

A BAKTERIÁLIS KOMMUNIKÁCIÓ VIZSGÁLATA ÁGENS ALAPÚ MODELLEL

Ph.D. értekezés téziseinek összefoglalója

Kerényi Ádám

Témavezetők:

Prof. Pongor Sándor

PPKE ITK

Dr. Rákhely Gábor

SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Szeged

2014

1. Bevezetés

A mikrobák változatos méretű és összetételű konzorciumokban élnek, melyek tagjai közösen használják fel a környezetükben található erőforrásokat. Ezek az ún. polimikrobiális közösségek a Földön mindenhol megtalálhatók: a talajban, az óceánok fenekén és egészen extrém környezetekben is, mint pl. hőforrásokban, vagy akár nukleáris hulladékban, de magasabb rendű élőlényekkel is élhetnek szimbiózisban. A mikroorganizmusok közösségei fontos helyet foglalnak el a Föld ökoszisztémájában, hisz jelentős mértékben járulnak hozzá a biomasszához, illetve a szerves- és szervetlen anyag forgalomban is fontos szerepet töltenek be. A mikrobiális konzorciumok esetenként több száz, vagy akár ezer fajból állnak, melyek különböző szekretált anyagokat osztanak meg egymás között. Jelen információink alapján egyelőre nincs általánosan kielégítő magyarázat a közösségek stabilitására, vagyis arra, hogyan ellenállni a környezeti változásoknak, illetve a nem kooperáló, ún. csaló mutánsok megjelenésének. Ezek az elméleti kérdések gyakorlati szempontból is fontosak, mivel az emberi szervezet bélflórája, a rizoszféra nitrogén fixáló baktériumfajai, a fogszuvasodásban megtelepedő baktérium-gomba konzorciumok, valamint a víz alatti fémfelszíneket károsító biofilmek is ilyen mikrobiális közösségekből épülnek fel. Így akár egészségügyi, akár ipari szempontból fontos feladat a stabilizáló mechanizmusok feltárása.

Az elmúlt 30 év egyik legjelentősebb mikrobiológiai felfedezése a baktériumsejtek közötti kémiai kommunikáció feltárása volt, mely alapjaiban változtatta meg a prokariotákról alkotott elképzelésünket. Korábban az intercelluláris kommunikációt inkább eukarióta jellegzetességnek tartották, mára azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a mikrobiális közösségek kommunikációja és komplex működése mögött is bonyolult kémiai jelzőrendszerek állnak. A legtöbb baktériumfaj például

képes monitorozni a populáció sejtsűrűségét, melyet kis molekulatömegű jelmolekulák (autoinducerek) termelésével és érzékelésével valósítanak meg. Ezt a jelenséget *quorum érzékelésnek* ('quorum sensing' - QS) hívjuk, amely sejtsűrűségtől függő koordinált génműködést jelent. A folyamat során, ha a jelanyag, vagyis az autoinducer molekula koncentrációja elér egy kritikus szintet, akkor specifikus gének be- és kikapcsolása révén a teljes populáció génexpressziós mintázata egyszerre megváltozik. A szinkronizált válasz lehetővé teszi, hogy a baktérium populáció alkalmazkodjon és túléljen a megváltozott környezetben. A QS folyamata során expresszálandó gének hatására a sejtek különböző extracelluláris anyagokat termelhetnek, amelyek lehetnek pl. virulencia faktorok, antibiotikumok, emésztőenzimek, fémkötő- (sziderofór) és felületaktív anyagok. Ezen felül komplex fenotipikus változások is létrejöhetnek a teljes populációban, mint például a *rajzó mozgás* ('swarming motility'), mely a baktériumkolónia gyors helyváltoztató mozgását jelenti.

Munkám középpontjában a rajzó mozgáson alapuló jelenségek, valamint a több fajból álló konzorciumok stabilitása áll. Vizsgálataink során *Pseudomonas aeruginosa* baktériumfaj vad típusú és különböző quorum sensing deléciós mutáns törzseivel dolgoztunk.

2. Célkitűzések

Munkám során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Egy egyszerűsített, ágens alapú hibrid modell létrehozása, mely alkalmas a *P. aeruginosa* (vad típusú, ill. különböző QS deléciós mutánsok) quorum érzékelés által szabályzott rajzásának kvalitatív modellezésére.
2. *P. aeruginosa* törzsek rajzásának *in vitro* és *in silico* vizsgálata exogén jel jelenlétében és hiányában.
3. Stabilis közösségek kialakulási feltételeinek tisztázása.
4. A modell továbbfejlesztése a jelanyag és a közjó fajok közötti megosztásának, ill. annak következményeinek vizsgálatára.
5. A QS jeleket, kooperációs faktorokat és a táplálékot különböző mértékben megosztó baktériumtörzsek együtt-rajzásának *in silico* vizsgálata, mely segítségével választ kaphatunk arra, hogy a baktériumtörzsek közötti különböző mértékű kommunikáció és a kooperáció milyen hatással van a populáció stabilitására és átlagos fitneszére.

3. Módszerek

3.1. Szoftveres és hardveres környezet

A hibrid modellünk korai verzióit Java, míg a későbbi fejlesztéseket MATLAB programozási környezetben végeztük. A fejlesztések során kiemelt figyelmet fordítottunk a forráskód optimalizációjára, mivel az iterációk során meghívott függvények esetenként több tízezer ágensre végeztek számításokat. A szimulációkat párhuzamosítva futtattuk, amihez a trieszti ICGEB-ben található számítógép klasztert használtuk. A rendszer egy darab frontend kiszolgálóból és 20 darab backend gépből állt, melyek mindegyike 2.2 GHz-es processzorokkal és 2 GB memóriával rendelkezett.

3.2. Az *in vitro* kísérletek során felhasznált baktériumtörzsek

A kísérletek során *Pseudomonas aeruginosa* PUPA3 ("vad típus"), ill. annak különféle deléciós törzseit használtunk. A két quorum érzékelési rendszer szempontjából többféle mutáns törzs állítható elő a szintáz gének (*lasI*, *rhlI*), illetve a transzkripció regulátor fehérjék termeléséért felelős gének (*lasR*, *rhlR*) kiütésével. Azokat a null mutánsokat, melyekben mindkét szintáz, ill. regulátor rendszer inaktív, rendre SN ('Signal Negative', $\Delta lasI/rhlI$) és SB ('Signal Blind', $\Delta lasR/rhlR$) törzseknek neveztük el.

A rajzási kísérletek során M8 agar médiumot használtunk, mely 0.5% agart, 0.2% glükózt és 0.05% glutamint tartalmazott. Petri-csészékbe kiöntött, majd megdermet tápralaj közepére baktérium szuszpenziót oltottunk (0.5 μ l), melyeket a 30°C-on inkubáltuk a rajzás ideje alatt.

3.3. Az ágens alapú hibrid modell felépítése

Modellünkben a *P. aeruginosa* sejteket random mozgást végző, pontszerű ágensekként reprezentáljuk, melyek kölcsönhatásban vannak a környezetükkel az általuk termelt jel és faktormolekulák, valamint a tápanyag révén. A populáció tagjai döntéseiket önállóan, egymástól függetlenül hozzák meg a környezetben lévő kémiai anyagok koncentrációja alapján. Az ágensek három állapotot vehetnek fel a környezetben található jel és faktor koncentrációknak megfelelően: *alapállapot* (alacsony jeltermelés, alapszintű metabolizmus és mozgás), *aktivált állapot* (fokozott jel és faktortermelés) és *rajzó állapot* (fokozott jel és faktortermelés, valamint intenzív metabolizmus és mozgás). Az ágensek a környezetből felvett energiának egy részét extracelluláris anyagok termelésére, metabolikus folyamatokra, valamint mozgásra fordítják, a fennmaradó részt pedig elraktározzák. Ha ez a raktározott energia elér egy bizonyos küszöbszintet, akkor osztódás történik, viszont ha az ágensek környezetében elfogy a táplálék, akkor a tárolt energia felélése után az ágensek „elpusztulnak”.

Modellünkben ezt az agar médiumot egységnyi cellákra felosztott, téglalap alakú felszínnel reprezentáljuk ("szimulációs tér"), mely folyamatos kölcsönhatásban van az ágensekkel, továbbá lehetőséget biztosít azok felszíni mozgására. A szimulációs tér két hosszanti oldalán periodikus határfeltételt alkalmazunk.

A kémiai anyagok diffúziójának leírására általános reakció-diffúziós modellt használtunk, melynek megoldását egy feltételesen stabil explicit numerikus módszerrel, nevezetesen az *Euler-módszerrel* közelítettük.

Az eredmények kiértékeléshez különböző numerikus értékeket definiáltunk, melyekkel egyszerűen dolgozhattuk fel a szimulációk végeredményeit. Ezek közül az egyik a *relatív fitness* volt, mely az

szimulált közösség rátermettségét jellemzi a stacioner populáció egy referencia populációhoz viszonyított mérete alapján. A másik általunk kidolgozott paraméter a *szegregációs index* volt, mely kiszámításával egyszerűen el lehet dönteni, hogy kép populáció kevert, vagy szegregált állapotban volt a szimuláció végén.

A szimuláció kezdetén meghatározott számú, alapállapotú ágens helyezünk el véletlenszerűen a startvonal közelében. A program ciklikusan működik, és mindegyik iterációban az ágensek adott hosszúságú lépést tesznek meg a felszínen véletlen irányba, valamint táplálékot fogyasztanak és anyagokat termelnek az aktuális állapotuknak megfelelően. Emellett, a táplálékra és a termelt anyagokra is végrehajtjuk a diffúziós eljárást. A ciklusok során az ágensek érzékelik a környezetüket is, vagyis megfelelő körülmények esetén állapotot váltanak. A szimuláció akkor áll le, ha az összes ágens elpusztult a kolóniában, vagy ha a főciklus eléri a felhasználó által megadott maximális lépésszámot.

4. Eredmények

4.1. A modell megalkotása

Kifejlesztettünk egy ágens alapú hibrid modellt (lásd Módszerek), melyben a baktériumokat ágensek segítségével reprezentáltuk, míg a kémiai környezetet (a sejtek által termelt jelmolekulák és közjavak, valamint a táplálékot) reakció-diffúziós egyenlettel írtuk le. A modell alkalmasnak bizonyult a *P. aeruginosa* kolónia quorum érzékelés által szabályzott rajzó mozgásának szimulációjára.

4.1.1. Rajzás vizsgálata exogén jel jelenlétében és hiányában

A modell segítségével reprodukáltuk az *in vitro* kísérletek során megvizsgált *P. aeruginosa* vad típusú, valamint quorum érzékelés deléciós mutánsok rajzását exogén jel jelenlétében és hiányában. Hozzáadott jelmolekula hiányában csak a vad típusú törzs volt képes rajzó kolóniát alkotni, viszont exogén jelmolekula jelenlétében az SN mutánsok is képesek voltak rajzásra. Az SB mutánsok egyik esetben sem alkottak rajzó kolóniákat.

4.1.2. Kémiai jelek követésének modellezése

Szimuláltuk az SN baktérium kolónia jelkövetését egy mesterségesen definiált jel-nyomvonal segítségével, melyen végighaladt a rajzó kolónia.

4.2. A baktériumpopuláció lokális összeomlása csaló mutánsok megjelenése esetén

Megvizsgáltuk a hibrid ágens modellünk segítségével, hogy milyen hatással van a kolóniára a nem kooperáló csaló mutánsok megjelenése, ill. felállítottunk egy hipotézist, mely alapján a közösség képes kivédeni a

csaló mutánsok populáción belüli elterjedését lokális összeomlás által. A jelenséget a következő kísérletekkel vizsgáltuk:

4.2.1. Vad típusú és különböző QS deléciós mutánsok együtt-rajzása

Vad típusú és QS deléciós mutáns törzseket oltottunk le speciális agar médiumra, melyek három féle kolóniamorfológiát produkáltak: "*nem rajzó*", "*rajzó*" és "*összeomló*" kolóniák. WT és SN kevert populációk esetében kialakultak a rajzó kolóniák, viszont ha WT és SB törzseket kevertünk, akkor összeomlott kolóniákat kaptunk a kísérletek és a szimulációk során. Ennek hátterében a csaló mutánsok WT-vel szembeni szaporodási előnye állhat, mely által kiszorítják a populációból a kooperáló sejteket.

4.2.2. Populációkinetika in vitro és in silico kísérleteknél: rajzás és összeomlás

Megvizsgáltuk, hogy különböző kiindulási arányok esetében milyen lesz a felnövő kolóniákban a különböző törzsek aránya. Eredményeink alapján vad típusú sejtek a kooperáló, de nem kommunikáló mutáns (SN) törzssel stabil kolóniát képeznek, melyben a mutánsok vannak nagyobb arányban. A nem kooperáló (SB) mutánsokkal azonban nem alakultak ki rajzó kolóniák, melynek magyarázatául a fentebb említett hipotézis állhat. Az eredményeket sikeresen reprodukáltuk a szimulációs rendszerünk segítségével is.

4.3. A kooperáció és kommunikáció in silico vizsgálata két fajból álló közösségekben

Az ágens modellünk segítségével megvizsgáltuk, milyen hatással van a közösség stabilitására, valamint az egyes fajok fitnessére, ha a fajok között a jel, a faktor és táplálék megosztása különböző mértékű.

4.3.1. Quorum érzékelés nélküli kompetíció

Olyan ágensek versengése esetén, melyek nem rendelkeztek QS rendszerrel, nem alakult ki stabil, kevert populáció, csak *sztochasztikus szegregációt* (alacsony táplálékmegosztás esetében), ill. *sztochasztikus kizárást* tapasztaltunk (magasabb táplálékmegosztás esetében).

4.3.2. Szimmetrikus átfedés: "megosztás"

Magas táplálékmegosztás esetében a paraméterter egy jellemző régiójában (magas faktormegosztás) kialakultak olyan *stabil, kevert közösségek*, melyek fitnessze magasabb volt, mint az ugyanolyan feltételek mellett, de egyedül növekvő kolóniáké. A paraméterter további részén sztochasztikus kizárást, ill. sztochasztikus szegregációt tapasztaltunk, a táplálék megosztásától függően.

4.3.3. Aszimmetrikus átfedés: "lehallgatás/kizsákmányolás"

Aszimmetrikus átfedés esetében, mikor az egyik faj képes értelmezni a másik faj jelmolekuláit, termelt közjavit, valamint képes felhasználni annak táplálékát, *kompetitív kizárást* ill. *szegregációt* tapasztaltunk a szimulációk során. Tehát, minden esetben a kizsákmányoló faj került nyertes pozícióba a másik fajjal szemben.

5. Összefoglalás

Munkánk középpontjában a *P. aeruginosa* vad típusú és különböző quorum deléciós mutáns törzsek quorum érzékelésének *in vitro* és *in silio* vizsgálata áll. A vizsgálatok elvégzéséhez megalkottunk egy hibrid ágens modellt, melyben az egyes sejtek ágensekként vannak reprezentálva, míg a a környezetben található kémiai anyagokat reakció diffúziós egyenletekkel írtuk le.

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a populációra, ha különböző QS tevékenységre képtelen ún. *csaló mutánsok* is jelen vannak a kolóniában. A laboratóriumi kísérletek és a szimulációk egyaránt azt mutatták, hogy azok a csaló mutánsok, melyek nem járulnak hozzá a populáció közjavainak – pontosabban a nagy metabolikus ráfordítást igénylő kooperációs faktoroknak – termeléséhez, *lokális összeomlást* okoznak. A számítógépes szimulációk arra utalnak, hogy a rajzó mozgás és a metabolizmus QS általi szabályozás segítségével a kolónia képes lokalizálni a csaló mutánsokat, meggátolva azok elterjedését. Ezen felül megállapítottuk, hogy a kevert populációk jellemző arányai a kezdeti arányoktól függetlenül állnak be a karakterisztikus értékre. A szimulációkból eredményeiből láthattuk, hogy extrém esetben akár néhány darab csaló mutáns ágens is képes egy rajzó kolóniát megállítani és összeomlasztani.

Arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy a QS jelek és kooperációs közjavak megosztása hogyan befolyásolja a közös élettérben versengő fajokat. Ehhez olyan szimulációkat futtattunk, melyekben a versengő ágens-populációk különböző mértékben osztották meg a jelmolekuláikat, a közjavaikat és a táplálékot. Azt találtuk, a jelek és közjavak kölcsönös megosztásával stabilisnak tűnő (sokszáz generáción keresztül fennálló) kevert populációk alakulhatnak ki a különböző megosztási arányokat ábrázoló paraméter-tér jelentős részében. Ezt a

jelenséget a QS-re nem képes rendszerben egyáltalán nem tapasztaltuk. Az említett vegyes populációkban a két versengő ágens-populáció teljesen összekeveredett, vagyis ko-lokalizált volt, nem alakult ki foltszerű elkülönülés. A ko-lokalizált populációk ugyanakkor bizonyos esetekben gyorsabban is növekedtek, mint egyedül, azaz a másik faj távollétében. Ezt a jelenséget akkor lehetett megfigyelni, ha a két populáció legalábbis részlegesen, de különböző tápanyagokat fogyasztott. Modelljeink ennek ellentétét is kimutatták, azaz ha a két populáció azonos tápanyagot fogyasztott, akkor a szimuláció az egyik populáció kizárásához vezetett. A szimulációk azt sugallják, hogy a közjavak megosztása, valamint a különböző táplálék fogyasztása kulcsfontosságú a ko-lokalizáló populációk kialakításához, míg a jel megosztásának inkább az egyéb fajok odavonzásában lehet szerepe, amint erre fentebb is utaltunk.

Abban az esetben, ha az egyik faj felhasználja a másik faj által termelt jelet és közjavakat, szaporodási előnyre tehet szert a másik fajjal szemben, amelyik nem teheti meg ugyanazt. Ezt *aszimmetrikus kizsákmányolás*nak nevezzük. A szimulációk szerint a kizsákmányoló fajnak a teljes paraméterterben előnye van, vagyis az idegen faj jelének „lehallgatása”, ill. a annak közjavainak kiaknázása minden körülmények között előnyös a kizsákmányoló faj számára. Ez a szimulációs eredmény azt sugallja, hogy az a sejt, amelynek LuxR receptora többféle jel érzékelésére képes, szaporodási előnnyel rendelkezik, mivel képes válaszolni a vele kompetícióban álló sejtek jeleire is. Mindez magyarázatot adhat a természetben gyakran megfigyelt aspecifikus, több jelet is érzékelni képes LuxR receptorok eredetére.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani elsőként Prof. Pongor Sándornak (MTA SZBK Bioinformatikai Csoport, ICGEB Trieszt, PPKE ITK), aki lehetőséget biztosított arra, hogy a csoportjában végzett munka alapján megszülethessen ez a doktori disszertáció. Továbbá, köszönettel tartozom a munkám során nyújtott szakmai tanácsokért és a dolgozat elkészítése során nyújtott lelkiismeretes segítségéért.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Rákhely Gábornak (SZTE TTIK, Biotechnológiai Tanszék) a doktorandusz éveim alatt nyújtott támogatásáért, valamint a dolgozat írása során nyújtott tanácsokért.

Hálásan köszönöm a segítséget dr. Vittorio Venturinak (ICGEB Trieszt) és a csoportjának, akikkel közreműködve a dolgozat alapjául szolgáló cikkek születtek. Köszönettel tartozom prof. Mircea Munteanunak (University of Udine, Olaszország) a program diffúziós moduljának fejlesztéséért, valamint dr. Kertész-Farkas Attilának (University of Washington, Seattle, Washington, USA) a szimulációk futtatása során nyújtott technikai segítségért.

Szeretném megköszönni továbbá Bihary Dórának (PPKE ITK) a sokéves hatékony, közös munkát, valamint a dolgozat készítése során nyújtott szakmai észrevételeit és tanácsait.

Köszönettel tartozom Prof. Ormos Pálnak (MTA SZBK) és Dr. Galajda Péternek (MTA SZBK) a támogatásukért és a türelmükért, melyekről a dolgozatom írása során biztosítottak.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szeretett Családomnak és Barátaimnak kitartó támogatásukért és biztatásukért.

Az értekezés alapját képező közlemények

Netotea, S.; Bertani, I.; Steindler, L.; **Kerenyi, A.**; Venturi, V.; Pongor, S.: A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an "activation zone". *Biology Direct*, **2009**, *4*.

IF: 3,322

Suárez-Moreno, Z.R.; **Kerenyi, A.**; Pongor, S.; Venturi, V.: Multispecies microbial communities: Part I. Quorum sensing signaling in bacterial and mixed bacterial-fungal communities. *Mikologia Lekarska*, **2010**, *17(2)*, 4.

IF: -

Kerenyi, A.; Suarez-Moreno, Z.R.; Venturi, V.; Pongor, S.: Multispecies Microbial Communities. Part II: Principles of Molecular Communications. *Mikologia Lekarska*, **2010**, *17(2)*, 4.

IF: -

Venturi, V.; Bertani, I.; **Kerenyi, A.**; Netotea, S.; Pongor, S.: Co-swarming and local collapse: quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, **2010**, *5(4)*, e9998.

IF: 4,411

Venturi, V.; **Kerenyi, A.**; Reiz, B.; Bihary, D.; Pongor, S.: Locality versus globality in bacterial signalling: can local communication stabilize bacterial communities? *Biology Direct*, **2010**, *5*.

IF: 3,737

Bihary, D.; **Kerenyi, A.**; Gelencser, Z.; Netotea, S.; Kertesz-Farkas, A.; Venturi, V.; Pongor, S.: Simulation of communication and cooperation in multispecies bacterial communities with an agent based model. *Scalable Computing: Practice and Experience*, **2012**, *13(1)*, 21-28.

IF: -

Kerenyi, A.; Bihary, D.; Venturi, V.; Pongor, S.: Stability of Multispecies Bacterial Communities: Signaling Networks May Stabilize Microbiomes. *Plos One*, **2013**, *8(3)*.

IF: 3,534

További közlemények:

Nagy, K.; Sipos, O.; Gombai, E.; **Kerenyi, A.**; Valkai, S.; Ormos, P.; Galajda, P., Interaction of Bacterial Populations in Coupled Microchambers. *Chem Biochem Eng Q*, **2014**, 28 (2), 225-231.

IF: 0,911

Bihary, D.; Toth, M.; **Kerenyi, A.**; Venturi, V.; Pongor, S., Modeling bacterial quorum sensing in open and closed environments: potential discrepancies between agar plate and culture flask experiments. *J Mol Model*, **2014**, 20 (7).

IF: 1,984

Vegh, A. G.; Nagy, K.; Balint, Z.; **Kerenyi, A.**; Rakhely, G.; Varo, G.; Szegletes, Z., Effect of antimicrobial peptide-amide: indolicidin on biological membranes. *J Biomed Biotechnol*, 2011, **2011**, 670589.

IF: 2,436

Leitgeb, B.; **Kerenyi, A.**; Bogar, F.; Paragi, G.; Penke, B.; Rakhely, G., Studying the structural properties of polyalanine and polyglutamine peptides. *J Mol Model*, **2007**, 13 (11), 1141-1150.

IF: 1,669

Összesített impakt faktor: 21,887

Előadások:

Pongor, S.; **Kerenyi, A.**: Bakteriális kommunikáció és kooperáció modellezése. *BJMT Alkalmazott Matematikai Konferencia*, Győr, **2012**. június 21-23.

Kerenyi, A.; Bihary, D.; Gelencser, Zs.; Netotea, S.; Venturi, V.; Pongor, S.: Simulation of communication and cooperation in multispecies bacterial communities with an agent based model. *13th Symposium on Symbolic and Numeric Algorithms for Scientific Computing*, Temesvár, Románia, **2011**. szeptember 26-29.

Kerenyi, A.; Pongor, S.: Bacterial communication and cooperation. *Modeling in Life Sciences*, Szeged, **2010**. december 3.

Pongor, S.; **Kerenyi, A.**; Netotea, S.: A baktérium-kommunikáció egy egyszerű modellje. *MTA SZBK Straub- napok*, Szeged, **2009**. november 25-27.