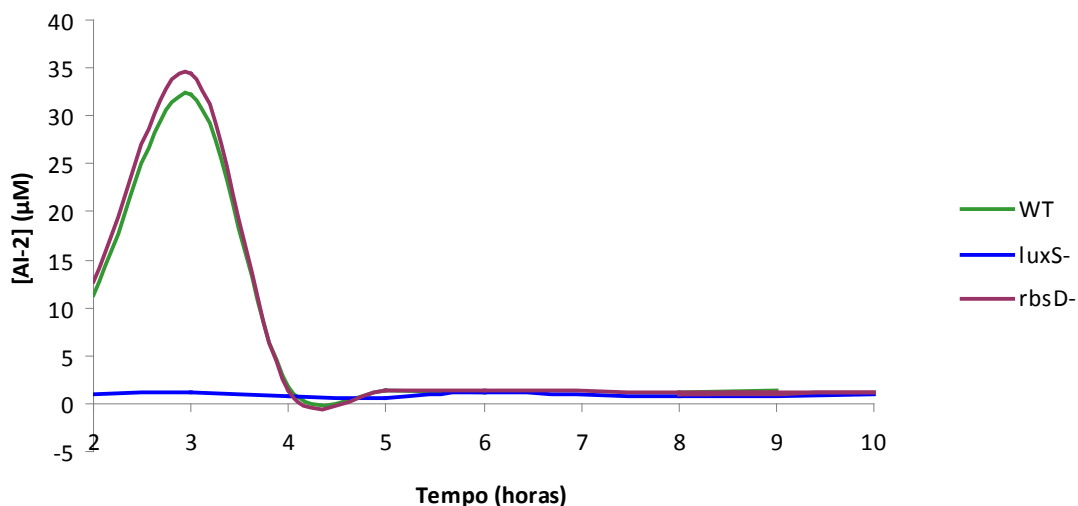


Figura 7 – Perfil de acumulação extracelular de AI-2 nas estirpes em análise. Está representada a concentração de AI-2 no meio extracelular de cada estirpe de *Escherichia coli* analisada ao longo do tempo. Paralelamente, foram realizadas curvas de crescimento para acompanhar o crescimento das estirpes e verificar que este era semelhante em todas as estirpes (Anexo 3).

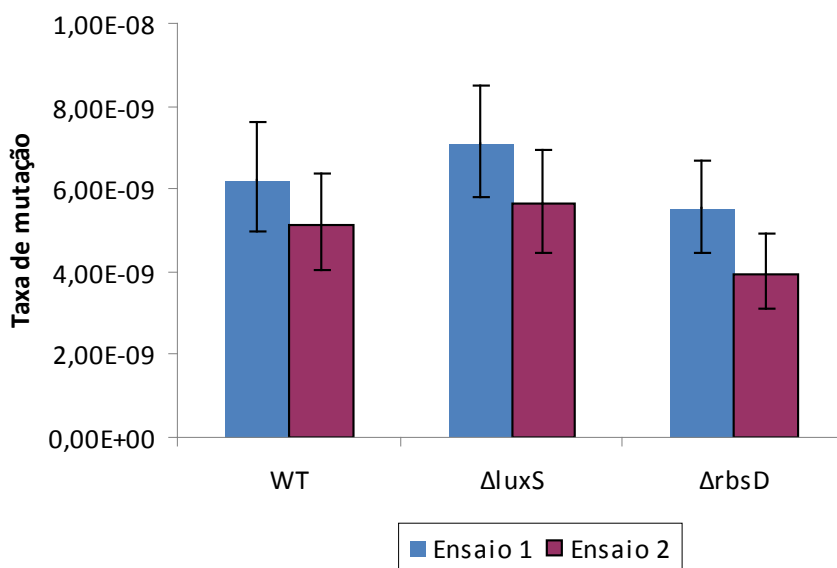


Figura 8 – Taxas de mutação estimadas em dois ensaios independentes nas estirpes selvagem (WT), mutantes em *luxS* ($\Delta luxS$) e em *rbsD* ($\Delta rbsD$). Em cada ensaio, a taxa de mutação relativa a uma estirpe resultou da distribuição obtida a partir de 50 replicados. As barras de erro correspondem ao intervalo de confiança de 95% estimado e a taxa de mutação expressa na barra é o que tem a máxima verosimilhança.

Estes resultados contrariam os resultados preliminares mencionados na introdução, levando claramente à ideia de que o AI-2 não afecta a taxa de mutação em *Escherichia coli*. Assim sendo, a primeira ilação que parece ser razoável retirar é a de que, mesmo havendo a produção de metilgloxal a partir do AI-2-fosfato, para além da produção resultante do catabolismo de diversas fontes de carbono, essa produção não tem efeito mutagénico. Esta ausência de efeito pode justificar-se pelo facto de a produção de metilgloxal a partir do AI-2-fosfato ser pouco significativa, uma vez que a formação de metilgloxal por este processo não foi quantificada (32), ou ao facto de o

metilglioxal assim produzido ser metabolizado de uma forma rápida e eficiente, sem provocar danos celulares. Sabe-se que o metilglioxal é metabolizado através da reacção com glutatona e da acção de glioxalases, originando como produto final D-lactato (15) e esta via pode ser suficientemente eficiente para evitar acumulações significativas de metilglioxal. A ser verdade, o resultado preliminar pode ter sido fruto do acaso e integrar o erro estatístico de primeira espécie (probabilidade de rejeitar uma hipótese nula verdadeira). Havendo a hipótese de a alteração da taxa de mutação existir mas não ter sido detectada, vemos a outra face estatística da moeda, o erro estatístico de segunda espécie (probabilidade de manter uma hipótese nula falsa). Tal quereria dizer que o método de estimação da taxa de mutação utilizado careceria de potência estatística. Pese embora tal diferença já ter sido detectada anteriormente, é também possível que tal diferença se encontre no limiar detectável por este algoritmo de estimação e continue difícil de detectar. Mesmo tendo em conta que a estimação aqui realizada foi mais precisa que a preliminar, com este método não parece possível detectar uma diferença inferior à da ordem de três vezes (Figura 5, quociente entre a taxa de mutação do selvagem e a do mutante em *luxS*). Esta hipótese parece plausível porque este método foi desenvolvido para descrever fenótipos com diferenças na taxa de mutação muito superiores – em cem a mil vezes – os chamados mutadores (48). Por este motivo, tentou-se criar condições que pudessem potenciar o efeito do AI-2 na taxa de mutação para que tais efeitos fossem detectados por este método. Tentou-se a utilização de estirpes com uma sobre-expressão de LuxS em plasmídios que levasse a um excesso de produção de AI-2 e uma internalização ainda mais massiva deste na célula. Uma estirpe com estas características seria comparada com uma estirpe mutante em *luxS* com um plasmídio vazio e se o metilglioxal produzido, nestas condições, não tivesse qualquer efeito na taxa de mutação, poder-se-ia dizer com grande grau de certeza que o AI-2 não tem qualquer efeito na taxa de mutação em *Escherichia coli*. Todavia, usando o plasmídio pBR322, com o gene *luxS* e seu promotor endógeno, ou o plasmídio pCA24N, com expressão de *luxS* indutível por IPTG – a concentração extracelular de AI-2 foi sempre da mesma ordem de grandeza da produzida pela estirpe selvagem (Figura 9). Tal não significa necessariamente que a produção de AI-2 seja igual em todas as estirpes com *luxS* independentemente de onde este seja expresso, mas pelo menos o AI-2 é exportado para o meio extracelular e depois internalizado em concentrações semelhantes, o que faz com que o AI-2-fosfato seja formado em concentrações semelhantes. Por este motivo, as estirpes obtidas não serviram para a comparação pretendida.

Desta feita, tornou-se necessário um método de estimação com maior poder estatístico e que pudesse detectar as possíveis diferenças que, a existirem, serão certamente na ordem de grandeza de entre duas e três vezes, ou seja, diferenças que no contexto deste trabalho são bastante inferiores às verificadas nos contextos mais habituais envolvendo taxas de mutação. É a busca deste novo método de estimação que consta no capítulo seguinte.

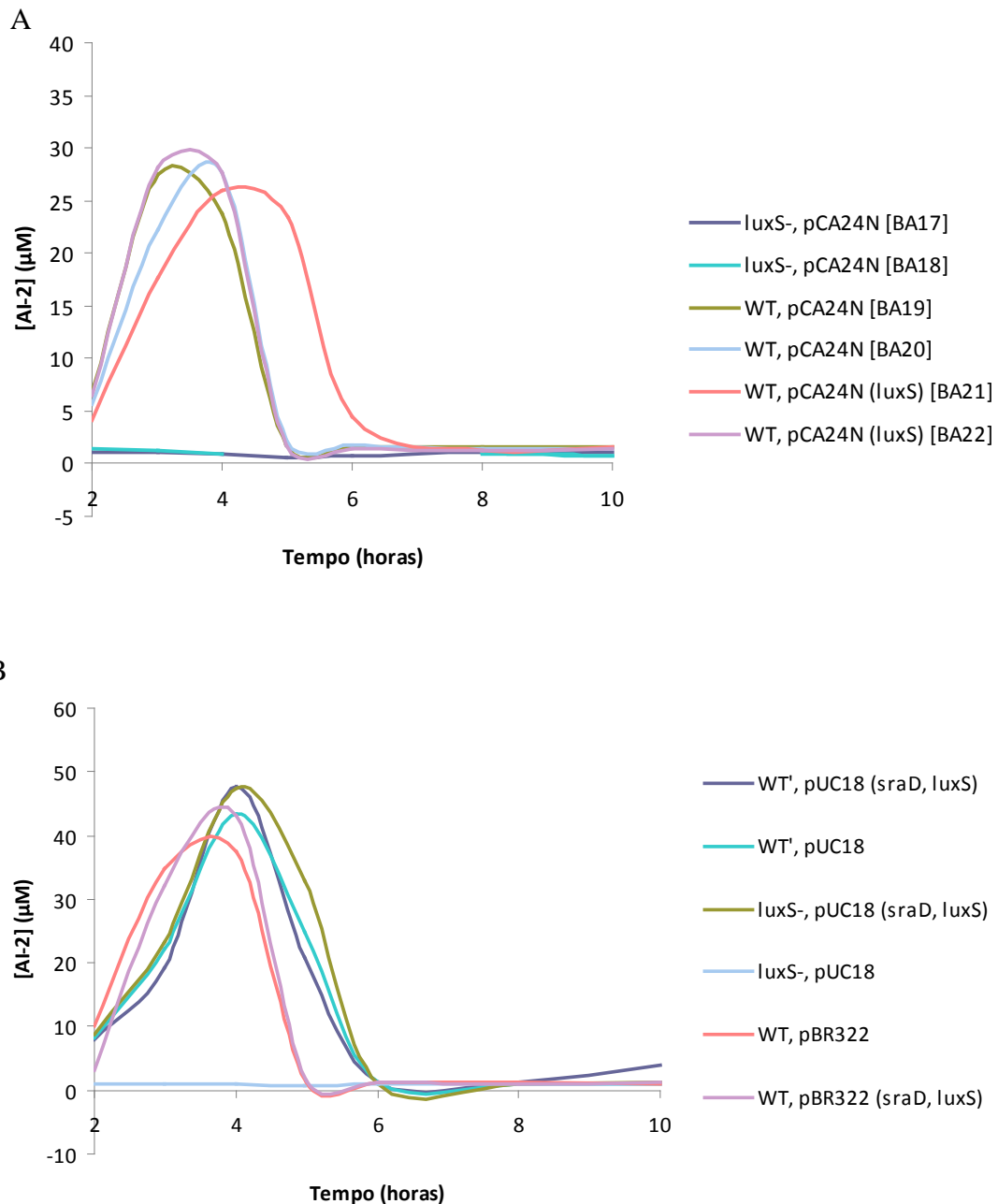


Figura 9 – Perfil de acumulação extracelular de AI-2 nas estirpes com plasmídios. A concentração extracelular de AI-2 foi quantificada ao longo do tempo em culturas de estirpes selvagem (WT) e mutante em *luxS* (*luxS*⁻), com plasmídios com e sem gene *luxS*. As rectas de calibração deste ensaio encontram-se no Anexo 5 desta tese. A estirpe BA21 teve um atraso no crescimento (Anexo 4B), o que justifica uma chegada atrasada à concentração máxima de AI-2 extracelular. **A.** Perfil usando plasmídios pCA24N, sob promotores indutíveis por IPTG; **B.** Perfil usando pBR322 e pUC18, sob promotores próprios.

Capítulo 4. Utilização do protocolo de Jones/Gerrish na estimação de taxas de mutação em *Escherichia coli*

Introdução

O delineamento experimental de Luria e Delbrück (31) permitiu a observação de que a mutação é geralmente um fenómeno espontâneo e que não depende do ambiente em que o organismo se insere. A espontaneidade da mutação está estreitamente relacionada com o descolamento entre a distribuição do número de mutantes (modelo de Luria-Delbrück) e a distribuição do número de mutações (modelo de Poisson), que no capítulo anterior foi referido. Depois de Luria e Delbrück, vários estudos foram realizados envolvendo taxas de mutação e os testes de flutuação de Luria-Delbrück, que detectaram inclusivamente indivíduos de *Escherichia coli* com uma taxa de mutação muito superior à normal – em cerca de mil vezes –, os chamados mutadores (48). No entanto, as diferenças procuradas na taxa de mutação no âmbito desta tese são muito menores, numa razão que é por volta das três vezes entre a estirpe selvagem e a estirpe $\Delta luxS$ (Figura 5). Tornou-se então necessário um procedimento que permitisse uma medição mais precisa da taxa de mutação e que, por consequência, pudesse detectar diferenças mais pequenas nesta mesma taxa.

O procedimento clássico parte do princípio de que todos os mutantes plaqueados dão origem a colónias no meio selectivo, o que significa que a probabilidade p de um mutante originar uma colónia observável é a unidade ($p = 1$). Por este motivo, pretende-se que a totalidade da cultura seja plaqueada, o que limita o tamanho da cultura que se lança e, em consequência, o tamanho populacional que é obtido no final. Jones e colaboradores (23) tinham em mente este problema e verificaram que era possível determinar com exactidão a taxa de mutação sem a necessidade de plaquear a totalidade da cultura, ou seja, com $p < 1$. O facto de esta probabilidade ser inferior à unidade pode dever-se a morte celular, à decisão de plaquear apenas parte da cultura, ou ambas. Assim, não interessa saber que a probabilidade p seja a unidade, mas que o seu valor, mesmo menor que a unidade, seja conhecido (23). Houve inclusivamente, mais tarde, uma proposta de modificação do procedimento experimental preconizado por Luria e Delbrück que incluía o uso de culturas maiores e o plaqueamento de uma pequena fracção destas (i.e., $p \ll 1$). Este procedimento foi testado por simulação e deu indicações no sentido de estimar taxas de mutação com precisão muito superior, o que permite a detecção de diferenças na razão de 1,5 como estatisticamente significativas (10). Este estimador, apesar de parecer muito preciso, foi pouco utilizado ao longo dos anos pelo facto de a estimação depender da mediana do número de mutantes, não considerando toda a distribuição dos mutantes. Este problema foi ultrapassado por Gerrish (17), pois este conseguiu desenvolver um algoritmo de verosimilhança máxima a partir deste procedimento experimental modificado. Este algoritmo, também testado por simulação, não só permite a estimação da taxa de mutação de forma muito precisa (Figura 10), mas também permite o uso de culturas infinitamente grandes e o plaqueamento de apenas uma ínfima porção destas (i.e. $p \approx 0$) em meio selectivo (17).

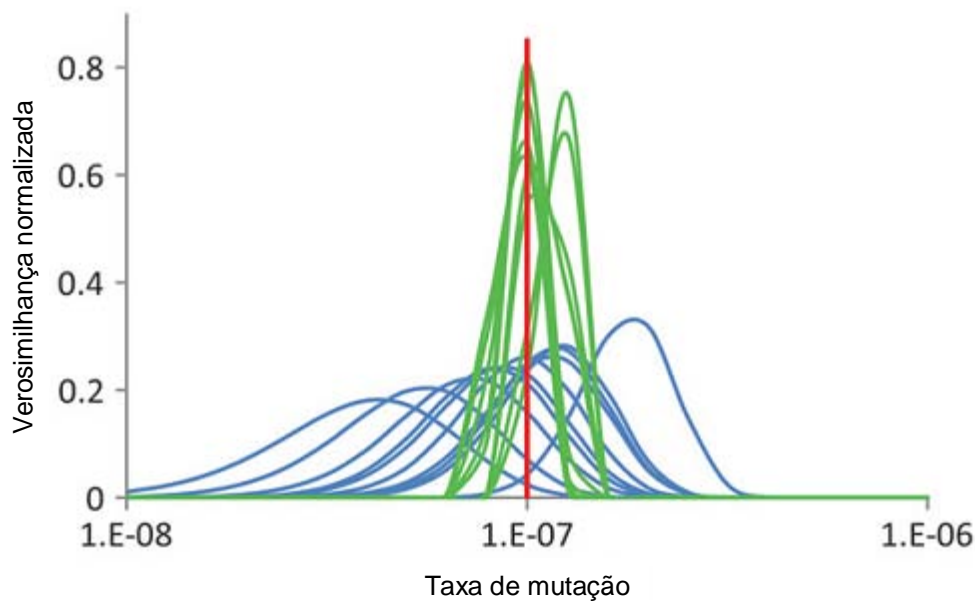


Figura 10 – Comparação, por Gerrish (17), das funções de verosimilhança obtidas a partir do protocolo modificado (a verde) e as obtidas pelo protocolo clássico (a azul). É notório que os valores máximos obtidos a partir do protocolo modificado são muito superiores aos obtidos a partir do protocolo clássico, o que faz com que as funções de verosimilhança no primeiro protocolo tenham intervalos de confiança mais estreitos, o que se traduz num aumento de precisão nas estimações. [Imagem adaptada da referência (17).]

Com o novo modo de estimação e as potencialidades que aparentemente possui, pretende-se neste capítulo a sua aplicação à problemática do efeito da sinalização por AI-2 na taxa de mutação, trazida do capítulo anterior. O objectivo desta nova abordagem experimental é averiguar se o progresso na obtenção de intervalos de confiança mais precisos permite realmente encontrar diferenças na taxa de mutação que não foram encontradas com o protocolo clássico, analisado no capítulo anterior.

Material e Métodos

Protocolo de Jones. As estirpes já referidas e descritas no capítulo anterior – selvagem, $\Delta luxS$ e $\Delta rbsD$ – foram iniciadas em 5 mL de LB a partir de congelados e também incubadas a 37 °C e 240 rpm durante 16 horas. Seguidamente, 50 μ L desta cultura foram transferidos para 5 mL de LB fresco e novamente incubadas a 37 °C durante 16 horas. Depois deste segundo período de 16 horas, foram iniciadas vinte culturas de cada estirpe por inoculação de 2 μ L da diluição 10^{-2} da cultura anterior em 5 mL de LB – cerca de 10^4 células. Estes tubos foram incubados a 37 °C e 240 rpm durante 18 horas. Ao fim deste tempo, foram retirados 10 μ L para a contagem do número final de células viáveis por diluição apropriada em $MgSO_4$. Da cultura restante, 100 μ L ($p=0,02$) ou 200 μ L ($p=0,04$) foram directamente plaqueados em LB + Rifampicina 100 mg L^{-1} para contar o número de mutantes resistentes à rifampicina. Em suma, a modificação experimental relativamente ao procedimento clássico resume-se ao aumento do volume de cultura de crescimento de 500 μ L para 5 mL, o plaqueamento parcial da cultura em meio selectivo e a redução do número de replicados de cinquenta para vinte, pois apenas são necessárias vinte culturas de cada estirpe para a precisão pretendida (10).

Estimação da taxa de mutação. A partir do protocolo de Jones, a distribuição de mutantes altera-se relativamente à do protocolo clássico por causa do plaqueamento de apenas uma fracção da cultura (i.e. diminuição de p), o que reduz a variância da distribuição de mutantes e a aproxima de uma Poisson (23). A tradução do número de mutantes na distribuição de mutações e , subsequentemente, em taxa de mutação foi conseguida com o algoritmo de máxima verosimilhança desenvolvido por Gerrish (17). Nesta instância, a taxa de mutação era apenas o número de mutações por indivíduo, ou seja, o quociente entre o número de mutações e o tamanho final da população. Estes valores de taxa de mutação são comparáveis com os do capítulo anterior porque o tamanho inicial da população (N_i) é negligenciável comparado com o tamanho final (N_f).

Resultados e Discussão

A utilização deste protocolo modificado de Luria-Delbrück com um algoritmo de máxima verosimilhança nas mesmas estirpes utilizadas no capítulo anterior pretendia claramente transpor as potencialidades que este método tinha demonstrado do plano teórico para o plano experimental. Dada a precisão deste método na estimação, revelada por simulação (10, 17), esperava-se a obtenção de intervalos de confiança mais estreitos e um aumento da potência estatística relativamente ao método clássico, utilizado no capítulo anterior. No entanto, a precisão deste método não se revelou superior à do método clássico e, ao mesmo tempo, os resultados dos ensaios foram muito heterogéneos com este protocolo modificado. Os intervalos de confiança de 95% nem sequer se sobrepuseram nas culturas da mesma estirpe em ensaios diferentes, indicando que cada estimação da taxa de mutação é circunstancial e, por consequência, os valores obtidos não são robustos (Figura 11). Só no mutante em *rbsD* é que as taxas de mutação eram relativamente próximas: os primeiros dois ensaios revelam taxas de mutação iguais, mas o terceiro ensaio revela uma taxa ligeiramente superior ao primeiro. Esta variabilidade não pode ser inerente às próprias estirpes, porque nesse caso ter-se-ia verificado também com uso do método clássico, o que não aconteceu (Figura 8).

Com este protocolo foram testadas duas fracções de plaqueamento diferentes. Em primeiro lugar, plaqueou-se em meio selectivo 4% da cultura. Esta fracção de plaqueamento é aceitável no contexto deste método e ao mesmo tempo não é muito baixa, o que permitiu obter um número relativamente elevado de resistentes em placa (Anexo 6), numa tentativa de clarificar as possíveis diferenças entre as taxas de mutação das diferentes estirpes por se lidar com números maiores. Neste primeiro ensaio, todas as estirpes apresentaram taxas de mutação diferentes e a taxa de mutação da estirpe selvagem foi muito superior à das restantes estirpes, tendo atingido um valor anormalmente elevado (Ensaio 1, Figura 11). Tal valor terá sido atingido porque o número final de células que foi medido é anormalmente baixo (Anexo 7), o que poderá dever-se a um problema esporádico de plaqueamento. Dado que este ensaio se mostrou pouco adequado para obter taxas de mutação robustas e que o enviesamento da estimação é menor quando a fracção plaqueada em meio selectivo é menor (17), realizaram-se ensaios com uma fracção de plaqueamento menor, reduzindo tal valor de 4% para 2%. No entanto, as estimativas obtidas foram estatisticamente diferentes entre os diferentes ensaios (Ensaio 2 e 3, Figura 11) e também diferentes das obtidas no ensaio anterior (Ensaio 1, Figura 11), não só entre as estirpes, mas dentro da mesma estirpe. Assim, as estimativas da taxa de mutação de cada estirpe não só se alteraram com a diminuição da fracção de plaqueamento em meio selectivo, mas também se

alteraram nos dois diferentes ensaios com a mesma fracção de plaqueamento (Figura 11), ou seja, a taxa de mutação em cada estirpe foi diferente usando diferentes fracções de plaqueamento e também em diferentes ensaios usando a mesma fracção de plaqueamento.

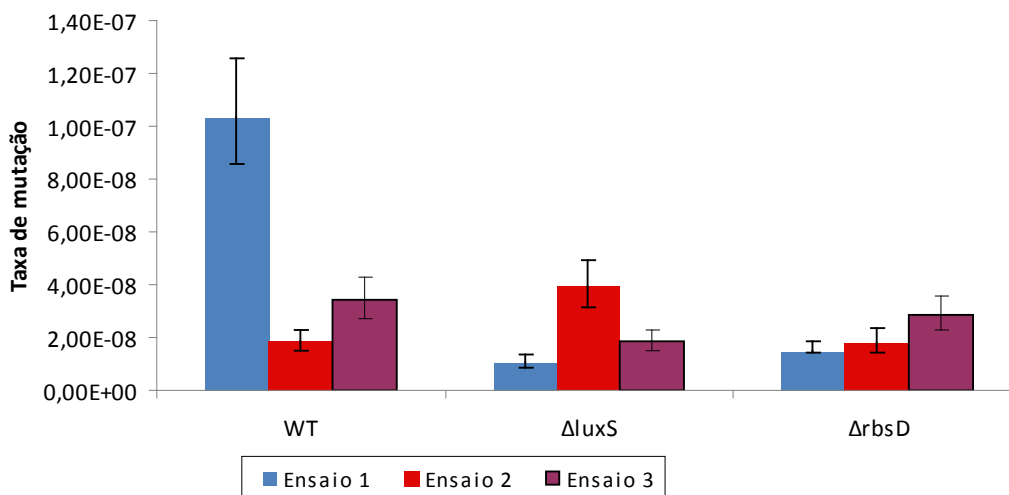


Figura 11 – Taxas de mutação estimadas pelo algoritmo de Gerrish. O ensaio 1 foi feito com $p = 0,04$ e os ensaios 2 e 3 foram feitos com $p = 0,02$. Nota-se que as taxas de mutação obtidas por este método, embora pouco robustas, são claramente superiores relativamente às obtidas pelo método clássico referido no capítulo anterior. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% para a taxa de mutação. A tabela associada a estes valores está no Anexo 7.

Tal facto coloca em dúvida a robustez deste método na estimação de taxas de mutação. A diferença estatística com diferentes diluições pode ser explicada por uma eficiência de plaqueamento inferior a 100%, isto é, pelo facto de nem todos os resistentes que estavam a ser plaqueados terem formado colónias visíveis. A eficiência de plaqueamento é difícil de quantificar, o que faz com que uma baixa eficiência de plaqueamento seja difícil de detectar. No entanto, a ser verdadeira, esta hipótese pode contribuir para explicar os dados porque diferentes fracções de plaqueamento são afectadas de forma diferente por uma eficiência de plaqueamento inferior a 100% (P. Gerrish, comunicação pessoal). No entanto, quando se diminuiu a fracção de plaqueamento de 4% para 2%, o número médio de resistentes em placa diminuiu para cerca de metade, o que leva a crer que a eficiência de plaqueamento, mesmo que inferior a 100%, ter-se-á mantido ao longo dos ensaios. A precisão do número final de indivíduos (N_f), dada pelo coeficiente de variação, também é fraquíssima, pois os coeficientes de variação observados são elevadíssimos (Anexo 7), podendo ser uma forte contribuição na explicação para este facto. Coeficientes de variação tão grandes colocam também em causa o valor médio encontrado para N_f , o que inevitavelmente também põe em causa a confiança depositada nos valores obtidos. A fraca confiança nos valores do número final de indivíduos agrava a escassa robustez deste método, o que tem como consequência um elevado erro estatístico de primeira espécie, ou seja, uma elevada probabilidade de rejeitar uma hipótese nula verdadeira e, deste modo, tomar uma decisão estatística errada. Traduzindo para o fenómeno biológico em causa, a fraca confiança nos números finais de células e uma possível eficiência de plaqueamento inferior a 100% podem introduzir artefactos experimentais que facilitam a obtenção de taxas de mutação que são todas diferentes entre si. Desta forma, este novo procedimento

estatístico revela-se muito pouco conservativo. No entanto, é muito provável que a grandeza destes coeficientes de variação se deva ao número de culturas utilizado, uma vez que pegando nos dados do método clássico do capítulo anterior e fazendo uma amostragem pseudo-aleatória de 20 das 50 culturas, os coeficientes de variação associados ao número final de células aumentam para um valor mínimo de 101,6% (dados não mostrados). Assim sendo, a utilização de uma amostra maior, não sendo necessária para a obtenção de um número de mutantes preciso, pode ser necessário para a obtenção de um número final de células mais preciso. Em alternativa, a determinação deste número final pode ser feita através da separação de células num separador activado por fluorescência (FACS), utilizando para este efeito estirpes com o mesmo fundo genotípico, mas com proteínas fluorescentes. Por outro lado, a eficiência de plaqueamento é difícil de quantificar de forma directa, embora seja importante que o seu valor seja conhecido (23). Gerrish (comunicação pessoal) tentou estimar a eficiência de plaqueamento a partir de dados simulados com duas fracções diferentes de plaqueamento em meio selectivo, mas tal tentativa revelou-se infrutífera porque o poder estatístico gerado por esta estimação era fraco. Assim, a eficiência de plaqueamento ainda não é quantificável experimentalmente.

Apesar de Gerrish (17) ter mostrado com dados simulados que os intervalos de confiança das taxas de mutação são muito mais curtos usando este método, a verdade é que os dados experimentais contidos nesta tese não têm intervalos de confiança mais curtos que os obtidos pelo método clássico de estimação. Bem pelo contrário, os intervalos de confiança parecem ser maiores. Tal facto seria fácil de explicar do ponto de vista matemático se grande parte das culturas submetidas a meio selectivo não trouxesse mutantes (P. Gerrish, comunicação pessoal). Porém, nos dados aqui apresentados acontece exactamente o oposto, ou seja, praticamente todas as culturas apresentam mutantes resistentes à rifampicina (Anexo 6). A comparação da precisão de estimação da taxa de mutação pelo protocolo clássico e pelo protocolo modificado assumiu que no protocolo clássico eram usadas vinte culturas e que o tamanho médio final da população seria de $5 \cdot 10^6$, mas nesta tese foram usadas cinquenta culturas e o tamanho final médio da população era cerca de cem vezes superior (Anexo 2), o que terá contribuído para aumentar consideravelmente a precisão das estimações realizadas pelo protocolo clássico relativamente ao que foi previsto (17). Deste modo, a semelhança na precisão dos dois protocolos não só se pode dever ao fraco aproveitamento da potencial precisão do algoritmo de Gerrish, mas também pelo facto de a precisão gerada neste caso pela estimação pelo protocolo clássico ter sido muito superior à prevista por Gerrish. Isto poderá significar que, em comparação com a estimação clássica, o ganho de informação com o uso de culturas de maior volume não foi superior à perda de informação resultante do plaqueamento de uma fracção da cultura (22), tendo apenas havido um contrabalanço. Deste modo, o uso de culturas com volume ainda maior que o usado aqui pode melhorar a precisão da estimação por este método modificado.

Em suma, o algoritmo de Gerrish (17) teve uma fraca passagem do plano teórico para o plano experimental, que se traduziu numa falta de robustez na estimação das taxas de mutação. Esta falta de robustez pode ter sido causada pela fraca precisão da estimação do número final de indivíduos, havendo também a possibilidade de a eficiência de plaqueamento ter sido inferior a 100% e esta, infelizmente, é difícil de quantificar experimentalmente. Mesmo considerando este obstáculo, a adopção de outras formas de medição do número final de células e a utilização, quer de um maior número de culturas, quer de um maior volume de cada cultura pode ajudar a conferir maior robustez a este protocolo e melhorar a precisão da estimação do número de

mutantes e do número final de células, podendo assim melhorar globalmente a estimação da taxa de mutação.

Capítulo 5. Considerações finais

Este trabalho veio, em primeiro lugar, mostrar a primeira determinação do custo de um sinal de detecção de quórum mesmo num ambiente em que se pressupunha que a detecção de quórum não teria grande importância. A única determinação de um custo de um sinal de detecção de quórum foi realizada na Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, usando um sinal intra-específico, mas num ambiente em que a bactéria não sobreviveria sem uma protease dependente de quórum (13). Assim, aqui é também mostrada a primeira determinação de custos do sinal inter-específico AI-2. Por outro lado, aqui também foi mostrado que dificilmente existirá um efeito da comunicação inter-específica na taxa de mutação em *Escherichia coli*. Com uso do procedimento clássico de Luria-Delbrück (31) e a estimação por máxima verosimilhança (62), os resultados deixam poucas dúvidas relativamente a esta questão e o método clássico, apesar de sempre sujeito a melhorias, já tem um poder estatístico considerável. No entanto, a promessa de um procedimento modificado (10, 23) e de uma estimação muito mais precisa (10, 17) abriu uma fresta para uma possível detecção de pequenas diferenças na taxa de mutação, no caso de existirem. Infelizmente, esta nova abordagem teve uma má passagem do reduto teórico para o experimental. A aplicação deste método modificado resultou numa grande falta de robustez nas taxas de mutação obtidas, agravadas pelo facto de os intervalos de confiança não terem sido mais estreitos que no procedimento clássico. Assim, a promessa de um método de estimação de taxas de mutação com uma precisão otimizada ainda está por cumprir e a ligação do AI-2 a outro fenótipo que não a expressão do operão *lsr* fica também por descobrir. Considerando que o AI-2 não tem efeito na taxa de mutação em *Escherichia coli*, sobressai a questão de como é que a produção de um composto mutagénico não leva ao aumento da taxa de mutação. É sabido que o metilglioxal, para além de ser formado em consequência da entrada de AI-2, é também formado a partir de vários outros processos metabólicos, entre os quais se destaca a acção da metilglioxal sintase, tendo como substrato o fosfato de dihidroxiacetona, formado durante a glicólise (24). A ausência de efeitos mutagénicos na célula derivados da entrada de AI-2 sugere que esta entrada não aumenta significativamente a concentração de metilglioxal na célula. Tendo em conta que a partir do AI-2-fosfato, para além de metilglioxal, se forma também fosfoglicolato (32, 60) e que este é um inibidor competitivo da metilglioxal sintase (43), parece bastante provável que a produção destes dois compostos esteja relacionada e que o fosfoglicolato, inibindo esta enzima, tenha um efeito compensatório e permita a estabilização da concentração de metilglioxal na célula, uma vez que a produção de metilglioxal a partir do AI-2-fosfato seria compensado pela inibição da sua produção a partir da metilglioxal sintase. Desta forma, impedir-se-ia a acumulação excessiva de metilglioxal que desencadearia o efeito mutagénico.

Por outro lado, a função do operão *lsr* também permanece desconhecida, mas parece importante em *Escherichia coli* no contexto da comunicação inter-específica porque a afectação da expressão deste operão é custosa em termos de *fitness*. A importância desta função parece suficiente ao ponto de se manter *in vitro*, embora provavelmente não seja a mesma que no seu ambiente natural. Até aqui, foi sempre referida a *Escherichia coli* como sendo comensal ao nível do tracto intestinal dos mamíferos, mas esta espécie já apresenta treze estirpes diferentes conhecidas, algumas

das quais já ocupam nichos ecológicos diferentes. Destas treze, onze contêm todo o operão *lsr* no seu genoma. Uma das duas restantes é a *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC), que habita o tracto urinário de mamíferos e já não possui alguns genes do operão *lsr*. Esta estirpe internaliza AI-2 de forma muito deficiente, ao contrário das estirpes que habitam o intestino (38). Este facto abre a possibilidade de nas estirpes do tracto gastrointestinal, que coexistem com um imenso rol de espécies (14), a acção do operão *lsr* ainda trazer um benefício, enquanto que no tracto urinário, em que existirá uma interacção com um menor número de espécies, tal benefício deixe de existir, levando à perda de alguns genes do operão por acção da selecção natural. As fases do ciclo de vida no solo são fáceis de excluir, uma vez que a densidade populacional no solo é muito baixa, cerca de 20 bactérias por grama (44), o que torna improvável a obtenção de um quórum. Deste modo, o estudo da estirpe uropatogénica de *Escherichia coli* e da sua colonização do tracto urinário, em comparação com a colonização do tracto intestinal por parte das estirpes comensais, pode trazer mais informação sobre a função do operão *lsr*. Noutra estirpe de *Escherichia coli*, a entero-hemorrágica (EHEC), existe uma grande controvérsia quanto à possibilidade de o AI-2 regular a produção de factores de virulência (1, 3, 26).

Existe ainda a possibilidade de o facto de retirar AI-2 do meio ambiente ser, por si só, um mecanismo importante que favoreça a *Escherichia coli* em termos de *fitness* no tracto gastrointestinal. A capacidade de intercepção do sinal proveniente de outras espécies foi já comprovada inclusivamente com co-habitantes do tracto intestinal (58). Repare-se que todos os genes do operão *lsr* codificam proteínas com uma função genérica atribuída: LsrA, LsrB, LsrC e LsrD estão envolvidos no transporte do AI-2 para o interior da célula (52), LsrK fosforila o AI-2, LsrF e LsrG parecem ser responsáveis pelo catabolismo do AI-2 e LsrR é o repressor do operão (51, 61). Assim, a regulação da expressão de outros genes pode ter como moléculas protagonistas o AI-2-fosfato ou os resultantes do seu catabolismo. Só que todos os compostos resultantes do catabolismo do AI-2-fosfato são também intervenientes directos ou indirectos no metabolismo geral. De qualquer das formas, o efeito exclusivo do AI-2-fosfato poderia ser testado numa *Escherichia coli* em que todo o operão *lsr* seria retirado exceptuando *lsrK* e pode ser comparado com o conjunto do AI-2-fosfato e dos seus produtos de catabolismo, testável numa estirpe em que apenas teria os genes *lsrK*, *lsrF* e *lsrG* do operão. Este ensaio é possível porque o AI-2 é também transportado para o interior da célula mesmo na ausência do transportador codificado pelo operão (61).

Há ainda muitas possibilidades em relação ao efeito do AI-2 na *Escherichia coli* comensal. Porém, o seu valor adaptativo terá que existir, porque de outro modo o operão *lsr* começaria a perder-se, tal como se está a perder na estirpe uropatogénica.

Referências

1. Anand, S. K., and M. W. Griffiths. 2003. Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 85: 1-9.
2. Bachmann, B. J. 1996. Chapter 133, Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In A. Böck et al. (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd Edition. <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington DC (E. U. A.).
3. Bansal, T., P. Jesudhasan, S. Pillai, T. K. Wood, and A. Jayaraman. 2008. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 811-819.
4. Bassler, B., E. Greenberg, and A. Stevens. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* 179: 4043-4045.
5. Bassler, B. L., and R. Losick. 2006. Bacterially speaking. *Cell* 125: 237-246.
6. Bayles, K. 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology* 5: 721-726.
7. Blattner, F., G. Plunkett, C. Bloch, N. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. Glasner, C. Rode, G. Mayhew, J. Gregor, N. Davis, H. Kirkpatrick, M. Goeden, D. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462.
8. Boe, L., T. Tolkernielsen, K. M. Eegholm, H. Spliid, and A. Vrang. 1994. Fluctuation analysis of mutations to nalidixic-acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176: 2781-2787.
9. Booth, I. R., G. P. Ferguson, S. Miller, C. Li, B. Gunasekera, and S. Kinghorn. 2003. Bacterial production of methylglyoxal: a survival strategy or death by misadventure? *Biochemical Society Transactions* 31: 1406-1408.
10. Crane, G., S. Thomas, and M. Jones. 1996. A modified Luria-Delbruck fluctuation assay for estimating and comparing mutation rates. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 354: 171-182.
11. Crow, J. F., and M. Kimura. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*, 1st Edition. Harper & Row, Nova Iorque (E. U. A.).
12. Datsenko, K., and B. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6640-6645.
13. Diggle, S. P., A. S. Griffin, G. S. Campbell, and S. A. West. 2007. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450: 411-414.
14. Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini, and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* 92: 48-55.
15. Ferguson, G. P., S. Töttemeyer, M. J. MacLean, and I. R. Booth. 1998. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Archives of Microbiology* 170: 209-218.
16. Freter, R., H. Brickner, J. Fekete, M. M. Vickerman, and K. E. Carey. 1983. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infection and Immunity* 39: 686-703.
17. Gerrish, P. 2008. A simple formula for obtaining markedly improved mutation rate estimates. *Genetics* 180: 1773-1778.

18. González Barrios, A., R. Zuo, Y. Hashimoto, L. Yang, W. Bentley, and T. Wood. 2006. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology* 188: 305-316.
19. Hansen, R., and J. Hayashi. 1962. Glycolate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 83: 679-687.
20. Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics, 4th Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MS (E. U. A.).
21. Hopper, D. J., and R. A. Cooper. 1971. Regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase - new control site in glycolysis. *FEBS Letters* 13:213-216.
22. Jones, M. E., S. M. Thomas, and K. Clarke. 1999. The application of a linear algebra to the analysis of mutation rates. *Journal of Theoretical Biology* 199: 11-23.
23. Jones, M. E., S. M. Thomas, and A. Rogers. 1994. Luria-Delbrück fluctuation experiments - design and analysis. *Genetics* 136: 1209-1216.
24. Kalapos, M. P. 1999. Methylglyoxal in living organisms - Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters* 110: 145-175.
25. Keller, L., and M. Surette. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 4: 249-258.
26. Kendall, M., D. Rasko, and V. Sperandio. 2007. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3 and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 75: 4875-4884.
27. Kim, S., S. Lee, Y. Kim, C. Kim, P. Ryu, H. Choy, S. Chung, and J. Rhee. 2003. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Molecular Microbiology* 48: 1647-1664.
28. Kubanek, J., and T. W. Snell. 2008. IV. 29, Quorum sensing in Rotifers. *In* Winans, S. C. et al. (ed.) *Chemical communication among bacteria*. ASM Press, Washington, DC (E.U.A.).
29. Le Conte, Y., Z. Huang, and G. E. Robinson. 2008. IV. 30, "Quorum Sensing" in Honeybees: Pheromone Regulation of Division of Labor. *In* Winans, S. C. et al. (ed.) *Chemical communication among bacteria*. ASM Press, Washington, DC (E.U.A.).
30. Lenski, R. E., M. R. Rose, S. C. Simpson, and S. C. Tadler. 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *American Naturalist* 138: 1315-1341.
31. Luria, S., and M. Delbruck. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
32. Marques, J.. 2007. Termination of the AI-2 signaling cycle in enteric bacteria. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa*.
33. Mathews, C. K., K. E. Van Holde, and K. G. Ahern. 2000. *Biochemistry*, 3rd Edition. Benjamin Cummings, São Francisco (E.U.A.).
34. Miller, S., K. Xavier, S. Campagna, M. Taga, M. Semmelhack, B. Bassler, and F. Hughson. 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell* 15: 677-687.
35. Monds, R. D., and G. A. O'Toole. 2008. I. 8, Metabolites as intercellular signals for regulation of community-level traits. *In* Winans, S. C. et al. (ed.) *Chemical communication among bacteria*. ASM Press, Washington, DC (E.U.A.).

36. Papoulis, A., Y. Alabed, and R. Bucala. 1995. Identification of N-2-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end-product. *Biochemistry* 34: 648-655.
37. Pellicer, M. T., M. F. Nunez, J. Aguilar, J. Badia, and L. Baldoma. 2003. Role of 2-phosphoglycolate phosphatase of *Escherichia coli* in metabolism of the 2-phosphoglycolate formed in DNA repair. *Journal of Bacteriology* 185: 5815-5821.
38. Pereira, C., A. de Regt, P. Brito, S. Miller, and K. Xavier. 2009. Identification of functional LsrB-like autoinducer-2 receptors. *Journal of Bacteriology* doi:10.1128/JB.00976-09.
39. Pope, C., D. O'Sullivan, T. McHugh, and S. Gillespie. 2008. A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1209-1214.
40. Rajamani, S., J. Zhu, D. Pei, and R. Sayre. 2007. A LuxP-FRET-based reporter for the detection and quantification of AI-2 bacterial quorum-sensing signal compounds. *Biochemistry* 46: 3990-3997.
41. Rickard, A., R. Palmer, D. Blehert, S. Campagna, M. Semmelhack, P. Eglund, B. Bassler, and P. Kolenbrander. 2006. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular Microbiology* 60: 1446-1456.
42. Ryu, K. S., C. Kim, I. Kim, S. Yoo, B. S. Choi, and C. Park. 2004. NMR application probes a novel and ubiquitous family of enzymes that alter monosaccharide configuration. *Journal of Biological Chemistry* 279:25544-25548.
43. Saadat, D., and D. H. T. Harrison. 2000. Mirroring perfection: The structure of methylglyoxal synthase complexed with the competitive inhibitor 2-phosphoglycolate. *Biochemistry* 39:2950-2960.
44. Savageau, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell-types and molecular mechanisms of gene control. *American Naturalist* 122: 732-744.
45. Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette, and B. L. Bassler. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology* 41: 463-476.
46. Schrag, S. J., V. Perrot, and B. R. Levin. 1997. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 264: 1287-1291.
47. Severinov, K., M. souskho, A. Goldfarb, and V. Nikiforov. 1993. Rifampicin region revisited - new rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA-polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 14820-14825.
48. Sniegowski, P., P. Gerrish, and R. Lenski. 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387: 703-705.
49. Sprague, G. F., and S. C. Winans. 2006. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & Development* 20: 1045-1049.
50. Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. Gouyon, and B. Godelle. 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 387: 700-702.
51. Taga, M., S. Miller, and B. Bassler. 2003. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 50: 1411-1427.

52. Taga, M., J. Semmelhack, and B. Bassler. 2001. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 42: 777-793.
53. Tannock, G. W., C. Crichton, G. W. Welling, J. P. Koopman, and T. Midtvedt. 1988. Reconstitution of the gastrointestinal microflora of lactobacillus-free mice. *Applied and environmental microbiology* 54: 2971-2975.
54. Vendeville, A., K. Winzer, K. Heurlier, C. Tang, and K. Hardie. 2005. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3: 383-396.
55. Waters, C., and B. Bassler. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 319-346.
56. Whitchurch, C., T. Tolker-Nielsen, P. Ragas, and J. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295: 1487-1487.
57. Winzer, K., K. Hardie, and P. Williams. 2003. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 53: 291-396.
58. Xavier, K., and B. Bassler. 2005. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature* 437: 750-753.
59. Xavier, K., and B. Bassler. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* 6: 191-197.
60. Xavier, K., S. Miller, W. Lu, J. Kim, J. Rabinowitz, I. Pelczer, M. Semmelhack, and B. Bassler. 2007. Phosphorylation and processing of the quorum-sensing molecule autoinducer-2 in enteric bacteria. *ACS Chemical Biology* 2: 128-136.
61. Xavier, K. B., and B. L. Bassler. 2005. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187: 238-248.
62. Zheng, Q. 2005. New algorithms for Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Mathematical Biosciences* 196: 198-214.
63. Zhu, J., M. Miller, R. Vance, M. Dziejman, B. Bassler, and J. Mekalanos. 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3129-3134.

Anexos

Anexo 1 – Número de mutantes obtidos nas cinquenta culturas em cada ensaio pelo protocolo clássico.

Ensaio 1

Selvagem

3	3	2	0	6	15	22	0	0	3	4	29
23	4	14	7	12	21	7	4	119	31	83	12
2	4	2	11	19	2	2	2	15	20	2	3
5	1	5	56	15	29	5	7	75	9	10	8
5	1										

$\Delta luxS$

7	9	364	29	34	8	17	21	11	2	2	6
4	19	3	30	4	217	5	58	5	6	6	8
22	6	10	9	0	14	4	57	3	5	0	19
12	13	1	11	1	1	10	15	18	22	2	95
8	5										

$\Delta rbsD$

2	7	9	6	7	6	4	7	4	3	3	0
1	0	34	6	15	5	5	4	5	1	2	5
9	8	1	2	4	1	0	5	5	5	7	2
5	11	7	20	1	8	183	25	9	2	36	19
25	34										

Ensaio 2

Selvagem

5	4	83	6	11	9	47	171	6	7	21	28
10	4	9	11	33	15	15	1	156	42	19	13
10	28	16	7	13	30	35	22	36	2	6	4
4	199	140	27	8	10	1	11	2	49	1	2
13	0										

$\Delta luxS$

22	46	4	3	2	31	11	10	754	10	30	11
12	6	45	67	36	12	31	10	75	13	8	206
81	25	4	8	40	1413	16	407	21	14	16	97
37	19	8	13	9	21	77		11	7	16	11
36	16										

$\Delta rbsD$

310	2	7	3	14	3	33	92	63	0	6	12
13	4	16	10	5	10	23	8	306	20	29	13
21	6	9	18	27	106	18	24	36	31	12	42
0	10	17	39	28	69	57	6	6	9	7	126
197	18										

Anexo 2 – Tabelas com valores relativos às taxas de mutação estimadas pelo protocolo clássico.

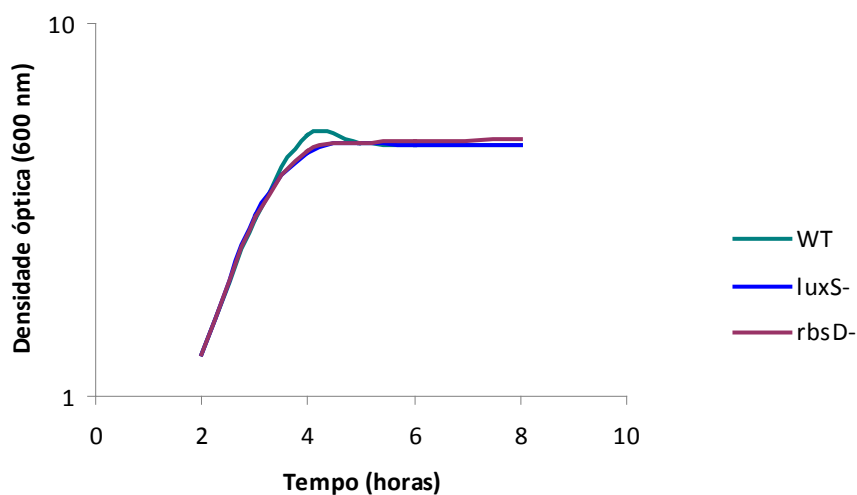
Ensaio 1

Genótipo	m	Intervalo de confiança 95%	N_i	N_f	Coefficiente de variação (N_f)
Selvagem	2,88	2,25 – 3,58	27720	$5,60 \times 10^8$	44,639 %
$\Delta luxS$	3,41	2,7 – 4,2	58160	$6,05 \times 10^8$	22,31 %
$\Delta rbsD$	2,54	1,98 – 3,17	60120	$6,42 \times 10^8$	21,101 %

Ensaio 2

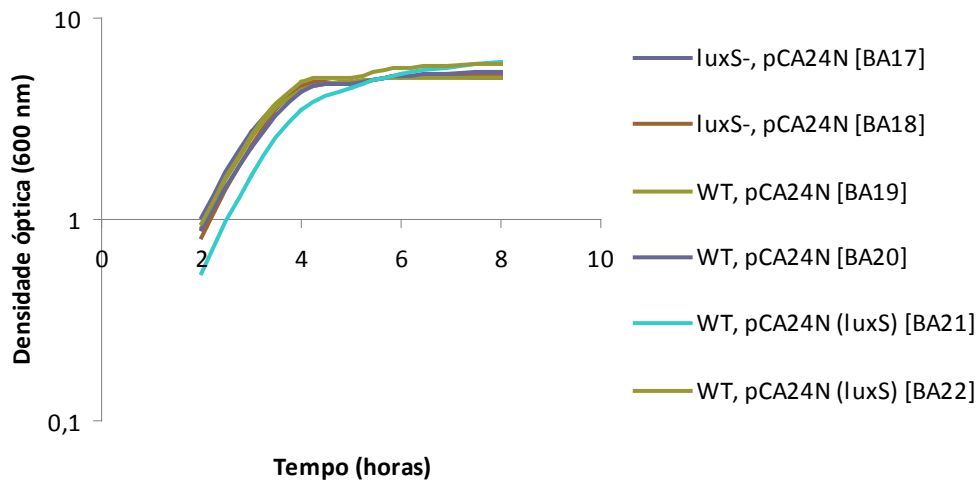
Genótipo	m	Intervalo de confiança 95%	N_i	N_f	Coefficiente de variação (N_f)
Selvagem	4,1	3,27 – 5,01	46280	$6,57 \times 10^8$	44,26 %
$\Delta luxS$	5,97	4,89 – 7,14	56560	$8,40 \times 10^8$	53,5457 %
$\Delta rbsD$	4,98	4,02 – 6,03	65040	$8,99 \times 10^8$	24,218 %

Anexo 3 – Curvas de crescimento das estirpes selvagem (WT) e dos mutantes em *luxS* e em *rbsD*, realizadas paralelamente aos ensaios de FRET com a proteína CLPY.

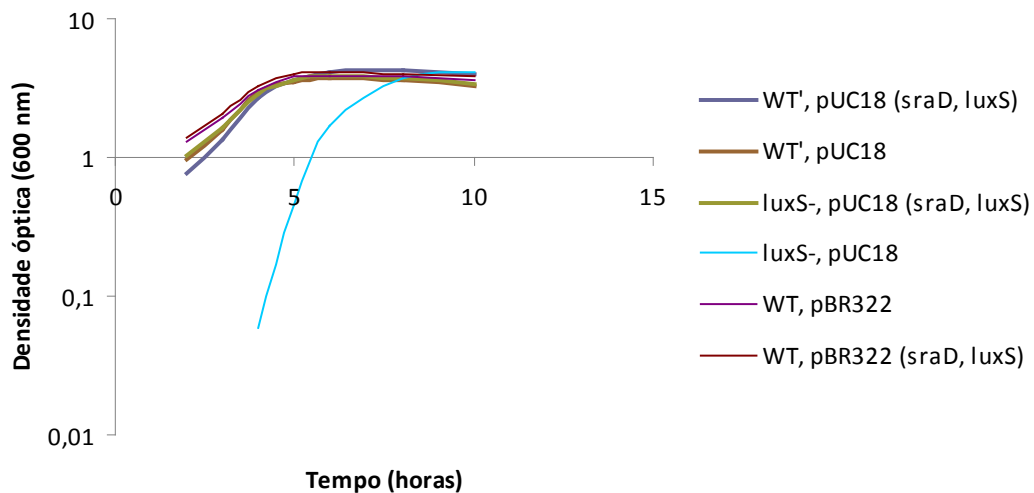


Anexo 4 – Curvas de crescimento das estirpes selvagens (WT) e mutantes em *luxS* (*luxS*⁻) com plasmídios com e sem *luxS*. A. Estirpes com plasmídios pCA24N; B. Estirpes com plasmídios pUC18 e pBR322. As estirpes com pUC18 têm um fundo genético *sraD-lacZ* e *lacZYA*⁻; como tal, as que apresentam *luxS* no cromossoma estão assinaladas como WT’.

A

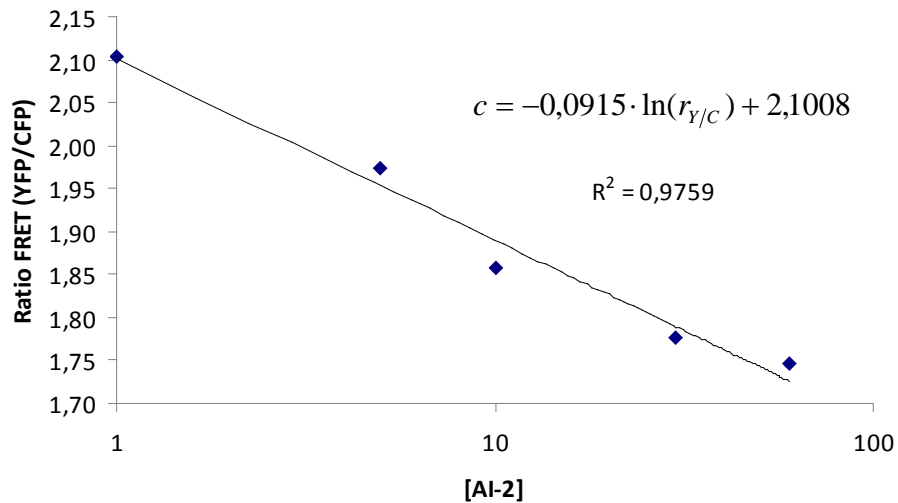


B

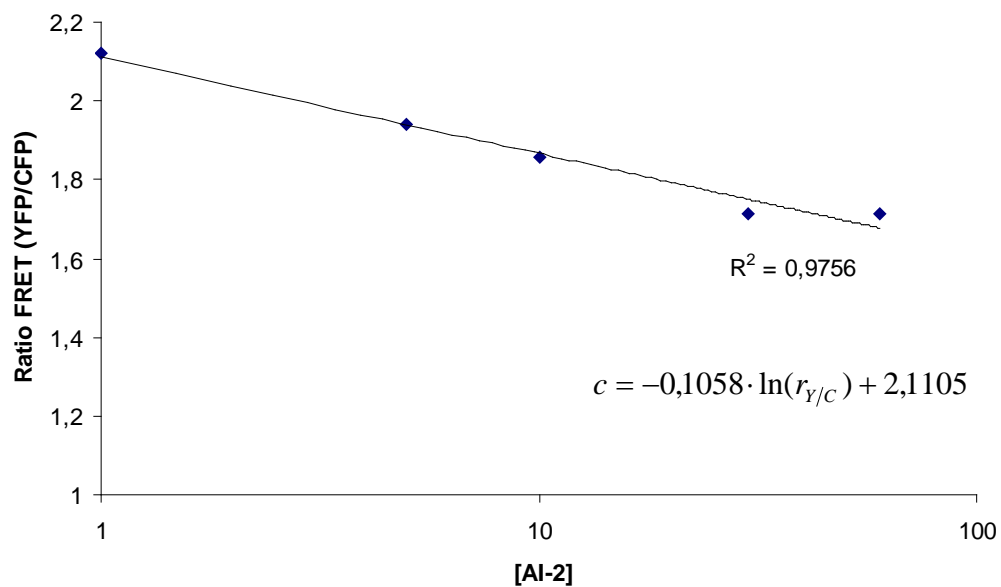


Anexo 5 – Rectas de calibração que definem a concentração de AI-2 (c) em função do *ratio* FRET ($r_{Y/C}$). As equações estão escritas nos gráficos com o seu coeficiente de determinação (r^2) correspondente. A. Recta utilizada para as culturas das estirpes sem plasmídios e nas de estirpes com plasmídios pCA24N; B. Recta utilizada para as culturas das estirpes com plasmídios pUC18 e pBR322.

A



B



Anexo 6 – Número de mutantes obtidos nas vinte culturas pelo protocolo modificado de Jones.

Ensaio 1 (p = 0,04)

Selvagem

108	33	43	34	19	13	73	218	35	45	13	19
96	46	16	23	28	10	27	16				

ΔluxS

10	11	6	36	53	11	29	25	38	20	27	28
28	12	77	12	20	7	20	12				

ΔrbsD

18	6	28	53	45	14	13	21	21	51	23	21
25	23	13	25	40	71	26	24				

Ensaio 2 (p = 0,02)

Selvagem

4	36	26	15	18	6	5	15	34	17	36	25
11	6	28	15	6	31	20	7				

ΔluxS

18	9	18	32	20	10	24	8	19	40	8	12
30	27	16	20	263	8	24	7				

ΔrbsD

48	11	49	17	4	114	34	42	29	30	7	8
12	14	70	43	19	19	30	9				

Ensaio 3 (p = 0,02)

Selvagem

10	287	6	12	11	16	10	12	6	6	8	49
12	12	27	11	13	12	20	9				

ΔluxS

3	21	9	21	22	8	19	13	3	6	7	12
13	7	48	18	7	8	12	13				

ΔrbsD

8	26	43	94	14	8	4	14	7	6	22	8
9	1	4	10	3	5	32	11				

Anexo 7 – Tabela relativa aos valores de taxa de mutação estimados no capítulo 3. Os valores de m e respectivos intervalos de confiança foram calculados posteriormente por multiplicação da taxa de mutação pelo N_f respectivo e têm apenas efeitos comparativos com os resultados do método clássico utilizado no capítulo 2. O coeficiente de variação de N_f é o quociente entre o desvio padrão deste valor pela sua respectiva média, em percentagem.

Ensaio 1 ($p = 0,04$)

Genótipo	m	Intervalo de confiança 95%	N_i	N_f	Coeficiente de variação (N_f)
WT	111,33	91,84 – 134,95	30680	$1,08 \times 10^9$	113,45 %
$\Delta luxS$	80,39	65,13 – 99,24	48280	$7,46 \times 10^9$	43,64 %
$\Delta rbsD$	102,07	94,01 – 122,89	36520	$6,71 \times 10^9$	38,88 %

Ensaio 2 ($p = 0,02$)

Genótipo	m	Intervalo de confiança 95%	N_i	N_f	Coeficiente de variação (N_f)
WT	101,61	82,47 – 125,21	38920	$5,49 \times 10^9$	41,77 %
$\Delta luxS$	91,50	72,84 – 114,95	31160	$2,32 \times 10^9$	109,42 %
$\Delta rbsD$	74,40	57,59 – 96,11	20240	$4,11 \times 10^9$	97,62 %

Ensaio 3 ($p = 0,02$)

Genótipo	m	Intervalo de confiança 95%	N_i	N_f	Coeficiente de variação (N_f)
WT	111,21	88,08 – 140,40	31580	$3,27 \times 10^9$	83,49 %
$\Delta luxS$	131,90	107,37 – 162,05	39600	$7,15 \times 10^9$	38,69 %
$\Delta rbsD$	138,72	110,66 – 173,90	29080	$4,86 \times 10^9$	77,10 %