

# Mikrobiális közösségek koordinációjának vizsgálata ágens-alapú modellekkel



**Juhász János**

*PhD disszertáció téziszűzet*

Témavezető:

Prof. Pongor Sándor

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM  
INFORMÁCIÓS TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKA KAR  
ROSKA TAMÁS MŰSZAKI ÉS TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Budapest, 2018

# 1. Bevezetés

A baktériumok a természet legelterjedtebb sejtjes élőlényei, melyek megtalálhatók a Föld szinte összes élőhelyén, ideértve a tengerfenék óriási baktériumszőnyegeit és az állati vagy emberi szervezetekkel együttélő mikroflórákat. Új keletű a felismerés, hogy a baktériumok nem magányos, hanem társas lények, melyek óriási, sokszor több vagy akár többtízezer fajt tartalmazó közösségekben élnek. Míg a magányosan élő sejtek elvben csak versengeni tudnak egymással pl. a helyért vagy a tápanyagokért, a közösségi életforma ezen felül megköveteli az együttműködést, a sejtek viselkedésének koordinációját, szinkronizációját is. Kutatócsoportunk alaphipotézise szerint ez az együttműködés az, amelyik képessé teszi a közösségeket olyan, látszólag meglepő feladatok megoldására, amelyre egyetlen sejt önmagában képtelen lenne. Ágens-alapú modelleket használunk, amelyekben az egységek (sejtek) egyszerű, válaszküszöböktől függő módon adnak át információt (pl. géneket vagy kémiai jelanyagokat) szomszédjaiknak.

A dolgozatomban vizsgált első jelenség az antimikrobiális anyagok (AM) elleni rezisztencia terjedése egy közösségen belül. Itt azt találtam, hogy egy közösség tagjai idővel képesek hozzászokni a közösség többi tagja által termelt faktorokhoz, és az ilyen közösség – meglepő módon – stabilis a kívülről érkező baktériumok támadásával szemben is.

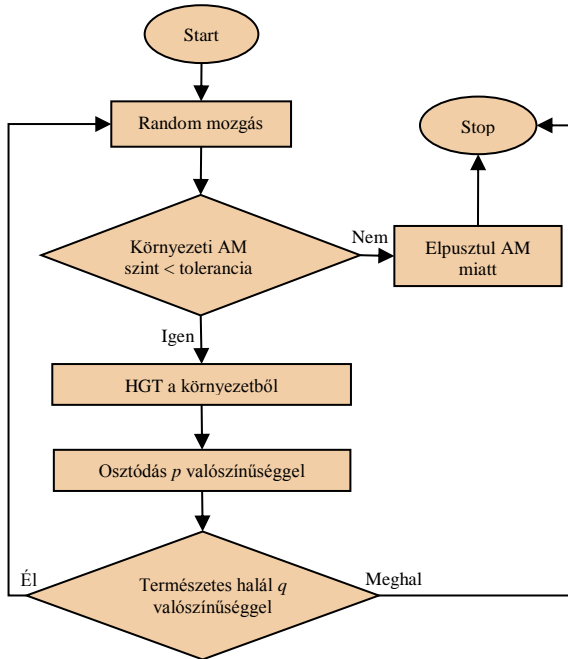
A dolgozatomban vizsgált másik kérdés az a közismert jelenség, hogy a sejtek különböző mértékben érzékenyek hasonló kémiai

anyagokra. Ez a jelenséget az un. *quorum sensing* (QS) mechanizmus vizsgálatánál írták le először, amelynél a sejtek diffundáló anyagok segítségével képesek szinkronizálni egy populáció viselkedését. Modellkísérleteim itt azt mutatták, hogy a sejtek differenciált jelérzékenysége lehetővé teszi, hogy kevésbé fit, de életképes sejtvonalak is életben maradhassanak a közösségekben, azaz a sejtek ezen „önmegtartóztatásának” jelensége egyszerű, fizikokémiai kapcsolók működésével magyarázható.

## 2. Módszerek

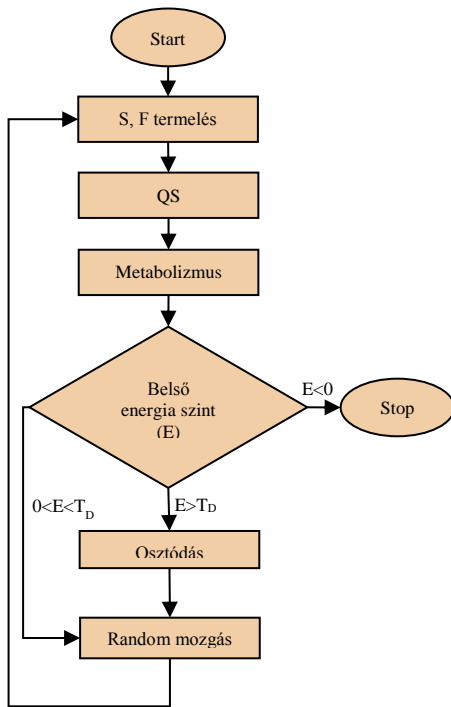
A horizontális géntranszfer (HGT) valamint a quorum sensing (QS) küszöbértékek vizsgálatára ágens-alapú számítógépes modelleket használtam. Az ágensek belső viselkedési szabályokkal rendelkező és a környezettel kölcsönható önálló döntéshozásra képes egységek, ezek írták le a baktérium sejteket.

A HGT modellt Kertész-Farkas Attilával (ICGEB, Trieszt) közösen fejlesztettem (2.1. ábra). A modellben az ágensek kezdetben adott számú véletlenszerűen kiválasztott AM és rezisztencia génpárral rendelkeznek. A szimuláció során az ágensek véletlen mozgást végeznek, osztódnak és minden lépésben megvizsgálják adott sugarú környezetüket. Ha egy ágens környezetében egy adott mennyiséget meghalad a számára ismeretlen AM-et – vagyis amelyre nem rendelkezik rezisztenciával – termelő sejtek száma, akkor az ágens elpusztul. A túlélők viszont a környezetükből véletlenszerűen átvesznek egy rezisztencia gént (HGT-rel). A szimuláció addig folytatódik, míg nem történik több AM okozta sejtthálál, tehát míg a közösség össze nem érik.



2.1. ábra: Az ágensek életciklusa a HGT modellben.

Csoportunk (Bihary Dóra, ITK, Kerényi Ádám SZBK) kifejlesztett egy *in silico* modellt a QS leírására is (2.2. ábra). Ez egy úgynevezett hibrid modell, melyben a baktériumok ágensekkel, a tápanyag, a szignálok, és faktorok pedig reakció-diffúziós egyenletekkel reprezentáltak. A modellben az ágensek érzékelik a szignál illetve faktor koncentrációkat és adott küszöbértékek felett reagálnak ezekre, úgy hogy új állapotba lépnek. Ha mind a szignál, mind a faktor elegendő mennyiségben van jelen, a sejtek egy aktív, rajzó állapotba kerülnek, ami gyorsabb mozgással és megnövekedett tápanyag felvétellel jár. A modell baktérium egy kolónia egyik ágának



2.2. ábra: Az ágensek életrajza a QS modellben.

növekedését mutatja az egyik dimenzió mentén végtelenített a másik dimenzió mentén periodikusan zárt (toroid) felületen. A sejtek fogyasztják a talajon rendelkezésükre álló tápanyagot, termelik, érzékelik a szignálokat és faktorokat, és ez alapján döntenek az állapotukról. Ha elérik az aktív állapotot, rajzani kezdenek, és haladnak előre a felületen. Ebben a

modellben vizsgáltam a különböző QS küszöbértékek hatásait, valamint bevezettem csökkent szignál és faktor termelésű részleges parazitákat (PM) valamint antibiotikum termelés révén megvalósuló negatív interakciókat is a modellbe.

Mindkét számítógépes modell Matlab programozási nyelven készült.

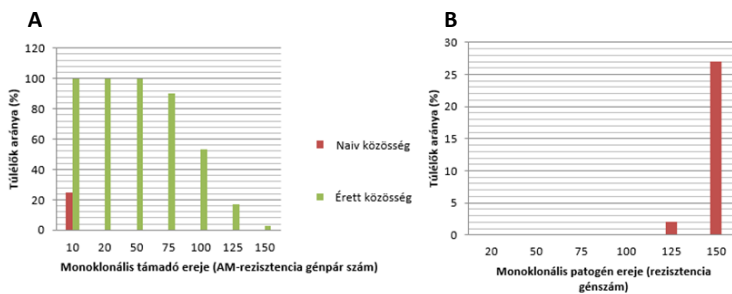
### 3. Eredmények

**Tézis 1.: Ágens-alapú számítógépes modellt fejlesztettem, mellyel megmutattam, hogy a baktériumközösségekben megfigyelhető horizontális géntranszfer révén stabil összetételű, sok fajt tartalmazó, külső hatásokkal szemben ellenálló közösségek alakulhatnak ki, melyek antibiotikum-rezisztens opportunistá patogéneket is képesek kiszorítani. Kapcsolódó publikációk: [J1], [C3], [C4]**

Úgy találtam, hogy egy nem összeszokott (naiv) közösség tagjait nagyszámú, náluk erősebb monoklonális támadó-csoport képes kiszorítani, míg egy összeszokott diverz mikrobiom meg tudja védeni magát még az egyes tagjainál jóval erősebb külső betolakodókkal szemben is (3.1.A ábra). Ennek hátterében az áll, hogy a betolakodó nem lehet rezisztens a közösségben jelen lévő összes AM-ra, ha a közösségen kívülről érkezett. Ez egybevág a biológiai tapasztalattal, miszerint a táplálékkal kívülről szervezetünkbe jutott mikroorganizmusok nagy részét nem az immunrendszer, hanem a bélflóra, mint a szervezet első védelmi vonala pusztítja el.

Az egészségügyi intézményekben komoly problémát jelentő *Clostridium difficile* fertőzést nem lehet antibiotikumokkal sikeresen és tartósan megszüntetni, egészséges donorból származó bélflóra visszajuttatásával (széklet transzplantáció) viszont jó eredménnyel gyógyítják. Az egészséges, diverz, teljes metabolikus kapacitással

rendelkező, sok AM-t termelő mikrobiom ugyanis képes kiszorítani az egyes fajoknál ellenállóbb, de a teljes közösségnél kevésbé erős patogént. Szimulációs eredményeim is alátámasztják ezt, mutatva a HGT útján kialakult összeszokott közösség erejét mind külső, mind belső támadókkal szemben (3.1.B ábra).



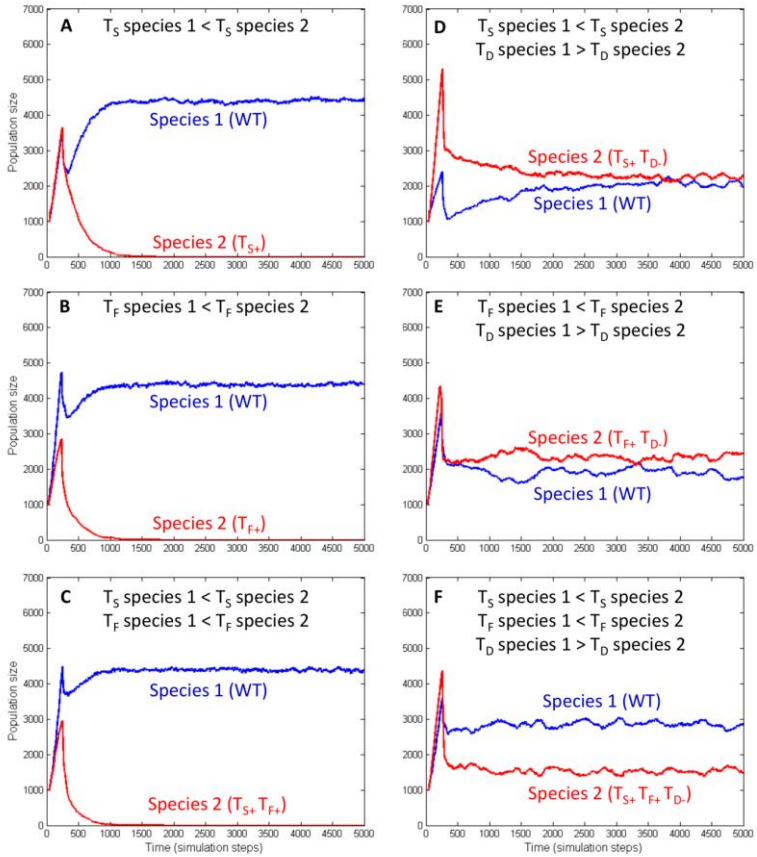
3.1. ábra: A: Összeszokott és naiv (nem összeszokott) közösségek válasza a különböző erősségű monoklonális támadókra. B: Összeszokott közösség és monoklonális multirezisztens patogén kölcsönhatása.



**Tézis 2a.: Ágens-alapú modellel kimutattam, hogy a bakteriális jelek és kooperációs faktorok iránti eltérő érzékenység lehetővé teszi a különböző életképességű fajok együttélését, valamint munkamegosztás kialakulását az élettérben részlegesen szeparált közösségek között. Ez a jelenség értelmezhető a mikrobák egyfajta „önmérsékleteként” mivel lehetővé teszi a kevésbé életképes fajok megmaradását a közösségben.**

**Kapcsolódó publikáció: [J2]**

Kísérleteket végeztem két sejtípussal, amelyek vagy csak a szignál, vagy csak a faktor, vagy mindkettő érzékelési küszöbértékeiben eltértek egymástól. Ekkor minden esetben az alacsonyabb küszöbvel rendelkező, előbb reagáló faj szorította ki másikat. Ha viszont az előbb reagáló faj általános fitnesze kisebb volt a később reagálóénál, például ritkábban (nagyobb energiaszintnél) osztódott, akkor lehetséges volt a tartós együttélés a fajok közt (3.2. ábra). Ennek oka, hogy míg az első esetben az alacsonyabb küszöb értékek egyértelműen szelekciós előnyt jelentettek, addig a másik esetben ez az előny csak részleges volt. Ezzel megmutattam, hogy a különböző fajokban megfigyelhető különböző QS válasz küszöbök elősegíthetik a fajok tartós együttélését egy mikrobiomban.



3.2. ábra: Versengés vad típusú (WT, kék) és magasabb szignál ( $T_S$ ) (A,D), faktor ( $T_F$ ) (B,E), vagy szignál és faktor (C,F) küszöbkel rendelkező (piros) sejtípusok közt, azonos (A,B,C) és eltérő (D,E,F) osztódási küszöb ( $T_D$ ) esetén.

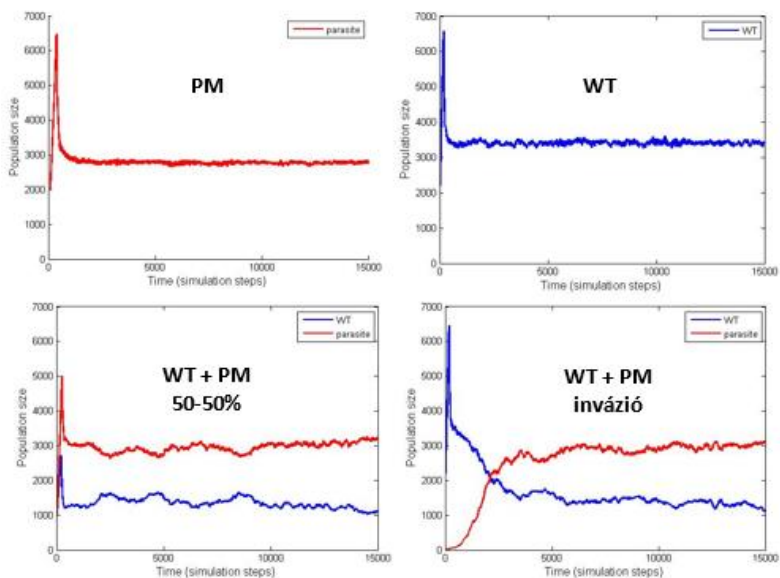
**Tézis 2b.: Ágens-alapú modellel vizsgáltam csökkent kooperációs és kommunikációs képességük révén fittebb sejtek hatását a rajzó baktériumközösség szerkezetére. Kimutattam, hogy ezek az önállóan is életképes (rajzó) sejtek akkor tudnak tartós együttélést kialakítani erősebben kommunikáló és kooperáló sejtekkel, ha moderáltan viselkednek, például magasabb jelszint esetén aktiválódnak. Ezzel a korábbi kísérleti elrendezésnél reálisabb, a természetes közösségekben megfigyeltekre jobban hasonlító együttműködési formát írtam le.**

**Kapcsolódó publikációk: [J2], [C1]**

A 3.3. ábrán PM és WT (vad típusú) sejtek interakciója látható. A mutáns magában is képes rajzani, bár lényegesen lassabban és kissé később indulva, mint a WT, valamint kis mennyiségben közé kerülve el is terjed benne jellemző WT/PM arányt alakítva ki. Az együttélés kulcsa, hogy a PM-sal szemben kevésbé életképes vad típusú sejtek korábban kezdenek rajzani, így ők kerülnek az aktív zóna elejére.

Az így kialakult részleges fizikai szeparáció feladatmegosztást is jelent két sejtípus között. Az együttesen rajzó kolónia sebességét az elől haladó kisebb számú WT határozza meg, és ez a sebesség egyenlő azzal, mint amikor csak egyedül halad. A nagyszámú parazita, azaz részleges mutáns pedig követi az „úttörőket”, gyorsabban osztódva, mint amire magában képes lenne, és hatékonyabban hasznosítva a rendelkezésére álló tápanyagot, mint a WT. A kevert kolóniák

egyedszáma így nagyobb lesz, mint az egy féle sejtet tartalmazóké. A fenti megfigyelések az egy közösségen belüli eltérő QS jel érzékenység és kooperációs faktor termelés közösségi szintű előnyeire utalnak.

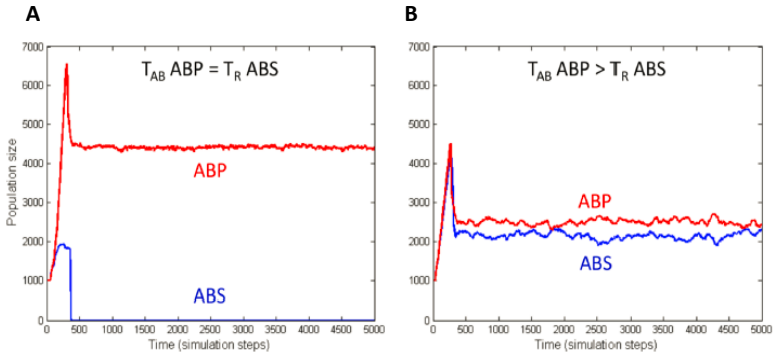


3.3. ábra: 40-es szignál küszöbű WT-65%-os részleges mutáns (piros) életképessége egyedül, invazivitása, valamint tartós együttélése WT (kék) sejtekkel.

**Tézis 2c.: Ágens-alapú modellel kimutattam, hogy antibiotikum termelő és arra érzékeny fajok együttélése is lehetséges, ha a két faj kooperációs rendszerei kompatibilisek, és az antibiotikum termelő faj bizonyos körülmények között kevésbé életképes a másiknál.**

**Kapcsolódó publikációk: [J2], [C2]**

A vizsgálathoz együttélésre képes faj-párokat alkalmaztam. Ha a rendszerhez hozzáadtam az antibiotikum révén megvalósuló negatív interakciót (pl. az egyik faj AB termelése gátolja a másik fajt), akkor az AB termelő faj rendszerint kiszorította az AB-re érzékenyt. Az AB termelés beindulásának küszöbértékét emelve viszont ismét létrejött a stabilis együttműködés (3.4. ábra). Ez itt az AB termelő faj „önmérsékletének”, moderációjának tekinthető, mivel AB-re érzékeny faj is elérhetett egy rajzáshoz szükséges koncentrációt mielőtt a kezdődő AB termelés visszaszorította. Vagyis megállapítható, hogy antibiotikumok (negatív, gátló kölcsönhatások) jelenlétében is lehetséges tartós együttélés, feltéve, ha vannak olyan körülmények, ahol az AB-ra érzékeny faj is növekedhet.



3.4. ábra: AB érzékeny (ABS, kék) és AB termelő (ABP, piros) populációk kölcsönhatása. A: Az AB termelés azonnal megkezdődik, ahogy az ABS populáció aktiválódik ( $T_{AB} ABP = T_R ABS$ ). B: Az AB termelés magasabb jelmennyiségnél indul el ( $T_{AB} ABP > T_R ABS$ ).

## 4. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Munkám során ágens-alapú számítógépes szimulációkkal vizsgáltam mikrobiális közösségek tagjai közt megfigyelhető koordinációs és kooperációs jelenségeket.

Ez az elméleti munka a baktériumok kölcsönhatásait befolyásoló faktorok és alapelvek azonosításával segítheti a laboratóriumi kísérletes kutatásokat. Támogathatja, validálhatja eredményeiket, kijelölhet új célpontokat, amelyeket az *in silico* eredmények alapján *in vitro/in vivo* is érdemes lehet vizsgálni. Ez által közelebb kerülhetünk a mikrobiális interakciók és szabályozási mechanizmusok megértéséhez, amely tudás az ipar és az egészségügy számos területén alkalmazható lesz.

Aktuális probléma az egészségügyben a túlzott antibiotikum használat és az ennek hatására kialakuló több antibiotikumra is rezisztens patogén törzsek megjelenése. Ezek gyakran kórházakban fordulnak elő, ahol súlyos veszélyt jelentenek az ott kezelt legyengült immunrendszerű betegekre. Tartós kiszorításuk antibiotikumokkal nem lehetséges ezért új eszközök is szükségesek az ellenük folytatott küzdelemben. A kórokozók quorum sensing rendszerének megzavarása a QS jelanyag lebontásával, hatásának blokkolásával vagy a QS idő előtti elindításával ígéretes alternatívái vagy kiegészítései lehetnek némely antibiotikumos kezelésnek (pl.: cisztás fibrózisos betegek *Pseudomonas aeruginosa* fertőzése esetén). Ezek a módszerek egyrészt csökkenthetik az antibiotikum használatot, így lassíthatják a rezisztens törzsek terjedését, másrészt specifikusabbak,

mert csak a kórokozóra hatnak. Emellett kevesebb mellékhatással is járnak, mert nem pusztítják el az adott mikrobiom jótékony, az egészséges működéshez elengedhetetlen tagjait. Ez különösen fontos a bélflóra esetén, aminek számos tagja érzékeny antibiotikumokra, és aminek megzavart egyensúlya, emésztési problémákhoz és AB rezisztens opportunistá patogének (*Clostridium difficile*) elterjedéséhez vezethet. Szimulációs eredményeim alátámasztották az ilyen esetekben sikeresen alkalmazott széklet transzplantáció hatékonyságát.

A biotechnológia ipar is hasznot húzhat a sejtek közti kommunikáció és kooperáció részleteinek megismeréséből. Ha ugyanis részletesen ismernénk, hogy az egyes sejtek, fajok hogyan hatnak egymásra, milyen körülmények (molekuláris közeg) közt végeznek bizonyos működéseket, akkor lehetségessé válna bioinformatikai és biotechnológiai eszközökkel cél specifikus mesterséges közösségek tervezése. Ezek a közösségek a jelenleg használt genetikailag módosított sejteknél életképesebbek lennének, és komplexebb feladatokat tudnának ellátni. Potenciális hasznosítási területük lehet többek között az egészségügy (pl.: mesterséges bélflóra), az élelmiszeripar (pl.: egyes haszonnövények talajflórájának precíziós beállítása) vagy a környezetvédelem (pl.: szennyvíz tisztító mikrobiális közösségek kifejlesztése, szennyezéseket lebontó és feldolgozó baktérium csoportok előállítása). Eredményeim reményeim szerint hozzájárulnak ezen tudományos területek kibontakozásához és széles körben hasznosítható biotechnológiai alkalmazások megvalósulásához.



## 5. Publikációk

[J1] **J. Juhász**, A. Kertész-Farkas, D. Szabó, and S. Pongor, “Emergence of collective territorial defense in bacterial communities: horizontal gene transfer can stabilize microbiomes.”, *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e95511, Jan. 2014.

[J2] **J. Juhász**, D. Bihary, A. Jády, S. Pongor, and B. Ligeti, “Differential signal sensitivities can contribute to the stability of multispecies bacterial communities”, *Biol. Direct*, vol. 12, no. 1, p. 22, Dec. 2017.

[J3] B. Ligeti, R. Vera, **J. Juhász**, and S. Pongor, “CX, DPX, and PCW: Web Servers for the Visualization of Interior and Protruding Regions of Protein Structures in 3D and 1D”, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1484, pp. 301–309, 2017.

[J4] D. Ábrahám, J. Fehér, G.L. Scuderi, D. Szabó, A. Dobolyi, M. Cservenák, **J. Juhász**, B. Ligeti, S. Pongor, M.C. Gomez-Cabrera, J. Vina, M. Higuchi, K. Suzuki, I. Boldogh, Zs. Radák, “Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer’s Disease in transgenic mice: role of microbiome”, *Experimental Gerontology*, vol. 115, pp. 122–131, Jan. 2019.

[C1] **J. Juhász**, “Modelling moderate quorum sensing parasites in microbial communities”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics 12*: pp. 22-23., 2017.

[C2] **J. Juhász**, “Modelling the effects of internally produced antibiotics in multispecies bacterial communities”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics 11*: pp. 47-50., 2016.

[C3] **J. Juhász**, “Modelling horizontal gene transfer in bacterial communities”, *PhD Proceedings Annual Issues of The Doctoral School Faculty of Information Technology and Bionics* 2015/01, pp. 53-56., 2015.

[C4] **J. Juhász**, A. Jády, B. Ligeti, “Horizontal gene transfer can facilitate the formation of stable and diverse microbial communities: an *in silico* agent-based model”, *RECOMB 2018*, 21-24 Apr. 2018, Paris (poszter)

[C5] T. Gaizer, R. Valaczkai, B. Pillér, D. Méry, M. Miski, D. Pesti, **J. Juhász**, I. Stefanini, B. Péterfia, A. Csikász-Nagy, „Role of cell-cell interactions in *S. cerevisiae* colony formation”, *Dynamics of biological systems: Modelling genetic, signalling and microbial networks*, 2-4 May 2018, Brussels (poszter)

[J5] S. Pongor, **J. Juhász**, B. Ligeti, “Háború és béke a baktériumoknál”, *Természet Világa*, vol. 147, no. 5, pp. 208-211, May. 2016.

[J6] S. Pongor, **J. Juhász**, B. Ligeti, “Valós és virtuális társadalmak a baktériumoknál”, *Élet és Tudomány*, vol. 71, no. 2, pp. 41-43., Jan. 2016.