

**A baktériumok quorum érzékelésének  
ágens-alapú modellezése**



Bihary Dóra

*Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei*



Témavezető:

Dr. Pongor Sándor

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM  
INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKAI KAR

Budapest, 2014

## 1. Bevezetés

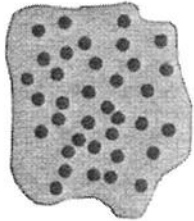
Sok egysejtű élőlény, többek között a baktériumok esetén is megfigyelhetjük, hogy többféle faj előszeretettel tömörül közös kolóniákba, melyeket az angol szaknyelv „konzorciumoknak” nevez (multispecies consortia). A konzorciumban való együttélés lehet előnyös minden résztvevő faj számára, például ha szimbiózisban élve előnyösebben tudják a környezeti nyersanyagokat kiaknázni, vagy adott esetben hatóságosabban tudnak megtámadni egy gazdaszervezetet. Ilyenkor stabilan együtt élő populációkat figyelhetünk meg. A konzorciumot alkotó fajok, sőt az egyes sejtek között azonban versengés folyik a környezeti erőforrások – például a tápanyagforrás vagy az élőhely – birtoklásáért. Ez időnként a fajok térbeli szeparálódását, szegregációját esetleg egyes fajok teljes kiszorítását, kihalását is eredményezheti.

Az így kialakuló bakteriális populációk vizsgálata napjainkban fontos feladat mind a laboratóriumi, genomiális, mind pedig a számítógépes modellezés területén, mert az így szerzett tapasztalatok elősegítik a bakteriális fertőzés mechanizmusok megértését a növényi-, az állati-, illetve az emberi betegségek esetében is.

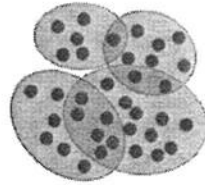
A bakteriális közösségek tagjai kémiai jelekkel kommunikálnak és egyéb, a sejtből kibocsátott faktorok, ún. közjavak révén kooperálnak egymással. Ennek legjobban ismert formája a quorum-érzékelés, elterjedt angol nevén quorum sensing (QS). A jelmolekulák koncentrációjának érzékelésével az egyedek gyakorlatilag a sejtsűrűséget is érzékelik, és ennek révén el tudják dönteni, elegenden vannak-e egy feladat elvégzéséhez (a quorum szó eredetileg „döntőképes létszám”-ot jelent). A

QS jelenségéért a Gram-negatív baktériumoknál egy pozitív visszacsatolásban álló gén páros, a *luxI* és a *luxR* felelős, melyek egy pozitív visszacsatolás, úgynevezett „autoindukciós kör” alatt állnak. A *luxI* gén a jel termelését végzi, mely egy bizonyos koncentráció felett, a LuxR fehérjéhez köt. Az így kialakult komplex számos gén működését szabályozza fel, melynek hatására például intenzívvé válhat a sejtek mozgása, metabolizmusa, osztódása is. Legfontosabb azonban a sejtek által kiválasztott anyagok, „közjavak” termelése, mint amilyenek például a felületaktív anyagok, rhamnolipidek, vagy bizonyos emésztő enzimek. Ez tipikusan kooperációs jelenség. A *luxI* és *luxR* gének szerepét a deléciós mutációk bevezetésével vizsgálhatjuk. Azok a sejtek, melyeknél a *luxI* gént töröljük, nem termelnek jelet, ezért „signal negative”-nak (SN) nevezzük őket. Az SN mutánsok képesek egyéb egyedek által termelt jelszintre reagálni a kooperációs faktor molekulák („közjavak”) termelésével. Vagyis ezek az egyedek nem kommunikálnak, de kooperálnak. Azok az egyedek, melyeknél a *luxR* gént töröljük, nem képesek reagálni a jelre, ezért „signal blind”-nak (SB) szokták őket nevezni. Azt mondhatjuk, hogy ezek az egyedek se nem kommunikálnak, se nem kooperálnak. Fontos tudnunk, hogy deléciós mutációval rendelkező egyedek mindig valamekkora energiatöbbletet tudnak felhalmozni a vad típusú egyedekkel szemben. Ez az energiatöbblet az SB egyedek esetén magasabb, mint az SN-eknél.

Csoportunk a bakteriális közösségek stabilitásának alapkérdéseit kutatja számítógépes modellek segítségével. Hosszú távú célunk a baktériumfajok stabilis együttélésének minél pontosabb megértése, a laboratóriumi modellkísérletek pontos magyarázata. Ennek a programnak



**Globális kommunikáció**



**Lokális kommunikáció**

1.1. ábra. Globális és lokális kommunikáció közötti különbségek.

a keretein belül én egy ágens-alapú modellrendszer továbbfejlesztésével foglalkoztam, és ezt használtam fel a több jellel kommunikáló rendszerek és különböző laborkísérletek szimulációjára.

A munkám során ismerttetett kísérletek mind abba az irányba mutatnak, hogy a lokálisan jól kommunikáló és kooperáló közösségek könnyen kialakulnak a quorum-érzékelésre képes baktériumok között. Érdekes módon közösségek, melyek bizonyos paraméterezés mellett stabil kolóniákat alakítanak ki elveszíthetik stabilitásukat, ha az ágensek mozgásának hatására a populáció kevertsége bizonyos kritikus küszöb fölé emelkedik. Mindezek arra engednek következtetni, hogy a lokális kommunikáció – a globális kapcsolatokkal ellentétben – fontos a közösségek stabilizálásában, továbbá ugyanezen jelenség magyarázatot adhat a kolóniák rezisztenciájára az esetlegesen fellépő deléciós mutációkkal szemben. A lokális és globális kommunikáció közötti különbséget a 1.1 ábra mutatja.

## 2. Módszerek

Az általunk eltervezett modellezési feladat a bakteriális kommunikáció és kooperáció, konkrétan a quorum sensing leírása volt.

A modell megvalósítására egy ágens-alapú modell létrehozását választottuk, mely esetén a baktériumokat kétdimenziós térben mozgó ágensekkel, a környezetükben található molekulákat (tápanyagok, jelek, faktorok) pedig reakció-diffúziós egyenletek szerint változó kontinuumként írjuk le. A modell ágensei, vagyis a baktériumok esetén diszkrét állapotokat definiáltunk, mely állapotok közötti váltást a környezeti jelanyagok koncentrációjának függvényében valósítják meg az egyedek. Ez a megközelítés tulajdonképpen az egyedek belső állapotainak szinkronizálását is jelenti.

A modellnek született egy nyílt és egy zárt megvalósítása is, melyek a környezet leírásában különböznek egymástól. A nyílt tér esetén a környezet egy két dimenzióban értelmezett, hosszú, téglalap alakú táptalaj, melyet egy egyik oldalán nyitott hengerfelületként képzelhetünk el. A táptalajt cellastruktúrával írjuk le, ahol egy adott cellán belül környezeti anyagok (jel, faktor és tápanyag) koncentrációs szintje állandó, azok diffúziója a cellák között valósul meg. A zárt teret egy toroid felületként értelmezhetjük, ahol azonos koncentrációs szinteket definiáltam a teljes felületen.

A szimulációk Matlab nyelven íródtak. Amikor nagy teljesítmény elérésére volt szükségünk, a szimulációkat a trieszti ICGEB-ben (International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology) található számítógép klaszteren futtattuk le, ahol párhuzamosan 20 db szimulá-

ció futtatására volt lehetőségünk, így jelentősen fel tudtuk gyorsítani az olykor néhány ezres nagyságrendű szimuláció-sereg lefutását.

### 3. Új tudományos eredmények

#### 1. tézis: Módszertani fejlesztések.

**A szerző kapcsolódó publikációi:** [1, 2]

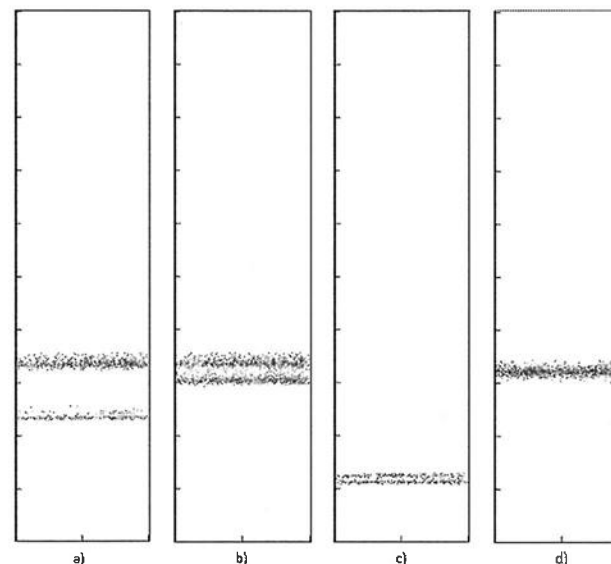
Munkám során újszerű szimulációs elveket kellett alkalmaznom, amelyekhez a meglévő ágens-alapú modellt módosítani kellett, és alkalmassá kellett tenni nagyszámú szimulációs kísérlet kivitelezésére, valamint az eredmények egyszerű bemutatására.

*1.1. Több kémiai anyaggal kommunikáló és kooperáló baktérium modellt fejlesztettem ki.*

Csoportunk eredeti modell-rendszere homogén baktérium kolóniák növekedését szimulálta, és a baktérium modellek (ágensek) egyetlen kémiai jellel kommunikáltak, és egy másik kémiai anyaggal, faktorral kooperáltak. Ezt a rendszert fejlesztettük tovább oly módon, hogy az több jelet és több faktort is tudjon tartalmazni, ezáltal lehetővé vált az „egymás nyelvét értő” baktériumfajok versenyének modellezése.

*1.2. A nagyszámú szimulációs eredmények kiértékelésére vizualizációs és numerikus módszereket vezettem be.*

A több-jelű kísérleti rendszerek teljes paraméterterének kiértékeléséhez nagyon nagyszámú szimulációt kellett elvégezni. Annak érdekében,



3.1. ábra. Különbéféle paraméterezésű LJ és WCA potenciálok esetén megfigyelhető végpopulációs elrendeződések a táptalajon.

hogy az így kapott eredményeket fel tudjam dolgozni, egyrészt numerikus módszereket vezettem be a populációk térbeli szétválásának, illetve időbeli stabilitásának jellemzésére, másrészt egy ábrázolási megoldást dolgoztam ki, mely során többdimenziós hőterképeket alkalmaztam.

*1.3. Megvalósítottam a baktériumok térbeli versengésének fizikai potenciálfüggvények felhasználásával történő ábrázolását.*

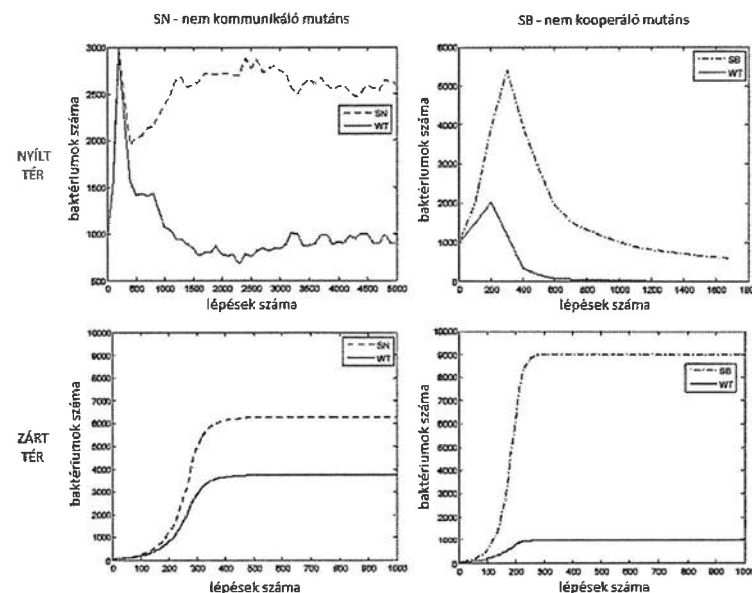
Eredeti modellrendszerünkben az ágensek véletlenszerűen mozog-

tak, és szaporodásuknál a számuk egy adott térrészben maximálva volt. Bevezettem egy modellt, ahol a baktérium ágensek mozgását a fizikából kölcsönzött potenciálfüggvényekkel írjuk le, oly módon hogy az azonos fajok között a Lennard-Jones (LJ) potenciállal leírható vonzó-taszító kölcsönhatások, a különböző fajok között a Weeks-Chandler-Andersen (WCA) potenciálhoz hasonló taszító- és semleges kölcsönhatások lépnek fel. Ez a rendszer realistább az előzőnél, de a főbb kísérleti eredmények (homogén populáció, szegregáció, ld. 3.1 ábra) a kettőben azonosak.

**2. tézis:** Kimutattam, hogy a baktérium populációk versengése más eredményeket mutat nyílt és zárt térben, ami megmagyarázza a biológiai szakirodalomban jelentkező látszólag ellentétes kísérleti következtetéseket.

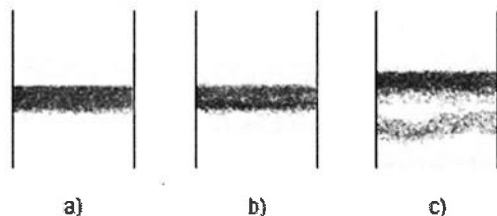
**A szerző kapcsolódó publikációja: [3]**

A quorum-érzékelést hagyományosan deléciós – SN és SB – mutánsok segítségével szokták vizsgálni, melyekről részletesebben a bevezetésben esik szó. Ezek a mutánsok a természetben nem, vagy csak ritkán található meg. Lombik-kísérleteknél viszont mindkét mutáns típust életképesebbnek szokták találni, mint az eredeti, vad típusú baktériumokat, ugyanakkor nyílt felületen, agar lemezen vizsgálva az SN típus stabilisan együttműködik a vad típussal, az SB típus hatására viszont összeomlik a populáció, miután a WT sejtek kiszorulnak. Ágens-alapú szimulációval viszont ki lehetett mutatni, hogy a különbségek a nyílt és zárt terek eltéréseinek köszönhetőek. Ez azzal magyarázható, hogy egy zárt tér, pl. egy lombik vagy kémcső telíthető a jelanyaggal és



3.2. ábra. Vad típusú és mutáns egyedek versengésének eredményei nyílt (fent) és zárt (lent) térben; a kísérletek során a két faj – WT (folytonos görbe) és SN (szaggatott görbe), vagy SB (pont-vonal) mutáns – mindig azonos arányban volt megtalálható a kezdeti populációban; az ábrákon a populációk méretének alakulása látható a lépésszám függvényében.

a kooperációs anyaggal (faktorral), és ezután már nincs szükség quorum érzékelésre: Így a lombik kísérletek jól kevert rázatott kultúráiban a természetben életképtelen mutánsok a laborkísérletekben is jobban tudnak nőni, mint a vad típus. A négyféle versengés eredményei a 3.2



3.3. ábra. Két fajtól álló populációk versengése során kialakuló mintázatok; a) kevert populáció, b) szegregáció, c) egyik faj győzelme.

ábrán figyelhetőek meg.

**3. tézis:** Közös kémiai jelekkel kommunikáló és kooperáló ágensekkel vizsgáltam az egymás nyelvét kölcsönösen értő baktériumok populációinak versengését. Azt találtam, hogy a szimulációs paraméterter nagy részében létezik stabil kevert populáció, a jelek és kooperációs anyagok megosztása tehát segíti a fajok együttélését.

**A szerző kapcsolódó publikációja:** [2]

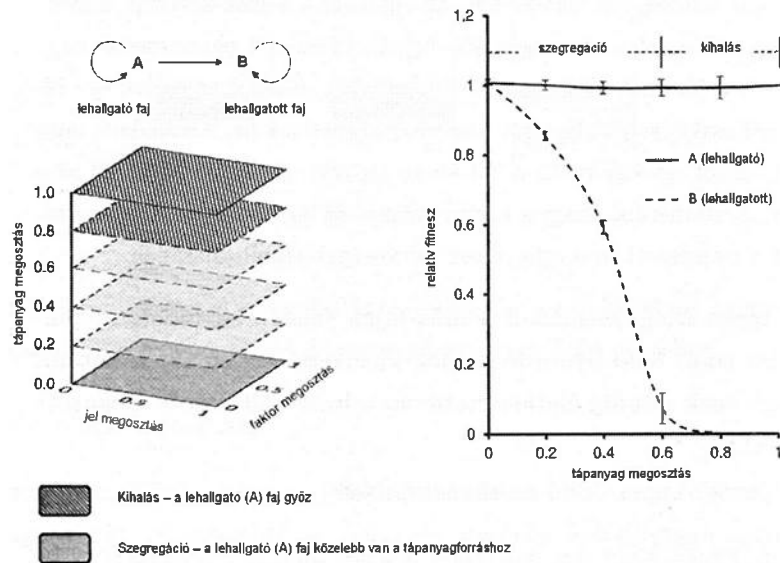
A baktériumközösségek egyik érdekes jelensége, hogy egyes fajok részben tudnak reagálni a más fajok által kibocsátott jelekre, és fel tudják használni a más fajok által termelt kooperációs anyagokat is, mint amilyenek a kibocsátott enzimek, fémkötő vegyületek, stb. A elméleti biológiai elvárás szerint két versengő faj közül csak egy marad életben (Gause-féle kompetitív kizorítás elve). A szimulációk során azt figyeltem meg, hogy a kommunikáló és kooperáló fajok között többféle

stabilis közösség is kialakulhat, az egyiknél a sejtek keverten helyezkednek el, a másikonál szegregáció figyelhető meg. A paraméterter nagy részében léteznek ezek a stabilis populációk, viszont az esetek egy részénél csakugyan kompetitív kizorítás következik be. A kialakuló mintázatokról egy-egy példa a 3.3 ábrán látható. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a kommunikáció és kooperáció szerepet játszhat a természetben megfigyelhető közösségek stabilizálásában.

**4. tézis:** Megvizsgáltam a más fajok jeleire egyoldalúan reagálni tudó baktérium-modellek viselkedését, és azt találtam, hogy ezek mindig életképesebbek, mint az általuk lehallgatott fajok.

**A szerző kapcsolódó publikációja:** [2]

A természetben sok baktérium rendelkezik olyan jelérzékelő fehérjével (pl. LuxR fehérje-analóggal), amely minden valószínűség szerint külső jelekre reagál. Biokémiai vizsgálatok szerint ezek az ún. szóló luxR fehérjék más fajok jeleit is érzékelik, de nehéz olyan kísérletet tervezni, ahol ennek a jelenségnek a konkrét haszna bizonyítható lenne. A modellezési eredményeim azt valószínűsítik, hogy a más fajok jeleit egyoldalúan érzékelni, „lehallgatni” képes modellek minden körülmények között életképesebbek, mint az általuk lehallgatott fajok. Ez tehát potenciálisan magyarázza a szóló *luxR* gének gyakori előfordulását a természetben, hiszen ezek révén egy faj meg tudja találni az ilyen jelet termelő közösséget, és abban el is tud szaporodni. A 3.4 ábra az aszimmetrikus lehallgatás szimulációja során kapott eredményeket mutatja.



3.4. ábra. „B” faj lehallgatja az „A” faj QS rendszerét (jel és faktor), illetve tápanyagát. Bal oldalon a teljes paraméterter esetén látható, mikor történt kihalás, mikor szegregáció (mindig a lehallgató faj győzelméről beszélhetünk); jobb oldalon a két faj relatív fitnessének alakulását látjuk a tápanyagban való áthallás függvényében.

**5. tézis: Kimutattam, hogy a quorum-érzékelés paramétereinek beállításával kialakíthatók olyan szituációk, amikor egy faj tartósan élőszködik egy másik faj populációján, de azt nem dönti össze.**

1. táblázat. Kialakuló mintázatok a paraziták szimulációja során.<sup>1</sup>

Parazita faj-tája	Parazita egyedül	Versengés WT-vel <sup>2</sup>	Invazivitás WT-vel <sup>3</sup>
Parazita	kis egyedszám	összeomlás	összeomlás
Parazita, jel+	kis egyedszám	rajzás, egyensúly	rajzás, egyensúly
Parazita, faktor+	kis egyedszám	rajzás, egyensúly	rajzás, egyensúly
Parazita, 2. jel	kis egyedszám	rajzás, egyensúly	rajzás, egyensúly

<sup>1</sup> „jel+” és „faktor+” a magasabb jel-, illetve faktorszintre válaszoló egyedeket jelöli, a „2. jel” pedig a saját jellel kommunikáló parazitákat jelöli, melyek kikapcsolnak, ha bizonyos populációs méretet érnek el.

<sup>2</sup> kezdeti 50-50%-os eloszlás a két faj esetén

<sup>3</sup> kezdeti 4 mutáns, 1996 vad típusú egyed

A természetben azok a fajok tudnak hatékonyan élőszködni más fajokon, amelyek képesek hatékonyan elterjedni, de az áldozatukat nem pusztítják el. A quorum-érzékelésnél tanulmányozott deléciós mutánsok – különösképpen az SB egyedek – nem tekinthetők optimális parazitának, ugyanis szabadon nem élnek meg, ugyanakkor a vad típusú populációt néha összeomlasztják. A quorum-érzékelő modellek numerikus paramétereit megváltoztatva ugyanakkor előállíthatók olyan modellek, amelyek érzékelik, ha az általuk kihasznált populáció kommunikációjának vagy kooperációjának mértéke egy adott szint alá csökken, így nem döntik össze a közösséget. Mivel a természetben megfigyelt quorum-érzékelő rendszerek specifitása széles skálán mozog, ez a megfigyelés

potenciálisan megmagyarázza, miért lehetséges az időben is stabilis közösségek kialakulása.

#### 4. Az eredmények alkalmazási területei

Munkám során tehát a bakteriális kommunikációt, valamint a különböző baktérium mutációkat vizsgáltam szimulációs eszközökkel. Mint minden modell esetén, a célunk, hogy a leírt rendszer viselkedését minél pontosabban megértsük. A felállított modell segítségével a természetes körülmények között megfigyelhető baktériumok viselkedésére, az általuk kialakított kolóniák elrendeződéseire adhatunk magyarázatot.

A nyílt és zárt terek összehasonlításából származó eredmények segítségével megérthetjük például, hogyan lehetséges, hogy bizonyos, a természetben életképtelennek mutakozó fajok laboratóriumi körülmények között olykor mégis invazívak tudnak lenni.

Több faj kommunikációs anyagainak egymással való megosztása lehetőséget ad annak leírására, hogyan tudják a stabilan együtt élő közösségek egyedei egymást segíteni, illetve az egymás nyersanyagian élősködő kolóniák mikor képesek egymás mellett megélni. A megfigyelt eredmények magyarázatot adnak arra, miért érdemes az egyedeknek kevésbé specifikus érzékelő rendszerrel rendelkezniük, ez milyen előnyöket tud nyújtani nekik.

Mindemellett számos olyan elv fogalmazható meg a modell segítségével, mely nem használ ki semmiféle baktérium-specifikus megfontolást, így azzal analógiában más olyan struktúrák, rendszerek jellemzése is elképzelhető, melyek hasonló elveken alapulva működnek.

#### 5. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Pongor Sándornak, akitől rengeteg segítséget, támogatást kaptam az elmúlt évek során. Köszönettel tartozom továbbá kollégáimnak és az általam vezetett szakdolgozóknak, akiknek az együttműködése nélkül nem tudtam volna elvégezni ezt a munkát. Munkám során szinte végig közösen dolgoztam Kerényi Ádámmal (PhD hallgató, MTA SzBK, Szeged), az ő eredményei, tanácsai, valamint a vele folytatott beszélgetések rengeteg segítséget nyújtottak nekem. Végül köszönettel tartozom Juhász Jánosnak, Rétlaki Gábornak és Tóth Mariettának, akik szakdolgozatukkal segítettek munkámat.



## 6. A szerző publikációi

- [1] **D. Bihary**, Á. Kerényi, Z. Gelencsér, S. Netotea, A. Kertész-Farkas, V. Venturi, and S. Pongor, „Simulation of communication and cooperation in multispecies bacterial communities with an agent based model,” *Scalable Computing: Practice and Experience*, vol. Volume 13, no. 1, pp. 21–28, 2012.
- [2] Á. Kerényi, **D. Bihary**, V. Venturi, and S. Pongor, „Stability of multispecies bacterial communities: signaling networks may stabilize microbiomes.,” *PloS one*, vol. 8, p. e57947, Jan. 2013.
- [3] **D. Bihary**, M. Tóth, Á. Kerényi, V. Venturi, and S. Pongor, „Modeling bacterial quorum sensing in open and closed environments: potential discrepancies between agar plate and culture flask experiments.,” *Journal of molecular modeling*, vol. 20, p. 2248, July 2014.
- [4] V. Venturi, A. Kerényi, B. Reiz, **D. Bihary**, and S. Pongor, „Locality versus globality in bacterial signalling: can local communication stabilize bacterial communities?,” *Biology Direct*, vol. 5, p. 30, 2010.