

Mikrobiális közösségek koordinációjának vizsgálata ágens- alapú modellekkel



Juhász János

PhD disszertáció

Témavezető:

Prof. Pongor Sándor

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

Budapest, 2018

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek Dr. Pongor Sándornak az elmúlt hét évben mind a szakmai munka, mind a tudományos publikálás, prezentálás és általában a kutatás világában való eligazodás terén tőle kapott rengeteg segítséget, észrevételt, tanácsot, iránymutatást, és ezek mellett természetesen a türelmét is hozzáam.

Munkám során együtt dolgoztam Kertész-Farkas Attilával a géntranszfer modellen és Bihary Dórával valamint Kerényi Ádámmal a quorum sensing modellen. Köszönöm nekik, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, mert beszélgetéseink, segítségük és tanácsaik nélkül biztosan nem készülhetett volna el az alábbi disszertáció. Köszönöm az általam témavezetett hallgatóknak: Hegedüs Józsefnek, Schulc Attilának, Kertész Gábornak, Pesti Donátnak, Makove Bencének és Dilan Danialnak is értékes munkájukat, és hogy sokat tanulhattunk egymástól.

Köszönöm továbbá kutatócsoportunk együttműködő partnerének, Dr. Szabó Dórának, a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológia Intézet vezetőjének hasznos szakmai meglátásait, melyek segítettek a modellek realiztikusabbá tételében. Hálás vagyok professzor Szabad Jánosnak is, hogy elindított a kutatóvá válás útján és Dr. Garay Barnabásnak is rengeteg épületes és látókör szélesítő beszélgetésért.

BSc-s Önálló laboratóriumi projektem óta dolgozom Dr. Pongor Sándor bioinformatika kutatócsoportjában, így meg kell köszönnöm a csoport jelenlegi és korábbi tagjainak: Ligeti Bálázsnak, Kistóth Éva Mercédesznek, Jády Attilának, Gelencsér Zsoltnak, Kumari Sonal Choudharynak, Sanjarbek Hudaiberdievnek, Rétlaki Gábornak és Kovács Ferencnek is a közös munkát és, hogy segítették szakmai fejlődésemet.

Köszönöm a Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola Tanácsának és vezetőjének Dr. Szolgay Péternek, hogy lehetővé tették állami ösztöndíjas PhD tanulmányaimat a karon és hálás vagyok Dr. Vida Tivadarnének is az ügyintézésben nyújtott fáradhatatlan segítségéért.

Munkám részben a magyar kormány OTKA 120650 (Mikrobióm bioinformatika: Komplex bakteriális közösségek számítógépes analízise és modellezése), ED_17-1-2017-0009 (Nemzeti Bionika Program), EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00002 (2. Nem-konvencionális számítási és modellezési megközelítések) és EFOP-3.6.2-16-2017-00013 (4. Nagyskálájú biológiai adatok integrációja) pályázati programjainak támogatásával (utóbbiak az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásában) valósult meg.

Végül köszönöm a PPKE ITK doktoranduszainak, akik hasznos tanácsokkal láttak el és színesítették az egyetemi hétköznapokat valamint családomnak és barátaimnak, akik végig kitartottak mellettem és minden eszközzel támogattak az évek során, hogy eljuthassak ideig.

Kivonat

A baktériumok mikrométeres méretű élőlények, Földünk legelterjedtebb sejtjes létformái. Sikerük egyik titka, hogy leggyakrabban csoportokat alkotnak, amelyek tagjai amellet, hogy versengenek az erőforrásokért együttműködésre is képesek. Ekkor a közösség tagjai koordinálják bizonyos tulajdonságaikat, funkcióikat és közösen hatékonyabb működésre képesek, mint az egyes egyedek önállóan. A koordináció több szinten valósulhat meg. Például genomi szintű koordinációnak tekinthető, ha horizontális géntranszfer segítségével egy mikrobiom tagjai összehangolhatják rezisztenciagén készletüket, és ez képessé teszi őket egymás tolerálására és más sejtek elleni hatékony fellépésre. Metabolizmus szintű koordinációról beszélhetünk quorum sensing esetén, amikor a sejtek a környező sejtűrség függvényében összehangoltan módosítják működésüket.

A fent említett koordinációs folyamatok elterjedtek a mikrobiális közösségekben, hatásaik illetve az őket irányító faktorok viszont még nem teljesen ismertek. Munkám célja volt ágens-alapú számítógépes modellezés segítségével vizsgálni egyrészt a horizontális géntranszfer kialakulásában fontos szerepet játszó néhány paramétert, és az így létrejött természetes, diverz mikrobiomok viselkedését külső és belső kihívásokkal szemben. Másrészt tanulmányoztam a quorum sensing vezérelte rajzás során megfigyelhető különböző válasz küszöbök szerepét vad típusú, csökkent kommunikációs és kooperációs képességű és antibiotikum termelő sejtek együttélésében.

In silico eredményeim alátámasztották a rezisztencia gének horizontális géntranszferének fontosságát stabil összetételű, sok fajt tartalmazó közösségek kialakulásában, és megmutatták, hogy egy így összeszokott mikrobiom, mint például a bélflóra, ellenálló a külső patogénekkal szemben, és képes az antibiotikum multirezisztens csökkent diverzitású közösségek (pl. *Clostridium difficile* fertőzés) kiszorítására is. Szimulációs eredményeim a quorum sensing modellben rámutattak, hogy az eltérő érzékelési küszöbök lehetővé teszik a különböző életképességű fajok együttélését, valamint munkamegosztás kialakulását az élettérben részlegesen szeparált közösségek között. Ez a jelenség értelmezhető a mikrobák egyfajta önmérsékleteként és lehetővé teszi a kevésbé életképes (ugyanakkor hasznos) fajok megmaradását a közösségben. Ilyen önmérséklet esetén a csökkent kommunikációs és kooperációs képességű sejtek is képesek tartósan együttélni vad típusú társaikkal, ami egybevág a természetben megfigyelhető viselkedésükkel. Továbbá egymással kompatibilis quorum sensing rendszerű fajokat modellezve az antibiotikum termelés bevezetése sem zárta ki a különböző csoportok együttélését, ha az antibiotikum termelő faj bizonyos körülmények között kevésbé volt életképes a másikonál.

Szimulációs eredményeim tehát rámutattak néhány egyszerű mechanizmus potenciálisan fontos szerepére az egészségügy és a biotechnológiai ipar számára is fontos komplex jelenségekben

Abstract

Bacteria are organisms of micrometre size, and they are the most widespread cellular life forms on Earth. One key aspect of their success is their ability of forming groups and not only compete for the resources, but also cooperate with each other. In this case the members of the community coordinate some of their properties and functions and become capable of more efficient work than the individual cells alone. The coordination has multiple levels. For example, synchronising the resistance gene pool of a microbiome via horizontal gene transfer, in order to tolerate each other and defend the community against others, can be called genomic coordination. While quorum sensing, when cells synchronise their functions based on the local cell density, is coordination at the metabolic level.

The coordination processes mentioned above are widespread in microbial communities, but their effects and governing factors are not perfectly known. The first aim of my work was using agent-based modelling to study the factors that are important in the emergence of horizontal gene transfer, and explore the behaviour of the resulting diverse communities against external and internal threats. My second goal was studying the role of different response thresholds in quorum sensing mediated swarming of wild type cells and cells with decreased communication, cooperation capabilities or with antibiotics production.

My *in silico* results confirmed the importance of resistance gene horizontal gene transfer in the formation of stable, diverse communities, and demonstrated that these accustomed microbiomes, like the human gut flora can handle external pathogens, and capable of superseding antibiotics multiresistant communities with lower diversity (e.g.: *Clostridium difficile* infection). My simulation results in the quorum sensing model showed that different response thresholds enables the coexistence of species with different fitness, and the division of labour between partially separated communities. This phenomenon can be interpreted as a form of microbial “self-restraint” and allows the preservation of less fit (but useful) microbes in the colony. In case of this self-restraint bacteria with decreased communication and cooperation properties can also share a habitat with wild type cells which fits with their behaviour observed in nature. Furthermore modelling species with compatible quorum sensing systems introduction of antibiotics production did not exclude the coexistence between the groups, if the members of the antibiotics producing species were less fit under some circumstances than the other.

To conclude: my simulation results highlighted the potential roles of some simple mechanisms in medically and biotechnologically important complex processes.

Tartalomjegyzék

1. Áttekintés és célkitűzések.....	7
2. Bevezetés/Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Biológiai háttér.....	10
2.1.1 Horizontális géntranszfer (genomszintű koordináció).....	11
2.1.2. Quorum sensing (metabolikus koordináció).....	19
2.1.3. Összefoglalás.....	28
2.2. Baktérium modellek.....	29
2.2.1. A baktériumok reprezentációja.....	30
2.2.2. A tér reprezentációja.....	32
2.2.3. A médium reprezentációja.....	33
2.2.4. A baktériumok viselkedésének reprezentációja.....	34
2.2.5. Modellek osztályozása.....	36
3. Módszerek.....	38
4. Eredmények I: Genom szintű koordináció a horizontális géntranszfer modellben.....	40
4.1. HGT modell.....	40
4.2. Rezisztencia gének transzfere a HGT modellben.....	44
4.2.1. Random kezdeti populációkból kialakuló közösségek típusai.....	45
4.2.2. A közösségek evolúcióját befolyásoló tényezők.....	48
4.2.3. Különböző kezdeti populációk versengése összeszokás során.....	52
4.3. Diverz, érett közösségek viselkedése.....	54
4.3.1. Az élettér védelme külső támadókkal szemben.....	54
4.3.2. Mikrobiális terápia: patogének kiszorítása egészséges mikrobiális közösségek segítségével.....	56
5. Eredmények II: Önmérséklet a metabolikus koordinációt megvalósító QS modellben.....	58
5.1. A QS modell felépítése.....	58
5.1.1. Jellemző kimenetek.....	62
5.1.2. Fejlesztések a modellben.....	63
5.2. QS küszöbértékek szerepe különböző baktériumpopulációk együttélésében.....	65
5.2.1. Magasabb QS válasz küszöb, mint önmérséklet.....	66
5.2.2. QS válasz küszöb különbségek hatása a stabil együttélésre.....	67

5.3. Mérsékelt paraziták vizsgálata	71
5.3.1. Önállóan rajzó, WT-vel stabil együttélésre képes mérsékelt paraziták definiálása.....	72
5.3.2. Az életképes és stabil mérsékelt paraziták tulajdonságai	73
5.4. Az antibiotikum termelés hatása különböző baktériumpopulációk együttélésére	77
5.4.1. Szignalizációs stratégiák	78
5.4.2. Az antibiotikum termelés hatása és típusai.....	79
6. Összefoglalás	85
6.1. Új tudományos eredmények	85
6.2. Az eredmények alkalmazási lehetőségei	88
A szerző publikációi	90
Irodalomjegyzék	91
Függelék.....	100

1. Áttekintés és célkitűzések

Dolgozatom tárgya a mikrobiális közösségek ágens-alapú modellezése. Ez a téma több tudományterület eredményeire támaszkodik, ezért nehéz koherens módon áttekinteni. Közösségeket a biológiában is több területen tanulmányoznak, a rovarok [1], emlős csoportok, madárrajok [2], [3], mikrobiális kolóniák viselkedését sokféle modellezési technikával kísérelték meg leírni, kezdve a térben, időben folytonos differenciálegyenletes modellekkel [4] egészen az individuális viselkedést tanulmányozó ágens-alapú modellekig [5]. De tanulmányoznak sokaságokat, populációkat a fizika és a kémia területén is, a molekulák dinamikája, a molekula- és részecske-populációk modellezése sok módszertani hasonlóságot mutat a mikrobiális közösségekkel végzett munkával [6].

A szimulációk célja szinte minden esetben az úgynevezett emergens, „rendszergyökerű” tulajdonságok feltárása, vagyis azoké a jelenségeké, amelyek nincsenek „belekódolva a modellbe” hanem annak futtatása során nyilvánulnak meg. Ilyen emergens tulajdonság például a populációk mozgása és alakja, amely főleg a korai modellezési munkálatokban volt jellemző elérendő cél [4], [7]. Az ágens-alapú modellezésen a mai szakirodalom egy olyan szimulációs stílust ért, amelyekben autonóm egységek viselkedésének és kölcsönhatásainak befolyását lehet tanulmányozni a rendszer egészére vonatkozóan [8]. Ágenseken általában számítási egységeket, programokat értünk [9], de van olyan értelmezés is, amely a fizikailag létező, konstruált robotok sokaságának vizsgálatát is ágens-alapú modellezésnek tekinti [10]. Ilyen széles horizontot tekintve a téma tárgyalása kezdődhetne akár Neumann János játékelméletével [11], vagy John Conway „artificial life” megközelítéseivel is [12].

Dolgozatomban a baktériumokat helyüket változtató és egymással valamint a környezetükkel kölcsönható ágensekkel szimuláltam. Ezt a megközelítést vissza lehet vezetni a Craig Reynolds által kifejlesztett boids (bird) modellekre [7], melyekben az egységek egyszerű intuitív szabályok szerint hatnak kölcsön, a populációk mégis meglepően életszerűen tükrözik a madár- vagy repülőgéprajok mozgását. Itt tehát az emergens tulajdonság a populáció mozgásának egyfajta „vizuális valóságossága” volt. Ennek a megközelítésnek a célja tehát nem a tudományos felfedezés, hanem az alkalmazott műszaki fejlesztés volt, megjelenése óta széles körben alkalmazzák a játékfilmek készítésénél [13]. A tudományos célú alkalmazások között fontos lépés volt az izraeli Ben-Jacob és a magyar Vicsek Tamás csoportjai által kifejlesztett baktérium-modellek csoportja, melyekben a baktériumok két dimenzióban mozgó pontok voltak, amelyek jelekkel hatottak kölcsön és a tápanyagot valamint a jelanyagokat diffundáló anyagokként ábrázolták [14]. Az emergens tulajdonság ebben az esetben a kolóniák fraktálszerű alakja volt.

Kutatócsoportunk megközelítése abban különbözött az előbbiektől, hogy egy konkrét bakteriális jelzőmechanizmus, a quorum sensing elemeit építettük be az ágensekbe, emergens tulajdonságként pedig nem a mozgást vagy az alakot, hanem a populáció stabilitását, összeomlását illetve rétegződését vizsgáltuk. A quorum sensing maga egy biológiai részleteiben jól jellemzett jelző-mechanizmus, melynek segítségével a baktériumpopulációk viselkedése koordinálódik és így emergens tulajdonságként képessé válnak olyan feladatok megoldására, melyekre egy baktérium képtelen lenne [15]. Csoportunk első munkáiban a jelzések baktériumok rajzására gyakorolt hatását vizsgálta, beleértve a különböző kémiai jelek szerepét a baktériumok együttélésében [16]–[18].

A modellezésnek új aktualitást kölcsönzött a mikrobiom-kutatás fellendülése. A természet ugyanis tele van akár sok-tízezer baktériumfajt tartalmazó mikrobaközösségekkel, melyek hozzájárulnak a környezet, a klíma stabilitásához [19], de az emberi testben jelenlévő bélflóra kialakulásának, fennmaradásának megértése például egészségügyi problémák megoldását is elősegítheti [20]–[23]. Ezek a sok fajból álló közösségek nagyon komplex rendszerek, melyek laboratóriumban nem tanulmányozhatók, vizsgálatuk jelenleg többnyire leíró jellegű, az őket alkotó fajok meghatározásában merül ki [24].

Dolgozatomban két mikrobiomokkal kapcsolatos kérdést igyekeztem megválaszolni ágens-alapú modellezéssel. Az első kérdés arra irányult, hogy milyen következményei lehetnek a baktériumközösség tagjai közt létrejövő géncserének, a horizontális géntranszfernek, a genom szintű koordinációnak. Antimikrobiális faktorokkal (antibiotikumokkal) szembeni rezisztenciát biztosító gének megosztását vizsgáltam ágens alakú modellekkel, és azt találtam, hogy a közösség stabilizálódik (tagjai tartósan megélnék egymás mellett), ha ezek a tagok egymás antibiotikumaival szemben rezisztensek lesznek, és hogy az ilyen közösség, érdekes módon, önvédelemre képes, tehát hatékonyan ki tudja zárni a külső támadókat. Szemben az ezt megelőző modellezési kísérletekkel, itt evolúciós időskálán lejátszódó hosszú távú változásokat szimuláltam, tehát az ágens-alapú megközelítést egy eddig nem vizsgált területen alkalmaztam. A második kérdésem az volt, hogy a mikrobiomok tudják-e biztosítani a többenél kevésbé fit (lassabban növekvő) fajok túlélését, tudják-e ennek érdekében koordinálni az anyagcseréjüket. Egy komplex közösségnek ugyanis időnként szüksége lehet speciális anyagok termelésére képes fajokra, de nem világos, hogy ezek képesek-e túlélni „békeidőkben” is, tehát a náluk életképebb fajok vajon miért nem szorítják ki őket. Azt találtam, hogy a quorum sensing mechanizmus bizonyos paraméterkombinációi esetén az életképebb fajok „önmérsékletet gyakorolnak”, tehát stabilan képesek együttélni náluk kevésbé életképes fajokkal is, vagyis az élelemért és helyért történő versengés nem okvetlenül vezet a közösség funkcionális repertoárjának csökkenéséhez.

Disszertációm felépítése a következő. A 2. fejezet első részében röviden bemutatom a vizsgált jelenségek, a horizontális géntranszfer és a quorum sensing biológiai hátterét, és néhány

potenciális hatását, majd áttekintem a mikrobiális közösségek viselkedését leíró számítógépes modellek általános felépítését, osztályozási lehetőségeit, és ez alapján bemutatok néhány konkrét modellt. A 3. fejezetben írok a modellezéshez használt számítógépes eszközökről. A 4. fejezet a horizontális géntranszfer modell leírását és a modellel elért új eredményeim tartalmazza, különös tekintettel a rezisztencia gének transzferére és az érett közösségek viselkedésére vonatkozó eredményeimre a modellel. Az 5. fejezet a quorum sensing modellezésével kapcsolatos új eredményeimről szól. Itt bemutatom röviden a modellt és módosításaimat benne, majd részletesebben írok három témáról: először a különböző quorum sensing küszöbértékek hatásairól több faj együttélésére, azután a mérsékelt paraziták viselkedéséről a modellben, végül pedig az antibiotikum termelés, mint negatív interakció implementálásának következményeiről. A 6. fejezet az új tudományos eredmények rövid összefoglalását és lehetséges alkalmazási területeiket írja le. A dolgozat végén található saját publikációim listája, majd a felhasznált irodalmak jegyzéke és a függelékek.

2. Bevezetés/Irodalmi áttekintés

2.1. Biológiai háttér

A **baktériumok** egyszerű felépítésű, mikrométeres méretű élőlények, Földünk legelterjedtebb sejtis létformáját képviselik. Minden lehetséges élőhelyet képesek benépesíteni, beleértve az extrém hideg, meleg, sós, savas, lúgos közegeket és a radioaktív vagy erős UV sugárzásnak kitett területeket is [25]. Megtalálhatóak az emberi test külső és belső felszínein is [20], [21]. Egy egészséges felnőtt saját eukarióta sejtjeinél nagyobb számú bakteriális „albérlővel” rendelkezik, bár az elterjedt egy nagyságrend különbség a legújabb becslések fényében már nem állja meg a helyét [26]. Ezen baktériumok túlnyomó többsége nem káros az emberi egészségre, sőt többük elengedhetetlen a szervezet normális működéséhez. A béltraktus baktériumai részt vesznek a tápanyagok lebontásában, aminosavakat, vitaminokat termelnek, az első védelmi vonalat jelentik a kórokozók ellen és az immunrendszer működésére is jótékony hatással vannak [22], [23], hiányuk vagy összetételük megváltozása pedig súlyos betegségekkel van kapcsolatban (pl. elhízás, gyulladásoos bélbetegségek, cukorbetegség) [21], [27].

A baktériumok evolúciós sikerének kulcsa viszonylag egyszerű felépítésük, spóráképző képességük, gyors reprodukciójuk és változékonyságuk mellett, hogy legtöbbször nem magányosan élnek, hanem több fajt magukba foglaló csoportokat alkotnak. **Mikrobiomnak** nevezzük az egy élőhelyen tartósan fellelhető egysejtű életformák összességét. A mikrobiom ellenállóbb a külső hatásokkal szemben és többféle funkció ellátására képes, mint alkotó egyedeinek bármelyike. Ezt már Erwin Frink Smith 1905-ös bakteriális eredetű növényi betegségekkel foglalkozó munkájában is valószínűsítette [28]. A csoportok tagjai pedig folyamatosan érzékelik környezetük élő és élettelen komponenseit és reagálnak is ezekre. Amellett, hogy versengenek az erőforrásokért (például a helyért vagy a tápanyagokért), képesek az együttműködésre is [29], [30] a soksejtű eukarióta állatok közösségeihez pl. hangya, természet, darázs, méh családokhoz [1], madár vagy hal rajokhoz hasonlóan [2]. Összehangolják például anyagcserejüket, hogy birtokba vegyenek egy új életteret vagy hozzájussanak olyan tápanyagforrásokhoz, amikhez magukban képtelenek lennének [31], [32]. De a mikrobák koordinálhatják genetikai állományukat is, többek között például azért, hogy csak bizonyos mikrobákat tekintsenek idegennek és támadjanak meg, míg másokra ne jelentsenek veszélyt [33], [34].

A **sejtkoordináció** problémájának rendszeres felméréséhez a biológia szinte egészét át kellene tekintenünk. Megemlíthetjük, hogy az egysejtű szervezetek kémiai anyagokkal, gének felvételével (pl. plazmidok segítségével) érnek el szupraindividuális koordinációt [35], [36]. A

telepekbe szerveződött egysejtűeknél - bakteriális biofilmeknél - az anyagok cseréje a sejtek közötti kötőanyag-mátrix csatornáin keresztül zajlik [37], de legújabb felfedezések szerint egyes baktériumok bizonyos, helyhez kötött állapotokban nanocsöves csatornákon át közvetlenül is kommunikálnak, citoplazmikus komponenseket cserélnek [38]–[40]. Az ellenkező végléteket tekintve, a többsejtű állatok sejtjei viszont szervekbe, szövetekbe rendeződnek, és idegpályákon keresztül kommunikálnak.

Mindezek szisztematikus áttekintése természetesen nem lehet a dolgozat célja, de megjegyezhetjük, hogy ezek a nagyon különböző **mechanizmusok csoportosíthatók** bizonyos szempontok szerint. Például, hogy

i) a sejtek milyen funkcióikat koordinálják (pl. metabolizmus, mozgás, védekezési funkciók)

ii) mi a koordináció mechanizmusa, közege (kémiai anyagok pl. kis zsírolékony molekulák vagy polipeptidek diffúziója a környezeti közegben, vagy genetikai anyagok cseréje sejt közötti csatornákon vagy a környezeti közegen keresztül)

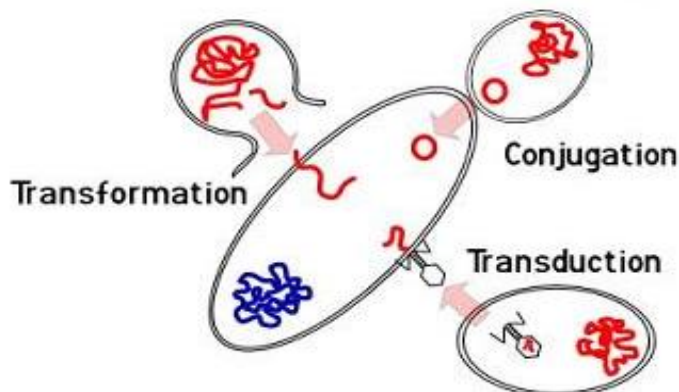
iii) milyen evolúciós előnnyel jár a koordináció (pl. ökológiai alkalmazkodás a jelenlegi környezeti feltételekhez, új élőhely meghódítása, evolúciós alkalmazkodás versenytársakhoz, stb.).

A kemotaxis, a sejtek (pl. baktériumok [41], vagy eukarióták az immunrendszerben [42] vagy az egyedfejlődés korai szakaszaiban [43]) koordinált mozgása valamilyen kémiai koncentráció gradiens mentén régóta ismert és kutatott folyamat [44]. Munkám során nem erre, hanem a baktériumok két kevésbé ismert, de jellemző koordinációs mechanizmusára koncentráltam. Először a rezisztencia gének cseréjével megvalósuló horizontális géntranszfer, ami a genom szintű összehangolódást eredményez, majd a kémiai anyagok diffúziója által létrejövő, a sejtek metabolizmusát koordináló úgynevezett quorum sensing mechanizmust vizsgáltam. Az alábbi bevezető e két jelenséget tekinti át az i)-iii) szempontok alapján.

2.1.1 Horizontális géntranszfer (genomszintű koordináció)

Szemben a generációk között lezajló egyirányú ún. vertikális géntranszferrel, a horizontális (más szóval laterális) géntranszfer (**HGT**, **LGT**) azt a folyamatot jelöli, mikor az örökítőanyag egymással szülő-utód kapcsolatban nem álló, sokszor más fajhoz tartozó sejtek között adódik át [45]. A jelenséget az 50-es évek óta ismerjük. Ekkor fedezték fel, hogy a diftéria baktérium egy virális gén átvétele révén ártalmatlan együttélőből halálos patogénné válhat [46] illetve hogy nem-rokon baktériumok között is mozoghat a genetikai anyag [47]. HGT több mechanizmus révén is létrejöhet. A legismertebbeket a 2.1-es ábra foglalja össze. Transzformációról akkor beszélhetünk, ha egy erre alkalmas sejt szabad DNS darabot vesz fel

a környezetből. Konjugáció esetén körkörös DNS darab, plazmid kerül át a donor sejtől a fogadó sejtbe, míg a transzdukciónál fertőző vírusok, bakteriofágok közvetítésével valósul meg. A baktériumoknál ma ismert főbb HGT mechanizmusokról részletesebben a következőkben írok.



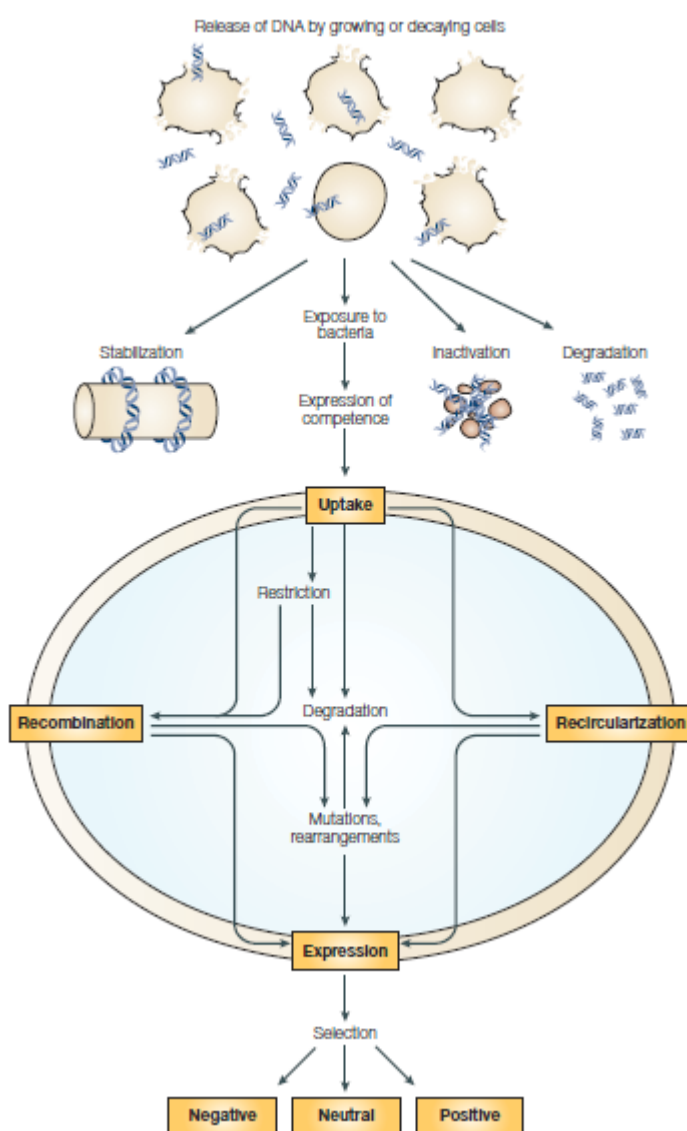
2.1. ábra: A horizontális géntranszfer főbb mechanizmusai a baktériumokban. (Forrás: <http://science.kennesaw.edu/~jdirnber/Bio2108/Lecture/LecBiodiversity/BioDivProkaryotes.html>)

Transzformáció során az extracelluláris térből DNS kerül a sejtbe, integrálódik a genomba és fejeződik ki az anyagcsere révén [48] (2.2. ábra). Hatékony transzformációra csak az úgynevezett kompetens sejtek képesek. Nem minden baktériumfaj tud kompetenssé válni, viszont sok patogénre jellemző ez a viselkedési stratégia, jelezve a nukleinsav felvétel fontosságát információszerzés vagy csak nyersanyag utánpótlás céljából. A kompetenciát jellemzően a környezeti feltételek hirtelen megváltozása váltja ki (ami a gyors alkalmazkodást kíván), például a tápanyagszint csökkenése vagy a tápanyagok összetételének megváltozása, de a quorum sensing szignálok is jelezhetik a DNS felvétel lehetőségét.

DNS molekulák mindig találhatóak a sejtek környezetében, például a *Pseudomonas aeruginosa* biofilmekben [49], de az emberi véráramban is [50]. Ezek származhatnak elhalt sejtekből, de élő mikroorganizmusokból is. A sejten kívüli lét és a DNS bontó enzimek természetesen veszélyeztetik szerkezetüket, de a megfelelően hosszú szakaszok képesek elég időt a sejtek közelében tölteni, hogy azok felvehessék őket. A szabad DNS felvétel rendszerint a fogadó sejt külső membránjában található kötőhelyekhez kapcsolódással kezdődik. Innen a sejt idegen nukleinsav elleni restrikciós enzimeinek elkerülése miatt többnyire 1 szálú DNS jut a citoplazmába. Plazmidokon kívül ott sem lehet tartósan jelen szabad örökítő anyag, így a felvett DNS-nek a kromoszómába kell épülnie. Ez leggyakrabban homológ rekombinációval valósul meg. Ehhez szükségesek a beépítendő szakasz végein és a kromoszóma adott régióiban is bizonyos erősen ismétlődő szakaszok, amelyek kapcsolódni képesek, és így a kromoszómális DNS egyik szála az adott régióban kicserélődik a hozzá hasonló, de idegen eredetű DNS darabra, és a sejtosztódás során az egyik utódsejt már az új változatot tartalmazza [49]. A transzformáció viszonylagos egyszerűsége és (megfelelő rekombinációs helyek mellett)

hatékonysága miatt napjainkban közkedvelt biotechnológiai eljárás is például fehérje expressziós rendszerek előállítására.

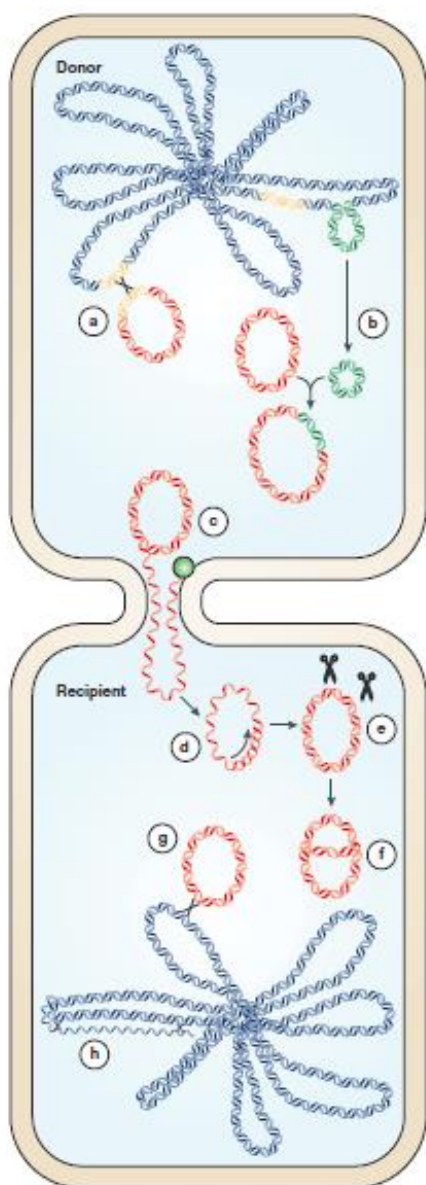
A rekombinációs helyek általában nem a háztartási (housekeeping) gének közelében, hanem transzkripciósan kevésbé aktív régiókban vannak, mivel itt kisebb eséllyel zavarja meg a beépülés a normális sejtfunciókat. Ez szelekciós hátrányt jelentene a transzformált sejt számára, ami pusztulásához vezetne. Hasonlóan hátrányos, ha az újonnan szerzett fehérje termelése sok extra energiát igényel a sejtől, de cserébe nem biztosít szelekciós előnyt, például antibiotikum rezisztenciát vagy hatékonyabb tápanyag felhasználást [49]. Ebből következik, hogy a sikeresen transzformálódó gének általában ilyen funkciókkal kapcsolatosak.



2.2. ábra: A természetes transzformáció folyamatának lépései vázlatosan. [49]

Konjugáció során két fizikai kontaktusba került sejt közt történik horizontális géntranszfer plazmid átadás segítségével. A plazmidok a citoplazmában található, önálló reprodukcióra képes kis kör alakú kettős szálú DNS-ből álló sejtalkotók [48] (2.3. ábra). A sejtek fizikai kontaktusa csak rövid ideig áll fent, ezért a kisméretű, gyorsan továbbítható plazmidok ideálisak a baktériumok közötti célzott információ átadáshoz. A plazmidokon találhatóak a konjugációért felelős enzimek génjei. A Gram-negatív baktériumok között terjedő F-plazmidot hordozó sejtek például a plazmid segítségével nyúlványokat, pilusokat képeznek, ezekből alakul ki a konjugációs cső, ami kapcsolódik egy másik sejthez (ha membránfehérjéik és membrán poliliposzacharidjaik

kompatibilisek). Ezen keresztül a plazmid egyik szála átjut a fogadó sejtbe, újra körkörössé zárul és mellészintetizálódik a másik DNS szál is, szintén a donor sejtől származó fehérjék segítségével [49].



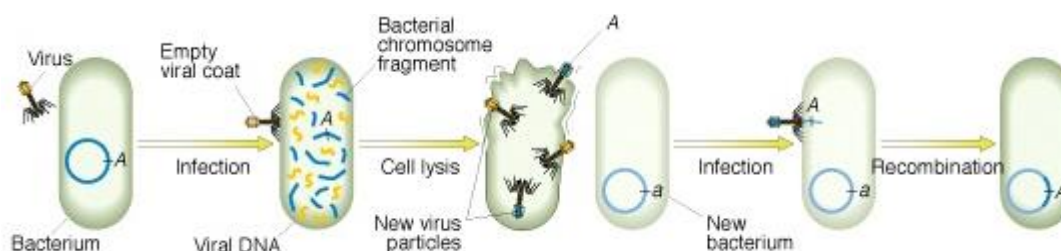
2.3. ábra: A konjugáció folyamata. Donor sejt: a: plazmid beépülése a kromozómába inzerciósszekvenciák irányította rekombináció segítségével; b: genetikai elem, például rezisztencia gén kivágódása a kromozómából és plazmidba épülése; c: egyszálú DNS átfűződése a fogadó sejtbe; Fogadó sejt: d: recirkularizáció és új DNS szál szintézis; e: restriktív endonukleázok a citoplazmában; f: plazmid replikáció; g: plazmid beépül a kromozómába illegitim rekombinációval; h: az átjuttatott genetikai elem (gén) beépülése a kromozómába rekombinációval. [49]

A plazmidok szabadon maradhatnak a sejtplazmában, és önállóan is megkettőződhetnek, de a megfelelő inzerciósszekvenciák segítségével a bakteriális kromozómába is beépülhetnek (illegitim rekombináció), hogy a sejttel együtt osztódjanak és csak a konjugációkor vágódjanak ki onnan. Ez a beépülés és kivágódás inzerciósszekvenciák segítségével történik, és ezek a szekvenciák teszik lehetővé idegen géneknek a kromozómáról a plazmidba integrálódását is [49]. Az antibiotikum rezisztencia gének is plazmidokon jutnak át leggyakrabban egyik sejtől a másikba, ezért ezt a géntranszfer mechanizmus szerepel a számítógépes modellben is.

Végül a **transzdukciónak** mechanizmus során baktériumokat fertőző vírusok, bakteriofágok (fágok) révén kerül az egyik baktériumsejt genetikai anyaga a másikba [48] (2.4. ábra). A bakteriofágok a kapszid nevű fehérjeburokból (fejrész), a hozzá kapcsolódó farkrészből és a fejbe csomagolt DNS-ből állnak. A fark részét képezik azok a „lábak”, amikkel a fág a baktérium felszínéhez kapcsolódik, bontó enzimek segítségével megbontja a sejtfaát és a fágfejből a gazdasejtbe juttatja a tárolt DNS-t [48]. Bizonyos fágok csak bizonyos baktériumokat képesek megfertőzni, sejt felszíni marker molekuláik alapján felismerve azokat, ezt nevezzük fág-specifitásnak. Ezen alapul a fág-terápia is, aminek a lényege, hogy egy patogént antibiotikum helyett a kizárólag rá specifikus fággal pusztítanak el [51].

A sejtbe került fág DNS előtt, ha elkerülte a plazma restrikciós endonukleázait két út áll. Vagy beépül a gazdasejt kromoszómájába és észrevétlenül vele együtt replikálódik, ekkor temperált fágoknak nevezzük, vagy azonnal lítikus ciklusába lép és a DNS-éről szintetizált fehérjék segítségével átprogramozza a sejtet, önellátás helyett fág sokszorosításra (fág DNS, fehérje termelésre, és a bakteriofág összeszerelésre), ami természetesen a sejt pusztulásához vezet [52]. Az inaktív, úgynevezett lizogén ciklusban lévő fágok is kivágódhatnak a genomból és aktiválódhatnak, általában valamilyen stresszhelyzet, például éhezés, hirtelen hőmérséklet, PH változás hatására [53].

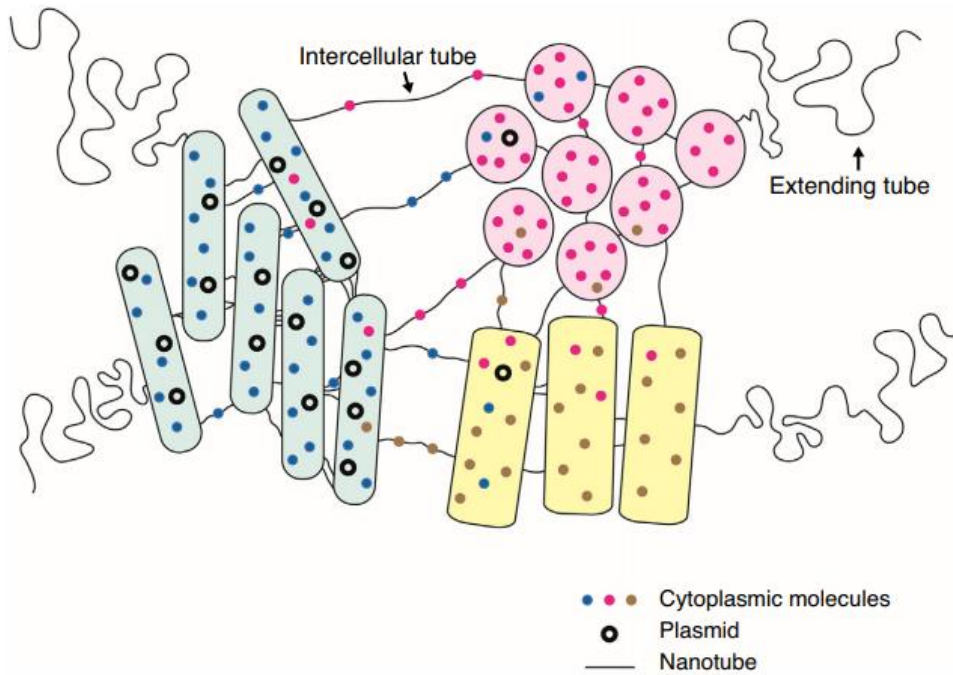
Transzdukció esetén nem csak a fág genom, hanem a fágot előállító baktérium DNS-ének egy része is átkerül a fogadó sejtbe. Ez vagy azért következik be olykor, mert a temperált fág nem tökéletesen vágódik ki a baktérium kromoszómából, és annak egy részét is magával viszi a fág fejbe csomagolva, vagy pedig mert a fág fejbe nem a fág DNS, hanem a széteső baktérium kromoszóma egy hasonló méretű darabja csomagolódik be. Mindkét esetben a bakteriális DNS-t (is) tartalmazó fág be tudja juttatni tartalmát egy erre alkalmas sejtbe, ha egy normál szerkezetű faggal egyszerre támadja meg azt. A bakteriális eredetű DNS aztán a citoplazmába jutva a korábbiakban említett rekombinációs mechanizmusokkal a fogadó sejt részévé válhat [52], [54].



2.4. ábra: A transzdukció folyamatának vázlatja. (Forrás:

http://www.cas.miamioh.edu/~wilsonkg/old/gene2005/manipulation/geneengineering/code/bacteria/bacteria_files/)

A fenti, klasszikusan ismert mechanizmusok mellett több speciális mechanizmus is létezik, közöttük talán a legújabb **nanocsövek** révén történő közvetlen sejtközötti kapcsolat, amely egymás melletti sejtek citoplazmája között jön létre [38]–[40]. Ennek révén nemcsak genetikai anyag, de enzimek, metabolitok is átjuthatnak a szomszédos sejtekbe (2.5. ábra). Végül idetartoznak a néhányszor tíz nanométertől néhány száz nanométer átmérőjű **lipidmembrán-veszikulumok** által mediált mechanizmusok is, melyek baktériumoknál is fontos szerepet játszanak [55]–[57].



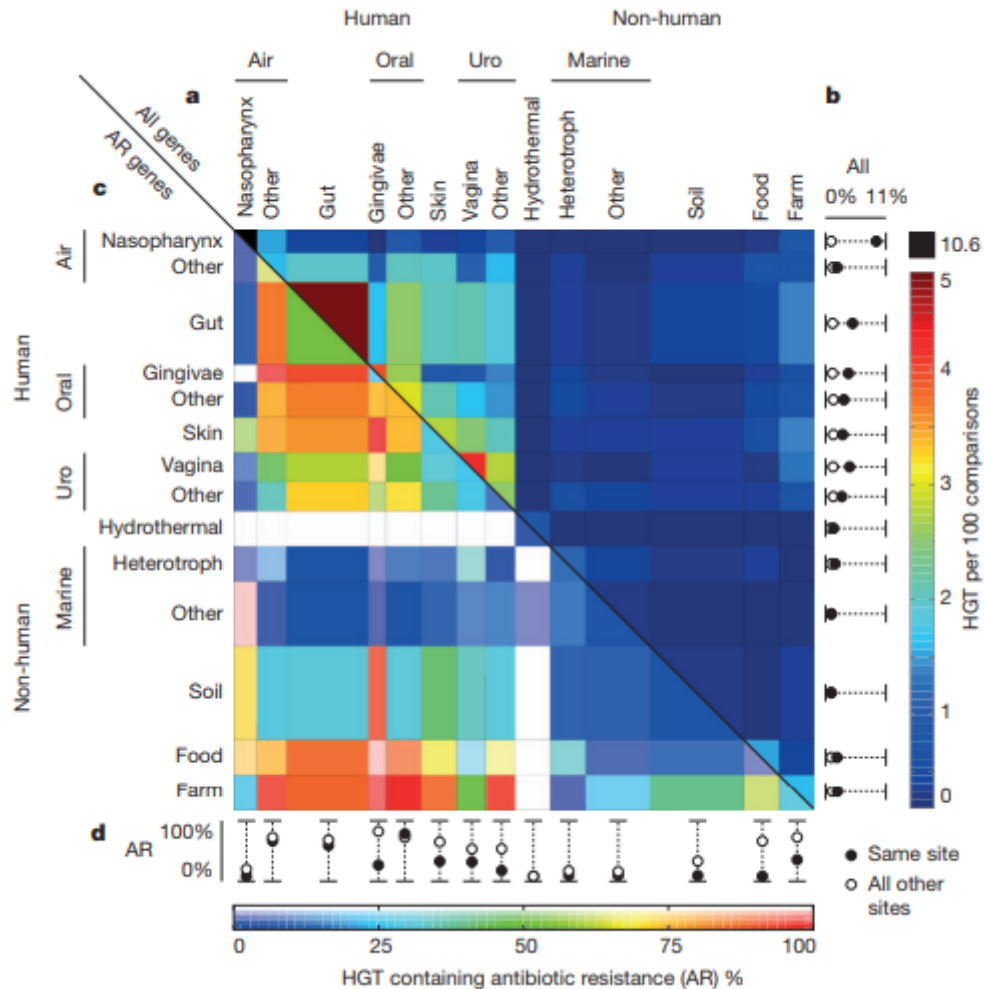
2.5. ábra: Különböző bakteriális sejtek felszínén kialakuló nanocsövek melyek lehetővé teszik a citoplazma anyagainak cseréjét. [39]

Tipikus példa a HGT-re az **antibiotikum-rezisztencia gének átadása** baktérium sejtek között [58]. A véletlen pontmutációkon alapuló természetes szelekcióhoz képest ez a folyamat nagyon gyors. Hatása szinte azonnal megnyilvánulhat, például az antibiotikum rezisztencia gént szerzett sejt rögtön ellenálló lesz a szerre, nem kell a rezisztenciát fokozatosan, nemzedékről nemzedékre kialakítania. A sejtekre káros anyagok azonban nem csak a gyógyászatban használt antibiotikumok lehetnek, hanem a baktériumok működése során keletkező és a környezetbe ürített anyagcsere melléktermékek is, ezeket összefoglaló néven antimikrobiális faktoroknak nevezzük. A tartósan együttélő különböző sejteknek tolerálniuk kell ezeket is, és ezt a képességet szintén géntranszfer útján szervezhetik meg leggyorsabban.

A **génátadás hatékonyságát** sok tényező befolyásolja. A HGT mechanizmus, a kölcsönható sejtek távolsága és a fogadó sejt idegen DNS-t elimináló rendszerei mellett a DNS-ek hasonlósága, stabilitása, kodon használata, és génhálózatok kompatibilitása is szerepet játszik abban, hogy kapott genetikai anyag funkcionálni tud-e majd a fogadó sejtben [59].

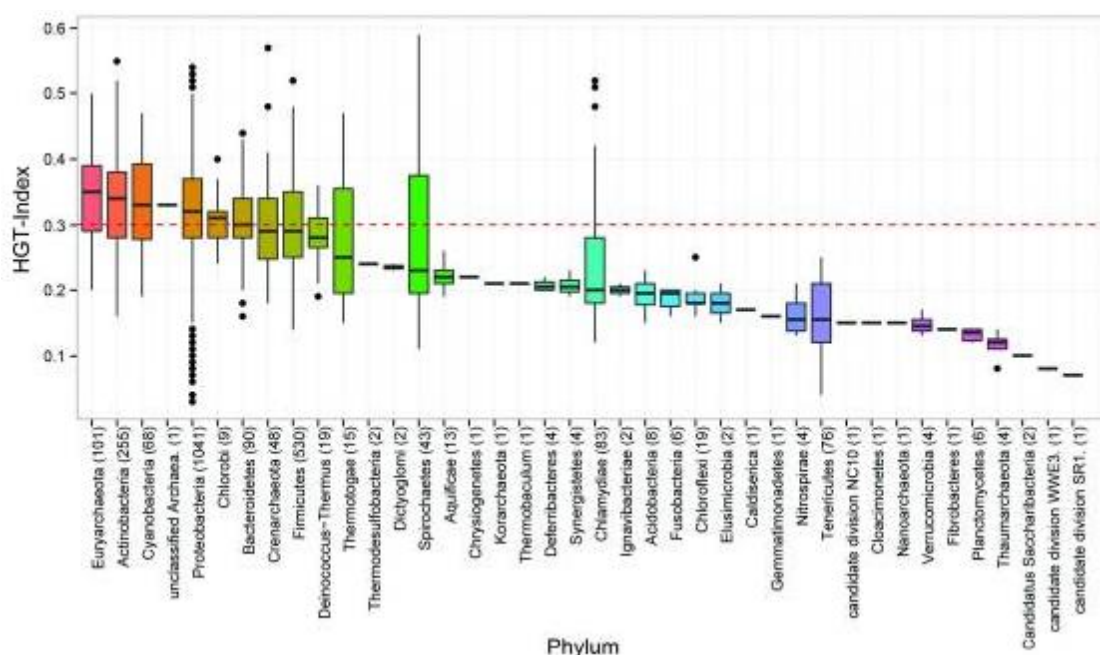
A HGT mechanizmusok egyik további, nemrég felfedezett tulajdonsága, hogy **sokkal gyorsabban lejátszódhatnak**, mint az sokáig gondolták. Így pl. az antibiotikum rezisztencia génei néhány óra alatt elterjedhetnek egy tengeri baktérium-kultúrában [60]. A folyamat gyakoriságát vizsgálva különböző baktériumok közt [61], [62] kimutatták, hogy az a közös vagy természetes módomban kapcsolódó mikrobiomot alkotó fajok közt a leggyakoribb, különösen olyan sűrű közösségekben, mint az emberi tápcsatorna. A bélflóra tagjai például sokkal könnyebben

adnak át géneket egymásnak vagy a tápanyagban fellelhető baktériumoknak, mint a tengerekben vagy a talajban élő fajoknak (2.6. ábra). Tehát a rendszertani vagy földrajzi közelségnél fontosabb a HGT szempontjából, hogy a partnerek egy gazdaszervezetben éljenek, vagy kapcsolódó mikrobiomot alkossanak.



2.6. ábra: A horizontális géntranszfer gyakorisága különböző élőhelyek mikrobái között. A (felső háromszög): az géntranszferek százalékos aránya az összehasonlított genomokban. Látszik, hogy az emberi szervezeten belül a leggyakoribb a géntranszfer. B: Azonos élőhelyek közt (fekete kör) gyakoribb a transzfer, mint a különbözőek közt (fehér kör). C (alsó háromszög): a géntranszfereken belül az antimikrobiális faktorok átvételének százalékos aránya magasabb hasonló vagy természetes kapcsolatban lévő életterek, tehát itt az emberi szervezet, a táplálék és a háziállataink baktériumai közt. D: a különböző élőhelyek közti horizontális géntranszfereken (fehér kör) nagyobb antimikrobiális faktorok százalékos aránya, mint az azonos élőhelyek közti transzferek esetén (fekete kör). [61]

A HGT ezen tulajdonságainak köszönhetően kulcsszerepet játszik a **komplex mikrobiomok**, például az emberi bélflóra [63], a szájban élő mikroba közösség [64] vagy a tengerekben úszó szerves törmelék beborító biofilm kialakulásában [65], mivel a közösség tagjai HGT segítségével hamar rezisztenssé válnak egymás káros anyagainra és képesek lesznek együttműködni. A rezisztencia gének átvétele ugyanakkor súlyos egészségügyi kockázatot is rejt magában, ez áll ugyanis a sok antibiotikumnak ellenálló, úgynevezett **multirezisztens baktériumtörzsek** kialakulásának és terjedésének hátterében. A fejlett világ kórházaira jellemző intenzív antibiotikum használat például szelektív nyomást fejt ki a mikrobákra, ami a rezisztenciagének lehető leggyorsabb terjedésének kedvez. Példa erre a *Clostridium difficile* okozta súlyos kórházi fertőzések nagy száma is [60], [66]. Egy jelentés szerint 2016-ban mintegy 700000 ember halt meg antibiotikum rezisztens fertőzésekkel összefüggésben világszerte, és ha a mai tendenciák folytatódnak, akkor ez a szám 2050-re a 10 milliót is elérheti [67], és ebben a rendkívül gyors terjedésben a HGT-nek is jelentős szerepe lehet. Kutatások ezekkel összhangban valóban kimutattak idegen eredetű DNS részeket számos bakteriális genomban (2.7. ábra) [68]. Összességül tehát kijelenthető, hogy a horizontális géntranszfer a mikrobiális evolúció egyik fő mozgatórugója [69]–[71].



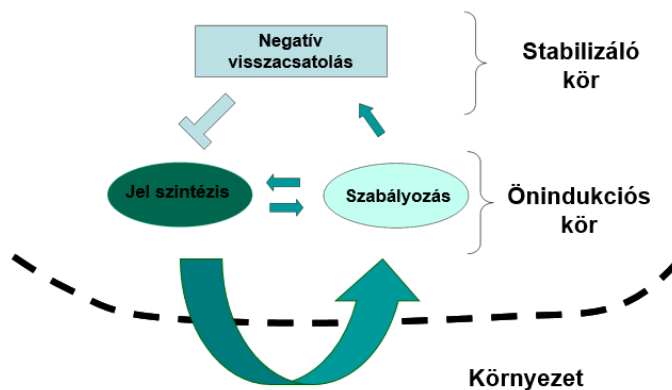
2.7. ábra: Az idegen DNS becsült aránya bizonyos bakteriális phylumokban. A HGT-index a HGT-vel nyert génszám és a teljes teljes genomális génszám hányadosa. A szagatott vonal jelzi az értékek mediánját, a boxplotok alatt zárójelben az egyes csoportokhoz tartozó vizsgált genomok száma látható. A felmérés alapján 10-35% közé becsülik a HGT-ből származó gének arányát a fehérje kódoló szekvenciák közt. [68]

A fent leírtak alapján a kooperációs **mechanizmusok csoportosítási szempontjai szerint** a rezisztencia gének szétterjedése egy mikrobiomban horizontális géntranszfer segítségével i) a közösség védelmi funkcióinak összehangolását jelenti. ii) A koordináció mechanizmusa az antimikrobiális faktor rezisztencia gének, tehát genetikai anyag átadása jellemzően plazmidok segítségével a sejtek közötti pórusokon át. iii) A koordináció célja az pedig a mikrobiomot alkotó fajok együttélésének lehetővé tétele (a fajok „összeszokása”), és együttműködésük lehetővé tétele.

2.1.2. Quorum sensing (metabolikus koordináció)

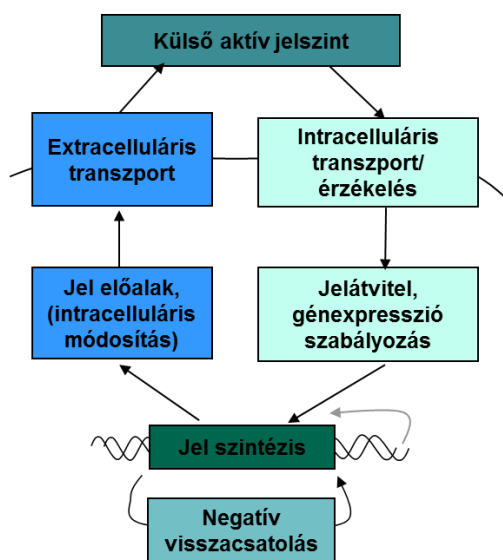
A **quorum sensing** (lokális sejtsűrűség érzékelés) az úgynevezett autokrin jelzési mechanizmusok egyik válfaját jelenti. Autokrin jelzésről akkor beszélünk, ha egy sejt olyan anyagot termel, amellyel saját működését is befolyásolja [72]. Ezt a jelenséget baktériumoknál *először* egy magyar kutató, Tomasz Sándor mutatta ki a 60-as években a Rockefeller Egyetemen, *Streptococcus pneumoniae* sejteknél [73]. A quorum sensing legelső, kidolgozott példája a *V. fischeri* baktérium sejtlumineszcencia jelensége jóval későbbi keletű. Ez világított rá arra a ma már jólismert tényre, hogy egy géneken alapuló jelenség populációsztintű viselkedés szinkronizálására képes [74]. Majd a kilencvenes években született meg a ma is használatos quorum sensing elnevezés, ami kifejezi, hogy a sejtek számának (pontosabban a sejtsűrűségnek) függvényében a populáció viselkedése megváltozik, a közösség képessé válik olyan feladatokra, amelyet magányos sejtek nem tudnának megoldani [15].

Mai felfogásunk szerint a **quorum sensing** (QS) mechanizmus alapja egy úgynevezett *önindukciós kör*, amelyben egy jelmolekula pozitívan befolyásolja saját termelését. Egy ilyen öngerjesztő folyamat intenzitása korlát nélkül növekedne, ezért szükség van egy le szabályozó mechanizmusra is, amely a rendszert stabilizálja [75]. Az ilyen szabályozókört egészében *inkohérens feed forward loop*nak szokás nevezni. Kérdés, hogy miképpen teszi ez lehetővé, hogy egy sejt reagáljon a környezetére. Ez az úgynevezett *környezeti csatolás* révén valósul meg, amelyet legegyszerűbb formájában úgy képzelhetünk el, hogy a jelanyag koncentrációja a sejtfalon, mint egy féligáteresztő hártyán keresztül egyensúlyban van a külső környezettel (2.8. ábra), de a többi komponens ezen nem tud áthatolni. Ha a környezetben a jelmolekulákat elsodorja a közeg mozgása, a koncentráció nem fog kellő szintre emelkedni. Viszont ha sok sejt van együtt, a koncentráció megemelkedik, és a szabályozókör működésbe lép.



2.8. ábra: A quorum sensing mechanizmus általános vázlata.

Ennek az egyszerű sémának számos változata ismert, ezek **fő közös lépéseit** az 2.9. ábra foglalja össze. Valamilyen negatív visszacsatolással szabályozott, de öngerjesztő módon szignál, jel molekula (S) képződik. Ez kijut a sejtől diffúzióval vagy aktív transzporttal. A citoplazmában vagy a kijuttatás során módosulhat is, hogy elnyerje aktív formáját. Az immár aktív szignál szintje a sejtől kívüli térben a sejtek mennyiségével arányosan változik. A jel természetétől függően diffúzióval vagy aktív transzporttal bejut a sejtbe, vagy csak köt a megfelelő transzmembrán receptorhoz, és egy adott jelszint felett olyan szignáltranszdukciós láncot indít el, ami a génexpresszió megváltozását eredményezi [76]. Az intenzívebb jeltermelés mellett termelni kezd a sejt azokat az anyagokat, úgynevezett közös javakat, faktorokat (F), amelyekből jelentős energiaigényük miatt egy sejt nem, sok baktérium összehangolt, szinkronizált működéssel viszont már elő tud állítani hatásos mennyiséget.

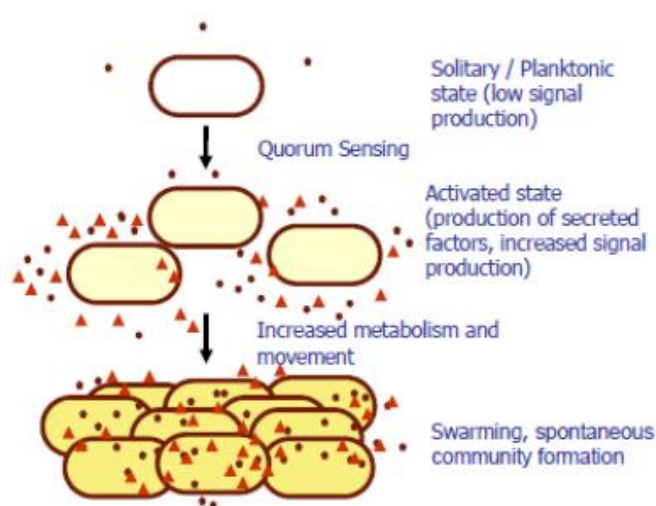


2.9. ábra: A quorum sensing általános lépései. [153] alapján.

Ezek a **közös javak** lehetnek többek közt például virulencia faktorok, toxinok, az extracelluláris közeget bontó vagy átjárhatóvá tevő enzimek, biofilm képző anyagok, lumineszcencia faktorok, rajzást elősegítő fehérjék, felületaktív anyagok vagy kompetenciát (transzformációs képességet) befolyásoló tényezők (ez is csak nagy sejtsűrűség esetén hatékony) [77]. A sok **baktériumfajt tartalmazó kolóniák** különösen érdekes példái a sejtkoncentrációt jelző rendszerek működésének: bizonyos jelekre válaszul a kolónia számszerű összetétele módosul, egyes fajok elszaporodnak, mások visszaszorulnak [78], [79]. Megállapíthatjuk tehát, hogy a QS bizonyos gének

aktivitásának megváltoztatása révén segíti a baktériumok működésének gyors szinkronizálódását és ezáltal a közösség sikeres alkalmazkodását a változó környezeti feltételekhez.

A legismertebb és legjobban jellemzett quorum sensing rendszerek az AHL rendszerek. Ilyen a **LuxIR** rendszer is, ami a *Vibrio fischeri* biolumineszcenciájáért felel, ezért a hasonló génhálózatokat LuxIR homológoknak is nevezik. Ezek regulátor (R) és szintézis (I) géneket tartalmaznak. A szintézis gének alap aktivitással mindig működnek, és az AHL (acil-homoszerin lakton) molekulák termelését segítik. Ezek kisméretű molekulák, amik egy homoszerin-lakton gyűrűből és egy valamilyen acil-csoportból állnak és diffúzióval szabadon közlekednek az intracelluláris és az extracelluláris tér között [80]. Az acil-csoportok változatossága miatt lehetséges, hogy a hasonló rendszerek egy fajon belül vagy különböző, de együtt élő fajok esetén egymástól elkülönülten tudnak működni.



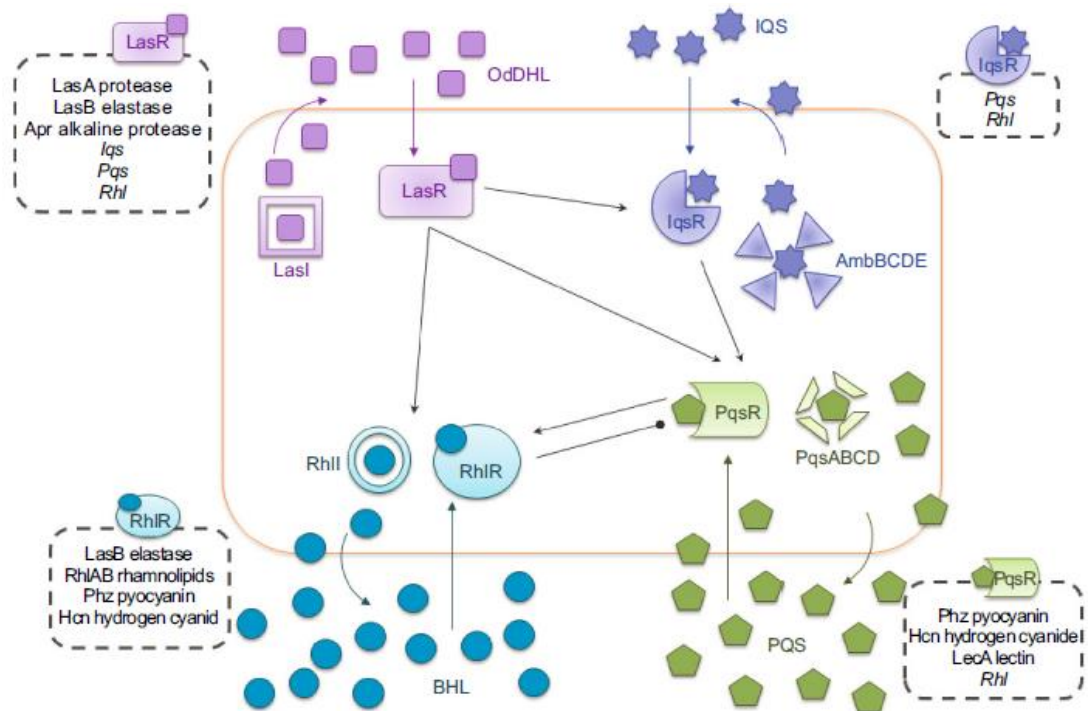
2.10. ábra: A *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing által szabályozott rajzásának vázlata [16].

Jó példa az ilyen quorum sensingre a *Pseudomonas aeruginosa* rajzása. A *P. aeruginosa* egy opportunistá patogén baktérium, tehát az egészséges szervezetben is megtalálható, de csak a legyengültet betegíti meg. Legismertebb fertőzési eseteit a cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdejében illetve a nagy felületű égési sérülések esetén képződő biofilmek okozzák. A *P. aeruginosa* különösen veszélyes, mivel a legtöbb törzse antibiotikum rezisztens [52]. Nedves környezetben él, és ha a sejtek közt diffúzióval terjedő jel molekulák koncentrációja meghalad egy adott szintet, a baktérium telep sejtjei alapállapotból aktivált állapotba lépnek, amelyben biofilm képzéshez szükséges anyagokat kezdenek kiválasztani (2.10. ábra). A biofilm egyrészt az a közeg, amiben a baktériumok flagellumaik segítségével gyors, összehangolt, úgynevezett rajzó mozgásra (swarming) képesek, másrészt ez a réteg csökkenti például a légzésre alkalmas felületet a tüdőben, és így más fertőzések melegágya is lehet. A biofilm kialakítása és a gyors rajzó mozgás nagy energia felhasználást követel, így csak akkor kifizetődő, ha a sejtek egyszerre és elegendően kezdenek neki, és ezzel élőhelyük új, tápanyagban gazdag részeit vehetik birtokba [81].

A *P. aeruginosa* több quorum sensing rendszerrel is rendelkezik, melyek egymással kölcsönhatva szabályozzák a rajzást és egyéb virulenciával összefüggő folyamatokat [82] (2.11. ábra). A LasIR és az RhlIR rendszerek LuxIR homológok, az előbbi áll a hierarchikus

szabályozás csúcspontján (master regulátor), serkenti az elasztáz emésztőenzim termelést, és az összes többi QS kör működését, míg az utóbbi a rhamnolipid felületaktív anyag előállítását és sok virulencia faktor termelését szabályozza (ő a fő effektor a hálózatban) [82]–[84]. A harmadik LuxR típusú elem a QscR, ennek nincs saját szintáza, hanem a LasI jelére reagál és gátolja a LasIR és az RhlIR rendszereket, biztosítva ezzel a szükséges negatív visszacsatolást, ami a stabil működéshez szükséges [85]. A PQS (Pseudomonas quinolone signalling) rendszer nem AHL típusú. Működése serkenti többek közt a pyocyanin toxin termelését ezáltal növeli a virulenciát és közvetlenül aktiválja a Rhl rendszert, ami viszont negatív visszacsatolásként gátolja őt [82] [86], [87]. Végül az IQS (integrated QS) rendszer felel azért, hogy a környezeti stressz hatásokat is figyelembe vegyék a sejtek a QS során, és például foszfáthiányos közegben át is képes venni a Las szerepét [88].

A későbbiekben bemutatott számítógépes modell ezt a folyamatot, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing vezérelte rajzását írja le egyszerűsített formában egy LuxIR homológ QS kör felhasználásával. Az egyszerűbb séma alkalmazása azért praktikus, mivel így a modell általánosabb érvényű és a folyamatokat vezérlő alapvető tényezőket sem kendőzik el a finom szabályozásból adódó hatások.



2.11. ábra: A *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing szabályozásának vázlata Lee és munkatársai szerint [82]. A nyilak jelzik a serkentő a kerek végű vonalak a gátló kölcsönhatásokat.

(Az ábra a QscR-t nem tartalmazza.)

A fent bemutatotton kívül igen sokféle quorum sensing rendszer létezik és több szempont alapján is **csoportosíthatjuk** őket. Napjainkban a leggyakrabban a jeltermelés és a hatásmechanizmus szerint szokás 4 fő típust elkülöníteni [89], [90]. Ezen csoportok főbb

jellemzői az 2.1. táblázatban, néhány példa rájuk pedig az 2.2. táblázatban található. Az egyes típusok általában jellemzőek bizonyos baktériumcsoportokra (Gram-pozitív, Gram-negatív) és hasonló kémiai szerkezetű jelmolekulákra épülnek (pl. kis hidrofób molekulák, cirkuláris vagy valamilyen módosított aminosavval rendelkező rövid peptidláncok).

A rendszerek négyes csoportosításának egyik szempontja, hogy **Gram-pozitív vagy Gram-negatív** sejtekről van-e szó. A Gram-pozitív baktériumokban, melyek vastag peptidoglikán réteget tartalmazó sejtfa a Gram-festéssel lilára színeződik, a termelt jelmolekulákat éppen a sejtfa szerkezete miatt, valamilyen aktív transzport mechanizmussal kell kijuttatni a sejtől. Ezzel szemben a Gram-negatív baktériumokban, melyek sejtfa kevésbé masszív (ezért Gram-festéssel nem színezhető) és átjárhatóbb kismolekulák részére, a jelek szabadon kidiffundálhatnak. A másik csoportosítási szempont, hogy a **jelmolekula képes-e bejutni a sejtbe**, vagy az extracelluláris térben transzmembrán receptorhoz kötődik. Az előbbi esetben Gram-negatív rendszereknél ez egyszerű diffúziót jelent, míg Gram-pozitívoknál aktív transzportot. Az utóbbi esetben a jelmolekula nem jut be a sejtbe, hanem a felszínére kötve (általában kétkomponensű rendszer, two-component system segítségével) beindít egy foszforilációs jelátviteli láncot, ami valamilyen DNS-kötő fehérje aktiválásához vagy gátlásához vezet. A transzkripciós faktorokként hathatnak, vagy az előbbieket aktivitásukat befolyásolhatják.

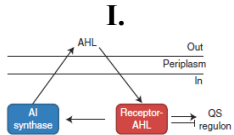
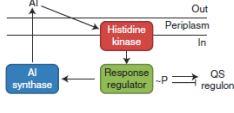
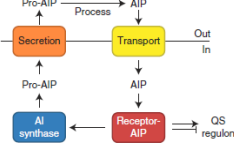
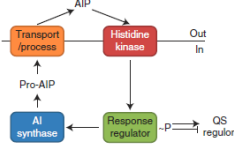
Maguk a **jelek** Gram-negatív esetben általában kisméretű, sokszor részben hidrofób molekulák, ezeket szerkezetük alapján szokás csoportosítani. Vannak például acil-homoszerin laktonok (AHL), kinolinok, különböző zsírsavak (DSF) vagy furanosyl-borát diészterek (AI-2). A Gram-pozitív jelek rendszerint rövid peptidláncok, melyeket feromonoknak is neveznek. Szintézisük után még nem aktívak, a citoplazmában, az extracelluláris transzport során, de néha a sejten kívüli térben is változásokon kell keresztül menniük, hogy jelként érzékelhesse őket a többi sejt. Ezek a változások lehetnek hasítások (pl. SHP-k, az RNPP család tagjai, Gly-Gly motívumot tartalmazó peptidek), peptidlánc cirkularizáció (pl. Agr-típusú ciklikus feromonok (AIP)) vagy aminosav módosítások (pl. ComX, lantibiotikumok) is.

A fenti csoportosítás a QS rendszerek nagy részére egyértelműen alkalmazható, vannak azonban **nehezen besorolható rendszerek** is. A gamma-butyrolaktonokat például Gram-pozitív baktériumok használják, de szabadon közlekednek az intracelluláris és az extracelluláris tér között [91], [92]. Az AI-2 (autoinducer-2) megtalálható Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokban is, bizonyos fajokban transzmembrán receptoron át hat [93], másokban viszont membránkomplexek segítségével jut be a sejtbe [94]. Az AI-2 a normál anyagcsere egy mellékterméke, ezért rendkívül elterjedt molekula, és többen a fajok közti univerzálisan értett jelzésként értelmezik [95]–[97], bár jelenléte önmagában nem garantál működő quorum sensing mechanizmust [98], [99], van, hogy egyszerűen csak egy tényező a sejtire ható számos környezeti faktor közül.

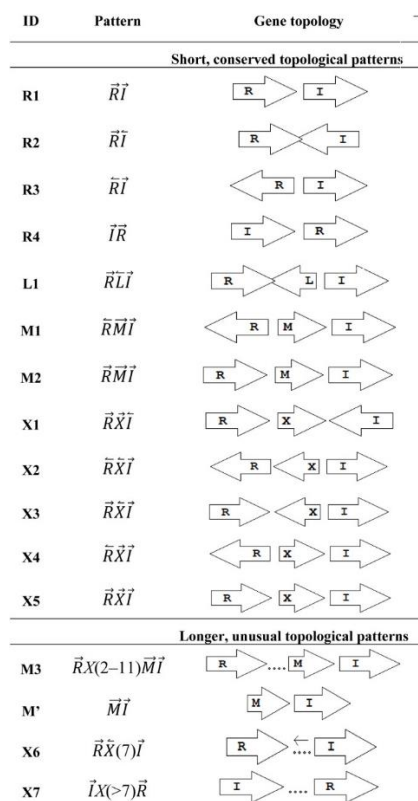
2.1. táblázat: A bakteriális quorum sensing rendszerek egy lehetséges csoportosítása és alkotóelemeik. [153] alapján, a képek forrása: [89]

Típus	I.	II.	III.	IV.
Jellemző baktériumcsoport	Gram-negatív	Gram-negatív	Gram-pozitív	Gram-pozitív
Jel (autoinducer, AI) szintézis	Másodlagos metabolit szintézis	Másodlagos metabolit szintézis	Peptid szintézis	Peptid szintézis
Szintetizált jel alakja	Különféle kismolekulák	Különféle kismolekulák	Prepeptid	Prepeptid
Extracelluláris transzport	Diffúzió	Diffúzió	Jel módosítás (hasítás) Aktív transzport	Jel módosítás (hasítás, cirkularizálás, aminosav módosítás) Aktív transzport
Sejten kívüli, aktív jel alakja	Kismolekula	Kismolekula	Rövid peptidlánc	Peptidlánc
Intracelluláris transzport	Jel diffúzió	Kapcsolódás transzmembrán receptorhoz	Aktív transzport	Kapcsolódás transzmembrán receptorhoz
Intracelluláris jel	Kismolekula	Foszforilációs szignál	Rövid peptidlánc	Foszforilációs szignál
Hatásmechanizmus	DNS kötő fehérje aktiválása/ gátlása	DNS kötő fehérje aktiválása/ gátlása	DNS kötő fehérje aktiválása/ gátlása	DNS kötő fehérje aktiválása/ gátlása
Negatív visszacsatolás	Represszor fehérjék, szabályozó RNS molekulák, ...	Represszor fehérjék, szabályozó RNS molekulák, ...	Represszor fehérjék, szabályozó RNS molekulák, ...	Represszor fehérjék, szabályozó RNS molekulák, ...

2.2. táblázat: Példák a quorum sensing rendszerek egyes típusaira. A képek forrása: [89]

Típus	Rendszer neve	jelmolekula	Jellemző faj a rendszerrel	Forrás
<p>I.</p> 	AHL (N-AHL, AI-1)	acyl-homoserine lactones	Elterjedt rendszer, pl.: <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	[15], [100]–[102]
	Quinoline signalling	quinolines (AQS, HHQ, PQS, HMAQs)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia</i> spp.	[103]–[107]
	IQS	2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[82], [88], [108]
	phc QS	3-OH-PAME, 3-OH-MAME	<i>Ralstonia solanacearum</i>	[109]–[111]
	Photopyrone QS (PPYs)	alpha-pyrone	<i>Photobacterium luminescens</i>	[112]
	Dialkylresorcinols (DARs), cyclohexanediones (CHDs)	Dialkylresorcinols (DARs), cyclohexanediones (CHDs)	<i>Photobacterium asymbiotica</i>	[113]
	GBLs (gamma-butyrolactones, A-factor)	CHB	<i>Streptomyces</i> (S. <i>chattanoogaensis</i>) Gram-pozitív !	[76], [91], [92]
<p>II.</p> 	alpha-hydroxyketones (AHK) QS	CAI-1 ((Z)-3-aminoundec-2-en-4-one) LAI-2	Vibrionaceae (<i>Vibrio harveyi</i>), <i>Legionella pneumophila</i>	[93], [114]–[116]
	HAI-1 QS	N-(3-hydroxybutyryl)-HSL	<i>Vibrio harveyi</i>	[93]
	Diffusible signal factor: (B/C/I)DSF	cis-2-unsaturated fatty acids	<i>Burkholderia</i> spp., <i>Xantomonas campestris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[88], [117]–[120]
	AI-3	epinephrine, norepinephrin-like molecule	<i>Escherichia coli</i>	[93], [121], [122]
II. III.	AI-2 (autoinducer 2, QS-2, DPD)	furanosyl-borate diesters	Nagyon gyakori Gram-pozitívokban, Gram-negatívokban is, pl. Vibrionaceae (<i>Vibrio harveyi</i>), Enterobacteriaceae (<i>E. coli</i>)	[93], [94], [96], [97]
<p>III. peptid szignál</p> 	Short hydrophobic peptide (SHP) signalling	SHP, CIP, XIP	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Listeria</i> spp.	[123]–[127]
	RNPP family	CSF, PapR-AIP, iCF10, cCF12, PhrA-AIP	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	[76], [89], [90], [123], [125], [128]–[130]
<p>IV. peptid szignál</p> 	ComQXPA	ComX	<i>Bacillus subtilis</i>	[131], [132]
	Arg-type cyclic pheromones	AIP (I-IV), GBAP, Lam-AIP	<i>Streptococcus aureus</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	[76], [123], [128], [133], [134]
	Gly-Gly peptides (class II. bacteriocine AMP related)	Pl.: CSP, BIpC signal	Pl.: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	[123], [135], [136]
	lantibiotics (class I. small AMPs)	Pl.: nisin, subtilin	Pl.: <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	[133], [137], [138]

Egy másik érdekes szempont a QS jelzőrendszerek csoportosítására **génjeik jellegzetes elhelyezkedése a kromoszómán**, amely már a legegyszerűbb QS rendszereknél is igen változatos lehet [139]–[141]. Az egyik legismertebb példa erre a *V. fischeri* és a *P. aeruginosa* fajokon már régóta tanulmányozott már említett N-acil-homoszerin-lakton (AHL) jelzőrendszer, melynek önindukciós köre két elemből, az I szintáz génből és az R szenzor-regulátor génből áll. A stabilizáló kör már ez esetben is nagyon sokféle lehet, és sokszor nem is pontosan ismert. A 2.12. ábrán jól látható, hogy a két gén szinte összes lehetséges elhelyezkedési variációja előfordul, az időnként köztük lévő gének pedig konzerváltak, vagy a „stabilizációs körben” szerepet játszó negatív regulátorok (az ábrában az L és M gének ilyenek), időnként pedig a QS által szabályozott funkcióhoz, például plazmid mobilizációhoz van köztük [139], [140].



2.12. ábra: Az AHL rendszer lehetséges topológiái. Az első oszlopban a topológia kódja, a másodikban és a harmadikban pedig szenzor-regulátor (R), a szintáz (I) és az egyéb gének sorrendje és elhelyezkedése látható. A jobbra mutató nyíl jelenti, hogy a forward, a balra mutató, hogy a reverse szálon van az adott gén. [139]

A géntopológiák ismerete azért fontos, mert a hasonló génelrendeződésű rendszereknek valószínűleg volt közös ősök (nagyon kicsi az esélye, hogy több génből álló rendszerek egymástól függetlenül ugyanolyanná fejlődjenek pusztán véletlen mutációk által). A topológia vizsgálat ezért betekintést enged az egyes rendszerek evolúciójába, fejlődésébe, feltárhatja az egymást követő generációk során bekövetkező és továbböröklődő változásokat, és HGT révén lezajlókat is, amikor egy élettéren osztozó különböző fajú baktériumok közt adódik át jellemzően plazmid segítségével egy kommunikációs rendszer és válik képessé a kommunikációra a két faj. Másrészt következtetni lehet belőle a rendszer regulációjára is, hiszen például az egymással átfedő gének nem íródhatnak át egyszerre.

A hasonló szerkezetű jeleket egymás receptorai is érzékelhetik bizonyos mértékben, ez lehetővé teszi az egyes rendszerek közti „**áthallásokat**” és, hogy a baktériumok „megértsék a sajátjukéhoz hasonló nyelvjáráásokat” [136], [142], [143]. Egy sejt ezen kívül **több QS rendszert is tartalmazhat**, amelyek működhetnek egymással párhuzamosan (pl. a *Vibrio harveyi* AI-2, CAI-1, HAI-1 rendszerei), hierarchikus szerkezetben (pl. a *Pseudomonas aeruginosa* 2 AHL rendszere közül a LasIR szabályozza, gátolja a LhlIR működését) vagy

egymással versengve (pl. a *Streptococcus pyrogenes* Rgg3 receptora natagonistája az Rgg2 receptornak), lehetővé téve ezzel a sejtműködés több környezeti hatást is figyelembe vevő finomabb szabályozását [90]. A szintetikus biológia is érdeklődése is növekszik a quorum sensing, mint a sejtek közti hatékony kommunikációs mechanizmus iránt. Több fajt is tartalmazó mesterséges közösségek tervezésénél pedig a jelek specificitása és a különböző rendszerek közti áthallások pontos ismerete különösen fontos [144].

A fent leírtak alapján a kooperációs **mechanizmusok csoportosítási szempontjai szerint** a quorum sensing i) a sejtek számos funkcióját koordinálhatja, például befolyásolhatja a virulenciát, toxintermelést, kompetenciát, sejtmozgást, de ezek mindegyike a sejtek metabolizmusának megváltozását vonja maga után (többek között a közös javak termelésének növekedését). A *Pseudomonas aeruginosa* QS vezérelte rajzása során is a sejtek összehangoltan lépnek egy metabolikusan aktívabb állapotba, melyben több tápanyagot fogyasztanak, és például az új terület birtokba vételéhez szükséges anyagokat termelnek. ii) A kooperáció valamilyen jelmolekula környezetbe juttatásával és annak érzékelésével valósul meg. Ez a molekula lehet kis zsírdékony a sejtől ki és a sejtekbe be szabadon diffundáló vegyület, mint pl. a *P. aeruginosa* AHL-je, de aktív extracelluláris transzportot igénylő és a célsejt membránreceptoraihoz kötődő peptidlánc is, mint pl. a *Bacillus subtilis* ComX jele. iii) A koordináció célja pedig a valamilyen kollektív előnyhöz jutás, *P. aeruginosa* rajzása estén ez az új élettér birtokba vétele, a telep határainak kiterjesztése.

A quorum sensing **kutatás egyik fő mozzgatórugója** új stratégiák kifejlesztése a patogének elleni küzdelemben. Mint láttuk, számos bakteriális kórokozó használ quorum alapú koordinációt a hatékony fertőzés érdekében. Így már régen megfogalmazódott az ötlet, hogy ennek a koordinációnak a megzavarásával csökkenhet a fertőzőképesség és ez az antibiotikumok egy alternatívája vagy az antibiotikum rezisztens patogének esetén hatékony ellenszere lehet [145]. A quorum sensing gátlására több lehetőség is van: gátolhatjuk a jel termelődését, receptorhoz kötődését vagy erre alkalmas enzimekkel elősegíthetjük a bomlását (ez az úgynevezett quorum quenching) [146]–[151]. Ilyen beavatkozások nem ölik meg a sejteket, csak a kommunikációjukat és ezzel együtt a virulenciájukat blokkolják, így kisebb szelekciós nyomást jelentenek, és ezzel a rezisztencia kialakulása is lassabb lehet. A növényvédelemben [146] és az ipari biotechnológiában már vannak példák a quorum quenching sikeres alkalmazására, például a víztisztító berendezések szűrőit eltömítő biofilm képződését is gátolják így [152]. Orvosi szempontból az egyik potenciális célpont, ami ellen egy QS alapú kezelés hatékony lehetne, pont a cisztás fibrózisban szenvedő betegek tüdejének krónikus, antibiotikum rezisztens *P. aeruginosa* fertőzése. És bár léteznek sejt kultúrákban és állatmodellekben bizonyítottan hatékony AHL gátló molekulák [148], [149], ezek bevezetése a humán gyógyászatba még várat magára, a gyógyszerkutatás általános nehézségein túl azért, mert még mindig túl sok a megválaszolandó kérdés magát a quorum sensing mechanizmust és

alkotóelemeinek tulajdonságait, és specificitását illetően [99]. Ezért is fontos és időszerű a jelenség kutatása. Ha ezek megoldódnak, akkor valószínűleg találkozhatunk majd az antibiotikumos kezelések hatékony kiegészítéseként ilyen hatásmechanizmuson alapuló gyógymódokkal is.

2.1.3. Összefoglalás

Az ismertett mechanizmusok jól példázzák, hogy a hatékony együttműködéshez a résztvevőknek koordinálniuk kell viselkedésüket és ehhez kommunikációra van szükség. A mikrobák világában a kommunikáció leggyakrabban a környezetbe leadott és onnan felvett anyagok útján valósul meg. Ezen kommunikációs és kooperációs mechanizmusok (a baktériumok „nyelve”) feltérképezésével közelebb jutunk a komplex közösségek működésének megértéséhez, ami új távlatokat nyithat mind az egészségügyben, mind a biotechnológiában. A mikrobiális kommunikációba és kooperációba finoman és célzottan beavatkozva például az antibiotikumoknál specifikusabban, kevesebb mellékhatással így biztonságosabban küzdhetünk egyes patogének ellen vagy környezetvédelmi, élelmiszeripari feladatok ellátására alkalmas komplex mikrobiális közösségek fejleszthetők ki mérnöki pontossággal.

Munkám során számítógépes modellezés segítségével vizsgáltam a fent ismertett folyamatok egyes részleteit. Célom volt, hogy biológiai megfigyelésekből kiindulva szimulációim segítségével olyan paramétereket, jelenségeket azonosítsak, melyek potenciálisan fontosak lehetnek egy-egy viselkedés típus kialakulásában, segítve ezzel további *in vitro* vizsgálatok és alkalmazások tervezését.

2.2. Baktérium modellek

Mikrobiális közösségek, mint minden egyéb rendszer modelljének megalkotásakor is több szempontot kell figyelembe vennünk. Tudnunk kell, többek között, hogy milyen alaposan ismerjük a közösséget, milyen adatok, megfigyelések alapján készíthetjük el modellt. A számítási kapacitás szintén tisztázandó, mert például egy laptopon vagy egy számítógép klaszteren más részletességű szimulációk futtathatók. A legfontosabb azonban tisztában lennünk azzal, hogy a vizsgált rendszer mely részére vagyunk kíváncsiak. A modellben ugyanis ezt a részt, az erre ható folyamatokat kell a kívánt részletességgel kidolgozni, a többi folyamatot viszont lehetőség szerint le kell egyszerűsíteni, el kell hanyagolni. Így jutunk ugyanis olyan leíráshoz, ami a kívánt jelenséget valósághűen mutatja be, ugyanakkor a kapott eredmény háttérében álló folyamatok is azonosíthatóak, és a modell nem kezelhetetlenül komplex, nem fedik el felesleges részletek érdeklődésünk tárgyát. Például egy a sejtmozgást leíró modellben nincs szükség a sejtosztódás vagy teljes intracelluláris metabolikus hálózat implementálására, mert ezek egyrészt elfedhetik a vizsgált viselkedést, másrészt felesleges számítási igényt jelentenek. Ellenben ha bizonyos tápanyagok sejtben belüli hasznosulásával foglalkozunk, akkor a kapcsolódó metabolikus hálózatok minél pontosabb leírása a cél.

Maguk a mikrobiális közösségek is igen sokfélék, sokféle szempontból közelítenek hozzájuk, így minden modell máshová helyezi a hangsúlyait, más kérdések megválaszolására alkalmas. Ezeknek mind megvan a maguk előnye, hátránya és nem mindig könnyű kiválasztani, mikor melyiket érdemes használni. Maga a mikrobiom modellezés is számos tudományterület eszközkészleteiből merít, mint például molekuladinamika számítások, ökológiai populáció dinamika rendszerek, statisztikus fizika, a robotika vagy a mesterséges intelligencia.

A kutatócsoportunk által alkalmazott rendszer a modellek csoportosítására, kategorizálására külön-külön kezeli különböző részeit [153]. Csoportosítunk a baktériumok, a tér, a sejteket körülvevő közeg, a médium és a baktériumok viselkedése alapján. Ez utóbbi kategória jelenti a modell tartalmát, a fizikai, biológiai jelenséget, amit vizsgálunk. Az alábbiakban bemutatom az osztályozó rendszert néhány példával, majd ennek segítségével néhány napjainkban is használt modellt. Az általam fejlesztett és használt modelleket is ebbe sémába helyezve tárgyalom majd.

2.2.1. A baktériumok reprezentációja

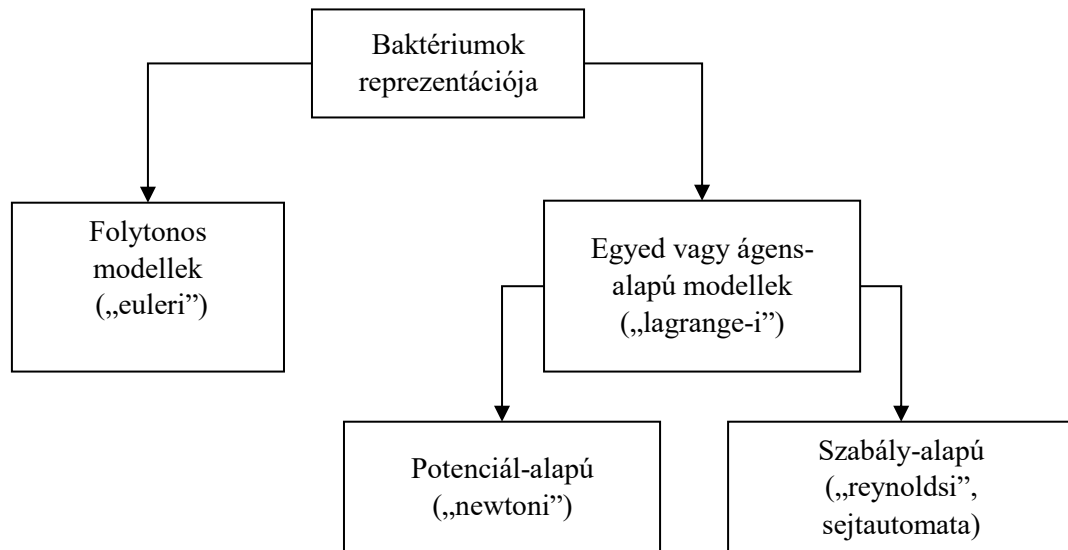
A mikrobiális modellek talán leglényegesebb tulajdonsága az, hogy a baktériumokat milyen matematikai eszközökkel írjuk le. A lehetséges leírások fő típusait az 2.13. ábra foglalja össze. Ha az egész közösséget egy egészként kívánjuk vagy tudjuk csak szemlélni, tehát makroszkópikus leírásban gondolkodunk, akkor a sejtek összességét egy masszaként, biokémiai reaktorként kezelhetjük. A populáció viselkedését ekkor **differentiálegyenletekkel** írhatjuk le. Például a metabolikus útvonalakra alkalmazhatóak reakció-diffúziós egyenletek, a telepnyövekedésre szigmoid összefüggések, különböző fajok versengésére pedig a Lotka-Volterra egyenletek. A K. Kawasaki és munkatársai által 1997-ben a *Bacillus subtilis* telepeinek növekedésére alkotott modell ennek a megközelítésnek egy klasszikus példája [4].

Ha részletesebb, mikroszintű leírás indokolt vagy lehetséges, akkor az egyes baktériumokat egyesével kell kezelnünk. Ez az úgynevezett **agens-alapú modellezés**. Az alkotó egységek ezekben a modellekben az ágensek. Ezekre nincs általánosan elfogadott definíció a szakirodalomban, annyit azonban mondhatunk róluk, hogy virtuális egységek, amelyeket adott szabályok alapján hozott döntések sorozata működtet. Minden ágens érzékeli a környezetét és belső állapotát, feldolgozza a nyert információt és belső szabályai alapján dönt, ezzel visszahatva a környezetére is. Ezt ismétli ciklikusan minden szimulációs lépésben [7]. A döntési mechanizmus és a szabályok a problémától függően tetszőleges bonyolultságúak lehetnek, az egységek rendelkezhetnek memóriával és az előre tervezés képességével is (ami a mesterséges intelligenciában is alkalmazott koncepció). A baktérium ágenseknek jellemzően van pozíciójuk (néha térbeli kiterjedésük is) és a modell természetétől függően lehetnek a mozgással (pl. irány, sebesség) vagy az anyagcserével (pl. energiaháztartás, anyagok felvétele, leadása, hasznosítása) összefüggő paramétereik is. A környezetbe leadott anyagok hathatnak más ágensekre is, így lehetővé válik az egyedek közti kommunikáció modellezése.

Az ágensek közti interakciókat leírhatjuk **potenciálfüggvények** („Newton módszer”) vagy viselkedési szabályok („Reynolds módszer”, sejtautomaták) segítségével. A potenciálfüggvények alkalmazásának ötlete a molekuladinamikából származik [6]. Eszerint kiszámoljuk az ágens párok közt fellépő „erőket”, ezeket összegezzük, és az eredőjük fogja megadni az ágens viselkedését a következő szimulációs lépésben. A sejtek egymáshoz viszonyított helyzete például leírható az atomok közt ható Van der Waals erőkhöz hasonlóan olyan potenciálfüggvényekkel, mint például a Lennard-Jones vagy a Weeks-Chandler-Anderson potenciál [6]. Ezekben egymástól kis távolságra erős taszító hatás érvényesül az egyedek közt (pl. a sejtek nem nőnek egymásra), míg az egymástól távoliak vonzzák egymást (pl. kemotaktikus jelekkel). A két régió közt van az optimális távolság az egyedek közt. A sejtek mellett más élőlénycsoportok, például a madárrajok is rendeződése is leírható ilyen függvényekkel [3].

A potenciálfüggvények páronkénti kiszámítása erőforrásigényes feladat, és nem is mindig szükséges. Az ágensek viselkedését egyszerű **szabályokkal** is leírhatjuk, mint azt például Craig Reynolds is tette 1978-ben [7]. Munkájában a madárrajok alakját és mozgását sikeresen definiálta három egyszerű szabály segítségével. Először az ágenseknek el kellett kerülniük az ütközést egymással és más tereptárgyakkal, majd össze kellett hangolniuk haladási irányukat és sebességüket, végül törekedniük kellett rá, hogy minél közelebb maradjanak egymáshoz (ne szakadjon szét a raj). Ez a szabály alapú, de térben folytonos mozgást lehetővé tevő megközelítés igen népszerű. Ezt alkalmazzák például kutatócsoportunk később bemutatott modelljei is az ágensek leírására.

Sejtautomatákról akkor beszélhetünk, ha a szabályok időben és térben is diszkrétén, egy rács struktúrán valósulnak meg. Az ágensek ilyenkor az egyes rácsponatokon vagy cellákban helyezkednek el és a megadott szabályok szerint frissítik lépésenként az állapotukat. Ez függhet a sejt előző állapotaitól (memória) és a környező sejtektől is. Jó példa erre a Conway életjátéka [12], amelyben egy üres cellán akkor születik sejt, ha pontosan három szomszédján van sejt, és akkor hal meg, ha kettőnél kevesebb vagy háromnál több szomszédos sejtet érzékel (tehát „elszigetelődés” és „túlnépesedés” esetén). Amennyiben a sejtautomaták rácsstruktúrája nem szabályos, hálózatos modellekről beszélhetünk. Itt a csomópontok az ágensek, az élek pedig a kapcsolatok köztük. Járványok terjedésének vizsgálatánál például gyakran használnak hálózatos modelleket (pl. SIR modellek).



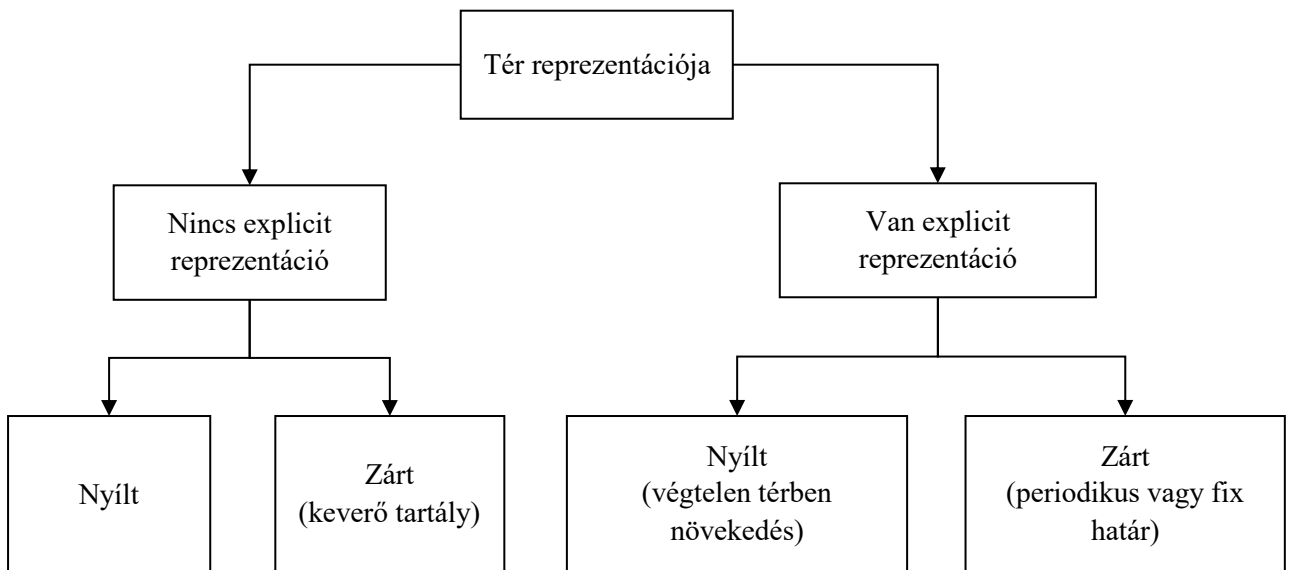
2.13. ábra: A baktériumok reprezentációja.

2.2.2. A tér reprezentációja

A tér reprezentációja határozza meg azt a fizikai közeget, amiben a sejteket modellezzük (2.14. ábra). A vizsgálandó kérdés jellegétől függően nem szükséges a fizikai teret mindig figyelembe venni. Az ipari biotechnológia, élelmiszeripar vagy szennyvízipar folyamatai sokszor nagyméretű, jól kevert fermentorokban zajlanak, ahol feltételezhető, hogy minden sejt azonos paraméterekkel (pl. tápanyagszinttel) rendelkező közegben helyezkedik el. Ekkor felesleges explicit módon megadni a sejtek helyzetét, elég a mennyiségükkel tisztában lenni. Egyéb esetekben, szilárd táptalajon például, ahol a kialakuló telep alakja vagy a szomszédos ágensek közti interakció a kérdés, vagy ahol a közeg inhomogén vagy strukturált (pl. a béltraktus belső felszíne), fontos a sejtek két vagy három dimenziós térbeli pozíciója, a teret explicit meg kell adni.

A tér mindkét esetben lehet nyílt és zárt is. A zárt tér mindig véges erőforráskészletet jelez, míg a nyílt a (szimuláció ideje alatt) korlátlan terjedés lehetőségét. Ha a tér nem definiált, akkor egy zárt modellben az erőforrás (pl. tápanyag) elfogy egy idő után, míg nyílt esetén állandó szinten marad, mintha a szimulációs téren kívülről diffundálna befelé folyamatosan, vagy mintha folyamatosan pótolnák a fermentorba.

Explicit tér reprezentáció esetén a nyílt tér végtelen benépesíthető környezetet feltételez. Szimulációk esetén ez természetesen csak úgy oldható meg, hogy a tér akkora méretű, hogy a számítás ideje alatt a növekvő telep nem érheti el a szélét. Egyébként a peremét kezelni kell valamilyen módon és ekkor már zárt térről beszélünk. A peremfeltétel is sokféle lehet. Petri csésze esetén a peremet egy szilárd falaként célszerű felfogni, amin túl egyszerűen nem lehet növekedni. Potenciálfüggvényeket alkalmazó modellekben a perem lehet egy erős taszító erő vagy differenciál egyenletek esetén egy sáv, ahol semmilyen áramlás, anyagterjedés sincs (zero flux). Ha azonban nem akarunk ilyen korlátozásokkal élni, a szimulált tér mégsem akkora, hogy lehetővé tegye a korlátlan növekedést, akkor használhatunk periodikus határfeltételt is. Ez azt jelenti, mintha a fizikai tér peremeit összekötnénk és az egyik oldalon kilépő ágens azonnal megjelenne az ellentétes oldalon. Egy dimenziós esetben ez egy szakasz körré zárásának felel meg. Két dimenzióban pedig egy toroid felületnek (gyűrűvé zárt cső). Ebben az elrendezésben nem kell a határok hatásaival számolnunk, mint a többi peremfeltétel esetén, ugyanakkor mégis zárt a tér, mert az egyik oldalon kilépő és a másikon belépő ágensek és anyagok nem új, érintetlen helyre érkeznek, hanem olyanra, aminek már „története van”, ami már megváltoztatott a kiindulási állapothoz képest.



2.14. ábra: A tér reprezentációja.

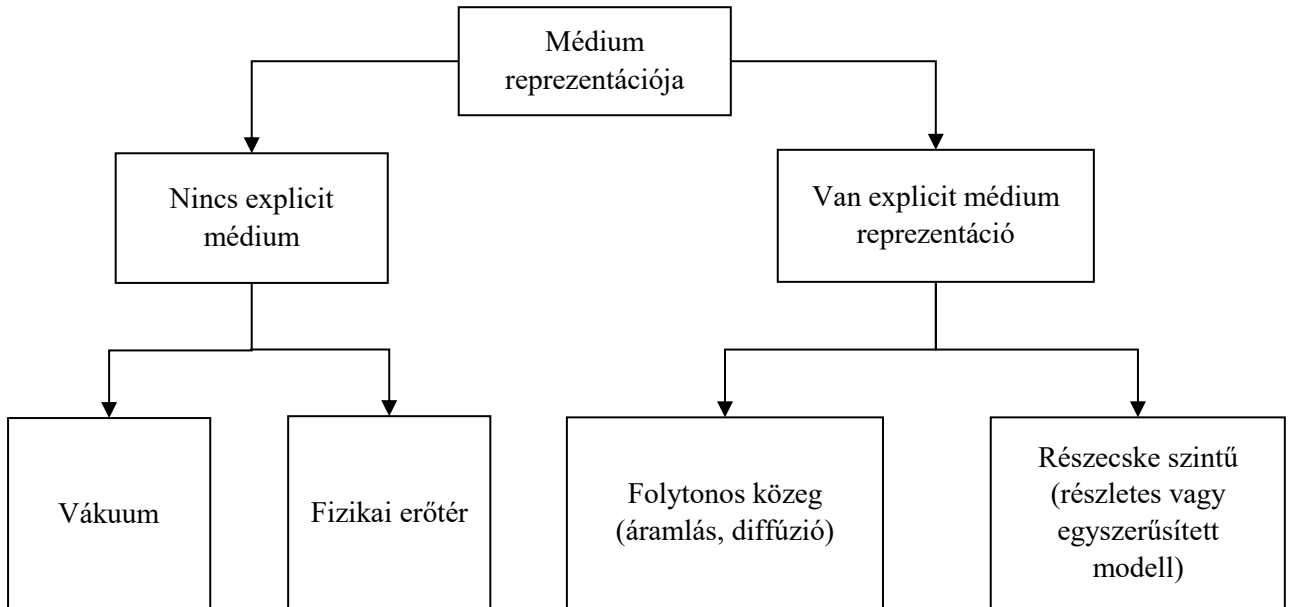
2.2.3. A médium reprezentációja

A médium itt a modell baktériumokon kívüli részének összefoglaló neve, szintén többféleképpen írható le (2.15. ábra). Ez akár teljesen el is hanyagolható, vákuumnak is tekinthető (mint sok molekuladinamikai számítás esetén), ha a vizsgált probléma szempontjából nem fontos a sejtek környezete, hogy milyen közegben vannak. A korábban említett Reynolds modell sem adja meg explicit módon a közeget csak a madarakra ható erőket írja le, az elkerülendő tárgyakat például taszító potenciálokkal [7].

Ha konkrétan szükséges megadni a közeg egyes elemeit, akkor ezek lehetnek például tömeggel, pozícióval, különböző kémiai tulajdonságokkal rendelkező részecskék vagy folytonosan áramló, diffundáló differenciálegyenletekkel leírható anyagok, mint a tápanyag, vagy a quorum sensing jelek. A részecskék esetén akár atomszintű leírás is lehetséges, például sejtfelszíni kötődést vagy szignáltranszdukciós hálózatokat részleteikben vizsgáló modellek esetén. Ez azonban rendkívül számításigényessé teszi a szimulációkat nagyszámú ágens esetén, ezért a soksejtes, populáció léptékű folyamatok leírásánál a közeg anyagait legtöbbször folytonos (a számítógépes szimulációk során ezt természetesen diszkretizálni kell) gradiensekként kezelik.

Hibrid modelleknek azokat a modelleket nevezzük, ahol többféle megközelítést alkalmaznak a rendszer különböző részeinek leírására. Jellemzően a sejteket ágensekkel a tápanyagokat és a sejtek által termelt egyéb komponenseket, a médiumot reakció-diffúziós egyenletekkel kezelik. Ilyen például Philip Gerlee modellje [154], amiben a sejtek rácspontokon helyezkednek el, osztódhatnak, elpusztulhatnak és fogyasztják a köztük diffundáló tápanyagot.

A modell a tisztán reakció-diffúziós egyenleten alapuló Kawasaki modellhez hasonló fraktál- vagy hópehelyszerű mintázatokat produkál. Az Eshel Ben-Jacob alkotta a „communicating walkers” modell [155] szintén Petri csészében növekvő baktériumtelepeket ír le diszkrét mozgó sejtekkel és a köztük diffundáló tápanyaggal, de itt már kommunikációs jelek is vannak az ágensek közt. Ehhez hasonlít csoportunk quorum sensing modellje is.



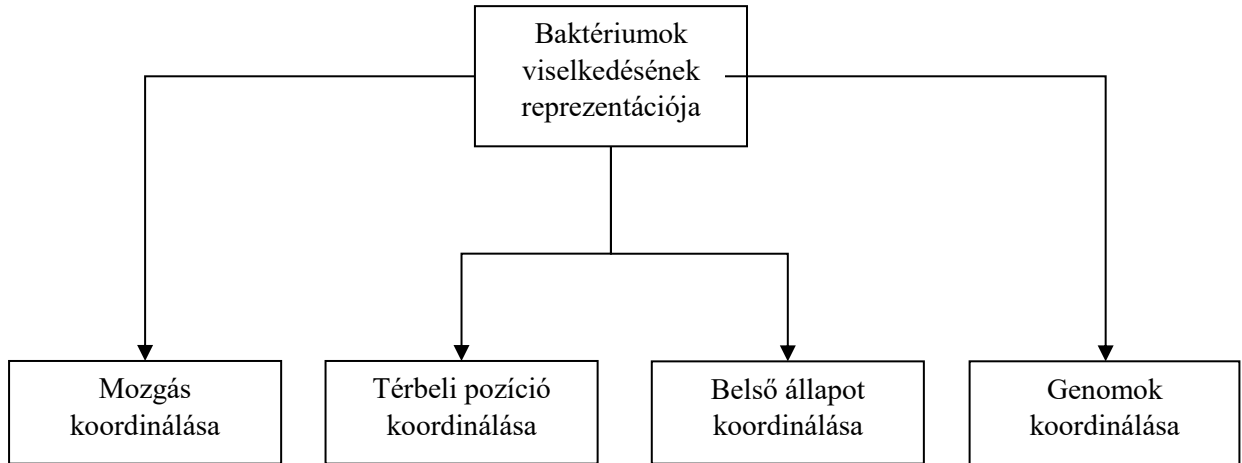
2.15. ábra: A médium reprezentációja.

2.2.4. A baktériumok viselkedésének reprezentációja

Ez a modell tényleges tartalma, ez adja meg, hogyan viselkednek a sejtek a rendszerben. A jelen csoportosítás szerint az alábbi szinteken hathatnak egymásra direkt kölcsönhatásaik és a környezetük alakítása segítségével (2.16. ábra). A közösség tagjai a koordináció során összehangolják egyéni viselkedésüket hatékony populációsintű viselkedésminták elérése érdekében az élő és az élettelen környezetükből szerzett információk segítségével [29]. A kollektív viselkedésformákat leíró modellekben hagyományosan az ágensek térbeli pozíciójukat és mozgásuk irányát illesztik, a közösségsintű viselkedés itt tehát az együttmozgással, egy irányba terjedéssel kapcsolatos [7], [29]. Ismert példák erre a madár és hal rajok mozgása, a zebracsorda vonulása, de az embercsoportok menekülése is vészhelyzet esetén [156], [157]. A koordináció fogalma viszont kiterjeszhető az egyedek belső állapotára, metabolizmusára, és a genetikai állományára is.

Csoportunk quorum sensing modelljében például a sejtek érzékelik a többi sejt által termelt jelanyagokat és ezek mennyiségének függvényében módosítják viselkedésüket. Az egymáshoz közeli sejtek hasonló kémiai környezetben vannak, így körülbelül egyszerre váltanak állapotot (pl. kezdenek bizonyos anyagok termelésébe, fogyasztanak több tápanyagot,

mozognak gyorsabban), hangolják össze az anyagcseréjüket. Genetikai szintű, tehát a metabolikus állapottal szemben öröklődő szinkronizáció gének felvétele vagy elvesztése útján valósulhat meg. A gének áramlása megadható diffúziós folyamatként a közösségben, ezt a módszert alkalmazzák például gének terjedésére növénypopulációkban, vagy ágens alapon, amikor a sejtek csak a szomszédjaikkal állnak kapcsolatban. Horizontális géntranszfer modellünk is genomszintű koordinációt ír le, antimikrobiális faktor rezisztencia gének elterjedését egy mikrobiomon belül.



2.16. ábra: A baktériumok viselkedésének reprezentációja.

2.2.5. Modellek osztályozása

A 2.3. táblázatban az előzőekben említett klasszikus modellek után néhány korszerű, napjainkban is használt, baktériális közösségek ágens-alapú leírására alkalmas szimulációs rendszert is jellemzek a fent tárgyalt szempontok alapján.

2.3. táblázat: Néhány mikrobiális közösségek ágens-alapú modellezésére szolgáló programcsomag rövid jellemzése.

Modell	Baktérium	Tér	Médium	Viselkedés	Forrás
Chaste	Ágens-alapú: potenciálok, viselkedési szabályok	Explicit: zárt, különböző geometriák	A sejtek geometriája a meghatározó, de lehetséges diffúzió	Pozíció és belső állapot koordinálása is lehetséges	[158], [159]
Gro	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: nyílt vagy zárt tér is megadható	Explicit: folytonos közeg, diffúzió	Mozgás, pozíció, belső állapot koordinálása is lehetséges	[160]–[162]
Delft biofilm modell	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: félig zárt	Explicit: folytonos közeg, diffúzió	Pozíció, belső állapot koordinálása	[5], [163]
BacSim, iDynoMiCS	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: félig zárt	Explicit: folytonos közeg, diffúzió	Pozíció, belső állapot koordinálása	[164], [165]
BSim	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: 3D-s, nyílt vagy zárt tér is megadható	Explicit: folytonos és részecske alapú is lehet	Belső állapot koordinálása	[166]
Cellmodeller	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: nyílt vagy zárt tér különböző geometriákkal	Explicit: folytonos közeg, diffúzió	Pozíció, belső állapot koordinálása	[167], [168]
QS modell	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: zárt, 2D-s toroid felület	Explicit: folytonos közeg, diffúzió	Belső állapot koordinálása	[16]
HGT modell	Ágens-alapú: viselkedési szabályok	Explicit: zárt, „2D-s Petri csésze”	Nincs explicit megadva: vákuum	Gemom szintű koordináció	[J1]

A Chaste (Cancer, Heart and Soft Tissue Environment) rendszert a University of Oxford Computational Biology csoportja készítette. A szív és a tumor szövetek modellezése mellett alkalmas sejtközösségek viselkedésének szimulálására is. Nagyrészt C++ nyelven íródott, moduláris felépítésű programcsomag, mely a sejtek geometriájára helyezi a hangsúlyt, ugyanakkor diffúzió és különböző sejt állapotok, így a quorum sensing is megvalósítható benne.

A Gro egy főként szintetikus biológusok számára kifejlesztett egyszerűen használható programozási környezet (Klavins Lab, University of Washington). E.coli és élesztő sejtek találhatóak benne és kifejezetten sejt-sejt kommunikáció valamint kolónia formálódás modellezésére szolgál.

Dr. Cristian Picioreanu és Dr. Joao B. Xavier (TU Delft) egy Java alapú modellt készítettek a biofilm képződésben és növekedésben szerepet játszó folyamatok megismerésére. A modell képes egy, két vagy három dimenziós biofilmek szimulálására, és több fajt is képes kezelni. A közösségben diffundáló anyagok szerepe is vizsgálható, a sejtek mozgása viszont korlátozott. A közösség jellemzően helyhez kötött sejteket tartalmaz, melyek a szimulációs tér fix alapjához kapcsolódó biofilm részei, így a telep a sejtek osztódása révén növekszik.

Kapcsolódnak ehhez a modellhez a Kreft Lab (University of Birmingham) nevéhez fűződő BacSim és ennek továbbfejlesztése az iDynaMiCS (individual-based Dynamics of Microbial Communities Simulator). Ezek Java alapú modellek, kimeneteik analizálhatóak R-ben vagy Matlab segítségével. A P.aeruginosa quorum sensing jelensége leírható bennük és mobilis genetikai elemek (pl. plazmidok) kezelésére is képesek.

A University of Bristol nevéhez köthető BSim modell szintén Java alapú, és benne a sejtek egy alakítható 3 dimenziós térben Brown-mozgással mozognak. Termelhetnek anyagokat is, melyek terjedése diffúzióval koncentráció gradiensekként és Brown-mozgással részecskéként is lehetséges. Az ágensek metabolikus állapota változtatható és a három dimenziós tér is megszorítható egy síkra, így ez a rendszer potenciálisan alkalmas quorum sensing jelenségek modellezésére.

A Cellmodeller (Haselloff Lab, University of Cambridge) egy Python alapú keretrendszer melyet eredetileg szintetikus biológusok számára fejlesztettek növényi szövetek fejlődésének modellezéséhez. A sejtek geometriája és különböző biofizikai megfontolások fontos szerepet játszanak a modellben, de sejt szignalizáció is definiálható benne, és a quorum sensing is megvalósítható. A számítások gyorsítása érdekében OpenCL segítségével nagymértékben támaszkodik GPU-s párhuzamosításra, ami viszont nehézkessé teszi a használatát.

A QS modell és a HGT modell kutatócsoportunk fejlesztései, ezekről a további fejezetekben írok bővebben.

3. Módszerek

Mikrobiális közösségek különböző koordinációs stratégiáit **ágens-alapú számítógépes modellek** segítségével vizsgáltam. Ez a megközelítés azért praktikus, mert így a vizsgálni kívánt egységek, a baktériumok tulajdonságai, képességei, mint például az osztódási gyakoriság, a HGT hatékonysága vagy a QS válaszküszöbök egyedenként definiálhatóak. Ha differenciálegyenletekkel íránk le a rendszert, akkor a megalkotott egyenletek paraméterei, például a biomassa változásának üteme, a csoportok közti pozitív és negatív interakciók mértéke nehezebben lennének megfeleltethetők az egyedi sejtműködésnek. Ha számba vesszük a baktériumok vizsgált jelenség szempontjából releváns tulajdonságait, működési folyamatait, akkor ezeket viselkedési szabályokként viszonylag közvetlen módon programozhatjuk be az ágensekbe.

Mikrobiális közösségek modellezésénél jellemzően sok, de általában egyszerű ágenssel van dolgunk, amelyek működése legalább részben párhuzamosítható. Az általam használt és fejlesztett minkét modell implementációja **Matlab** programozási nyelven íródott. Ez egy a tudományos számítások és a modellezés területén széles körben elterjedt eszköz, számos beépített funkcióval, programcsomaggal, és változatos vizualizációs eszközökkel, ami kifejezetten támogatja a mátrixokkal végzett műveleteket, a problémák ilyen formába alakítását (az úgynevezett vektorizálását). Az egyszerű, sok elemre párhuzamosan alkalmazható utasítások jól vektorizálhatóak (rendezhetők mátrixokba), ezért alkalmas a Matlab ágens-alapú baktérium modellek kezelésére. A számítások hatékony formába rendezése és a modellek lehető legkisebb komplexitása miatt szimulációim egyszerű asztali számítógépen elvégezhetőek voltak, nem volt szükség speciális számítógépes infrastruktúrára. (Munkám során a Matlab R2011a és R2017b verzióival dolgoztam.)

Két különböző biológiai folyamatot leíró ágens-alapú modellel foglalkoztam. Az első a horizontális géntranszfer és a sejtek által termelt antimikrobiális faktorok szerepét vizsgálja stabil, diverz mikrobiális közösségek kialakulásában és működésében. A modellt Dr. Kertész-Farkas Attilával (ICGEB, Trieszt) közösen fejlesztettem majd elvégeztem a következő fejezetben bemutatott méréseket és a kiértékelésükhöz szükséges Matlab kódokat.

Az előzőekben ismertetett osztályozási rendszer alapján a **HGT modell** a baktériumok reprezentációja szerint Lagrange-i, szabály alapú, a sejteket ágensekként ábrázoljuk benne. Az ágenseknek pontszerűek, de vannak koordinátáik, tehát maga a tér leírása explicit. Ez egy Petri csészének feleltethető meg, két dimenziós, zárt, kör alakú terület fix határral, amin az ágensek nem hatolhatnak át. A médiumot itt nem volt szükséges explicit megadni, mivel ez egy minimális modell, ami nem az ágensek mozgására, vagy táplálkozására helyezi a hangsúlyt, csak a fizikai közelségük a mérvadó a köztük létrejövő kölcsönhatások szempontjából. Ezek a

kölcsönhatások pedig a HGT-rel és az antimikrobiális faktorokkal kapcsolatosak, mivel a vizsgált viselkedés a bakteriális genomok koordinációja. A modellről részletesebben a következő fejezetben írok.

A másik általam használt modell (**QS modell**) a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing vezérelte rajzását írja le egyszerűsített formában. Ennek alapja Sergiu Netotea 2009-ben publikált Java nyelvű programja, ami különböző típusú sejtek rajzási képességeit vizsgálta [16], [17], [169]. Bihary Dóra (PPKE ITK, Budapest) és Kerényi Ádám (SzBK, Szeged) ezt ültették át Matlab nyelvre és tették alkalmassá több fajból álló közösségek modellezésére [170], [18], [171]. Én ebben végeztem méréseket a QS küszöbök változtatásával megvalósuló „önmérséklet” hatásairól; definiáltam újfajta, csökkent kommunikációs, és kooperációs képességű sejteket és vezettem be az antibiotikum termelés lehetőségét a modellbe.

A csoportosítási rendszerünk szerint ez a modell is Lagrange-i, a baktériumok benne ágensek a HGT modellhez hasonlóan. A szimulációs tér egyik oldalán fix peremmel zárt, a vele szembeni oldalon végtelenített, a másik két oldalon pedig periodikus határral összekapcsolt, így egy irányban végtelenített csőként fogható fel. Ez a struktúra alkalmas egy baktériumtelep egy nyúlványának leírására. A modell folytonos közeget használ, ebben diffúzióval terjed és bomlik a tápanyag, a jelek és a faktorok, amiket az ágensek termelnek, bocsátanak ki és vesznek fel a közegből. A diffundáló anyagokat tehát reakciós-diffúziós differenciálegyenleteken keresztül kezeli a modell, míg a baktériumokat egyedi ágensekként. Ez egy elterjedt megközelítés, ami a különböző méret- és időskálán mozgó elemek (pl. molekulák és sejtek) leírására más-más módszert használ, hogy a modell pontosságának megőrzése mellett a számítások komplexitása se növekedjen meg szükségtelenül. Például a jel molekulák egyedi ágensekként kezelése nagyon nagy számításigényű lenne, és mivel egységes diffundáló „masszaként” is valószerűen leírható a viselkedésük, célszerű az utóbbi módszert alkalmazni. A baktériumok egyedi viselkedése, viselkedési szabályai viszont fontosak vizsgálataink szempontjából, ezért őket szükséges egyedenként kezelni. Az ilyen, többféle modellezési paradigmát, szintet is magában foglaló rendszereket nevezik hibrid modelleknek is. A QS modellben a sejtek anyagokat termelnek, juttatnak a médiumba, ahol azok diffundálnak, a sejtek felveszik őket és mennyiségük alapján alakul az ágensek belső állapota. Különböző metabolikus állapotokba léphetnek, ezekben különböző az energia felhasználásuk, anyagtermelésük, mozgásuk, osztódási frekvenciájuk. Az adott sejt metabolikus állapota nem öröklődik, hanem az aktuális környezeti viszonyok függvénye. Az együttélő (azonos belső szabályokkal rendelkező) sejtek viszont hasonló környezeti feltételek közt léteznek: azonos mennyiségű és minőségű anyagot vesznek fel, amelyekre azonosan reagálnak, így a belső állapotuk koordinálódik. A modellről és a fejlesztésekről részletesebben az 5. fejezetben lesz szó.

4. Eredmények I: Genom szintű koordináció a horizontális géntranszfer modellben

A mikrobiomok, mint például a bélflóra sok, ugyanazon az élettéren osztozó és részben ugyanazt a táplálékot fogyasztó baktériumfaj jellegzetes összetételű együttese. A mikrobiom tagjai veszélytelenek egymásra, kívülről érkező más sejtek azonban nehezen telepednek meg a közösségben. Jellemző továbbá, hogy a diverz, sok fajt tartalmazó közösségek életképesebbek, ellenállóbbak az egy vagy csak néhány fajt tartalmazóknál, mivel alkalmazkodóképesebbek, szélesebb a metabolikus repertoárjuk.

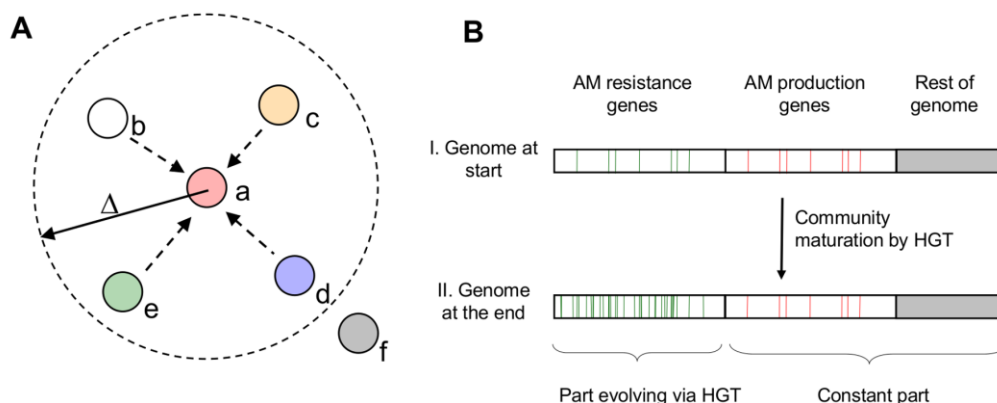
A legtöbb sejt természetes körülmények között számos, más sejtekre káros anyagot termel és ürít a környezetébe, ezek az úgynevezett antimikrobiális faktorok (AM). Saját faktoraira minden sejt rezisztens és ezzel a rezisztenciával a vele tartósan együttélni kívánó sejteknek is rendelkezniük kell. Ilyen rezisztenciák kialakulása véletlen mutációk és természetes szelekció útján igen lassú folyamat, a működő rezisztencia gének nem-utód sejteknek történő átadása, a horizontális géntranszfer (HGT) viszont gyors megoldást kínál erre a problémára. A HGT elterjedt a bakteriális világban, és a rezisztencia gének gyakran vándorolnak egyik egyedtől a másikba plazmidok (cirkuláris DNS darabok) közvetítésével.

A következőkben bemutatom a Dr. Kertész-Farkas Attilával közösen fejlesztett HGT modellünket (4.1.), az ezzel kapott eredményeimet a diverz mikrobiális közösségek kialakulásával (4.2.) és külső, belső kihívásokkal szembeni viselkedésükkel kapcsolatban (4.3.).

4.1. HGT modell

A modellben a baktériumokat leíró **ágensek** genomjainak változását követhetjük nyomon. A szimulált genom három részre oszlik: 1) a rezisztencia génekre; 2) az AM termelő génekre; 3) a genom többi részére (4.1.B ábra). Ez utóbbival jelen esetben nem dolgozik a szimulációs rendszer. A baktériumokat leíró ágensek kezdetben adott számú véletlenszerűen kiválasztott AM és a hozzá tartozó rezisztencia génpárral rendelkeznek (arra rezisztensek, amit maguk is termelnek). Ha a környezetükben adott küszöbértéknél több a számukra ismeretlen AM (olyan faktor, amire nem rezisztensek), akkor elpusztulnak, egyéb esetben felvesznek egy rezisztencia gént a közelükből (4.1.A ábra). Ennek eredményeként a genom rezisztenciáért felelős rész növekszik és egy idő után már nem lesz ismeretlen, számukra veszélyes faktor a közelükben, nem pusztulnak el emiatt sejtek. Ezt tekintjük összeszokott állapotnak, amikor a közösség tagjai már nem jelentenek veszélyt egymásra. A modell az AM termelést nem tekinti

átadhatónak, mivel azt sok esetben több gén által befolyásolt komplex anyagcsere utak szabályozzák, és bár az egész gén kaszkád transzfere egy megfelelő plazmidon nem lehetetlen, de a rezisztenciáké jóval gyakoribb. A rezisztenciáért ugyanis általában egy (néhány) gén felelős, ami például a káros anyagot kijuttató efflux pumpát, vagy a faktort sejten belül lebontó enzimet kódolja. Ezek a gének sokszor eleve a plazmidokon helyezkednek el, így könnyen vehetnek részt HGT-ben.



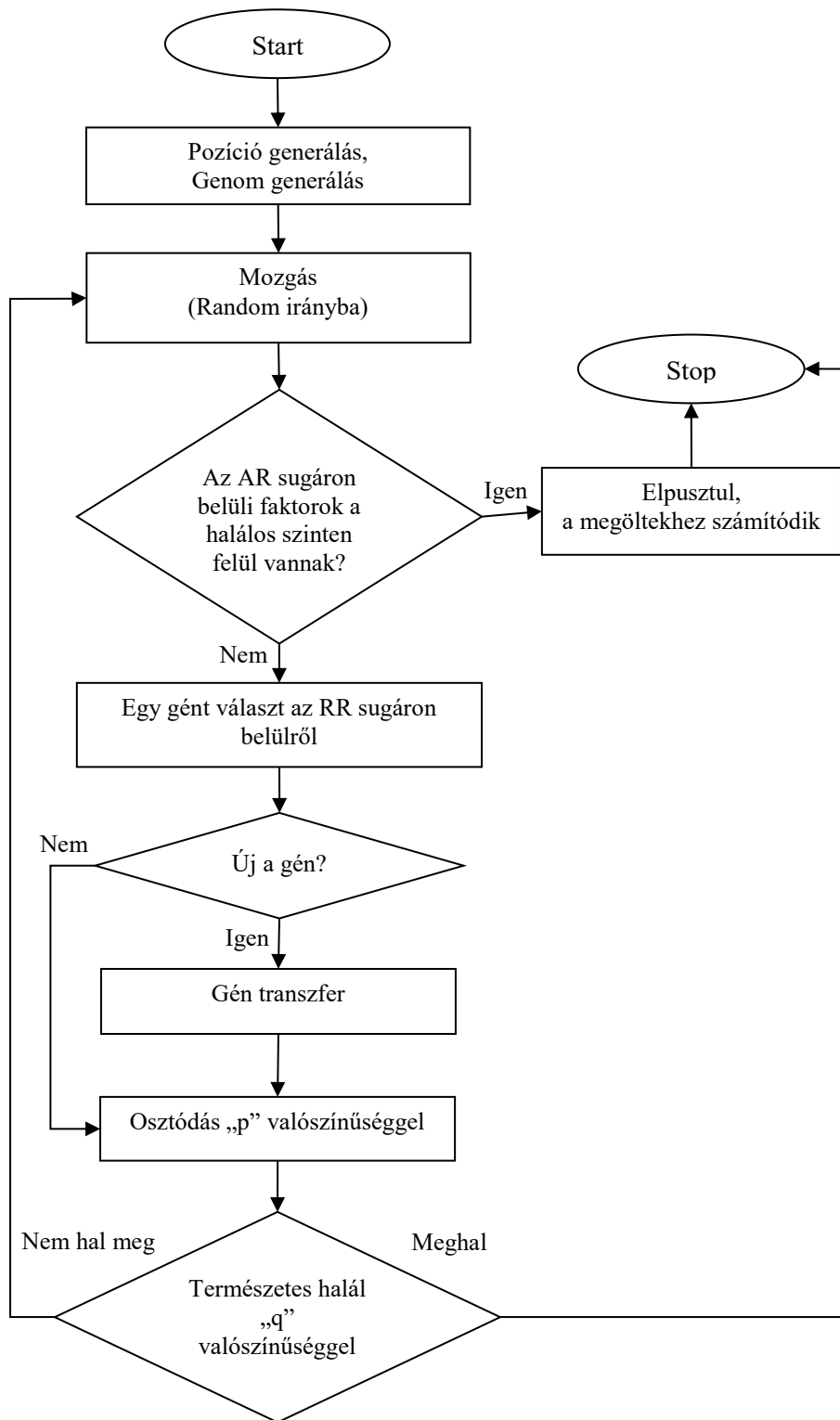
4.1. ábra: A HGT kapcsolat alapú modellje. A: Az „a” ágens a Δ sugáron belüli baktériumokkal áll kapcsolatban („b,c,d,e”), az ezen kívüliek („f”) nem befolyásolják közvetlenül a működését. Ha a sugáron belüli sejtek többféle AM-t termelnek, mint amekkora a sejt toleranciája (nem-specifikus rezisztencia), akkor a sejt elpusztul. Ha életben maradt a baktérium, akkor pedig a környezetétől vesz át rezisztencia gént, majd pedig random irányba mozog. Ez ismétlődik minden iterációban. B: Számos lépés után az ágensek felvesznek minden rezisztencia gént, ami jelen van a közösségben, tehát feldúsul genomjuknak ez a része (zöld vonalak), míg az AM termelésért (piros vonalak) és az egyéb funkciókért felelős részek (szürke régió) változatlanok maradnak.

A sejtek ezen kívül képesek még véletlenszerű mozgásra, hogy ne legyen statikus a rendszer, valamint random osztódásra és halálzásra, amelyek szintén a dinamikát segítik elő, de ilyen leegyszerűsített formában még nem vonják el a hangsúlyt a HGT-ről. Ez ugyanis egy minimális modell, amelyben csak a vizsgált jelenség szempontjából fontos paraméterek hangsúlyosak. Az ágensek pontszerűek (nincs fizikai kiterjedésük), anyagcseréjük sincs, nem fogyasztanak táplálékot sem.

Az **ágensek életciklusát** a 4.2. ábra, a paraméterek alapértelmezett értékeit pedig a 4.1. táblázat foglalja össze (a program felülete pedig a F.1. ábrán látható). A továbbiakban vizsgált paraméterekről és a modell működéséről részletesebben:

- Kezdetben minden, a baktériumokat reprezentáló ágens kap egy adott, 200 elemet tartalmazó készletből véletlenszerűen kiválasztva bizonyos számú (NG) antimikrobiális faktort és az ezekhez tartozó rezisztencia géneket, kezdetben csak ezekkel rendelkeznek, így minden sejt különbözőnek tekinthető a faktor profilja alapján.

- Az ágensek ezután minden lépésben random irányba tesznek egy adott hosszú (RM) lépést egy virtuális, zárt, kör alakú területen („Petri csésze”).
- Majd érzékelik, hogy az adott sugarú környezetükben (AR) hányféle különböző faktor található, melyekre nem rezisztensek.
- Ha ez magasabb egy értéknél (nem-specifikus rezisztencia: D), az azt jelenti, hogy a sejt nem képes megbirkózni a környezetéből érkező káros, idegen anyagokkal (pl. kipumpálni magából, vagy lebontani), és elpusztul: ez a baktériumok közti, versengés szimulálása.
- Ha nem pusztult el, akkor adott sugarú környezetéből (RR) választ egy rezisztencia gént, és ha még nem rendelkezik vele, átveszi: ez a horizontális géntranszfer szimulálása.
- A géntranszfer gyakoriságát (TRN) is módosíthatjuk, megadva hogy 1 lépésben sejtenként hány transzfer történjen (pl.: 1, 2, 3) vagy, hogy hány lépésenként legyen transzfer (pl.: 1/3 azt jelenti, hogy 3 lépésenként történik 1 HGT minden sejtben).
- Meghatározott lépésenként az ágensek bizonyos hányada osztódik (a két utódsejt tulajdonságai azonosak, azonos döntési fa érvényes rájuk), és meg is hal (ezek a sejtek nyomtalanul eltűnnek, nem számítódnak a versengés során elpusztultakhoz). Az élettér véges eltartó képességét maximális sejtszám megadásával jelezzük, az aktuálisan osztódó és a természetes úton elhaló sejtek számát ez alapján egy telítési görbe szerint határozzuk meg.
- A szimuláció akkor fejeződik be, ha a sejtek összeszoktak. Ezt úgy definiáljuk, hogy átlagosan már rendelkeznek a kolóniában jelenlévő rezisztencia gének 95%-ával (ez az ún. rezisztencia hányados) vagy már nem pusztították egymást az AM-okkal legalább 50 lépés óta. 5000 lépésnél mindenképp vége a kísérletnek. Az végső összeszokott közösséget nevezzük „érett” populációnak.



4.2. ábra: Az ágensek életciklusa a HGT modellben.

4.1. táblázat: A HGT modell alapértelmezett paramétereit.

Paraméter	Jelentése	Alap értéke
Inicializációs paraméterek		
Baktérium szám	A kezdetben random generált sejtek száma	50 db
AM szám	Antimikrobiális faktorok száma	200 db
Rezisztencia szám	Rezisztencia gének száma	200 db
Gén szám/sejt (NG)	Kezdetben random a sejteknek kiosztott faktor-rezisztencia génpárok száma	10 db
Csésze sugár	A virtuális Petri csésze sugara	200 egység
Terminálás	Feltétel, amely teljesülésekor a szimuláció leáll	<ul style="list-style-type: none"> • a jelenlévő rezisztencia gének 95%-a szétterjedt; • nem volt ölés 50 lépés óta • 5000 lépés elérése
HGT és mozgási paraméterek		
Nem-specifikus rezisztencia (D)	Az idegen AM szám, amit a sejt még el tud viselni	10 db
AR	Az a sugár, amin belül a sejt érzi a környező AM-okat	20 egység
RR	Az a sugár, amin belülről a sejt rezisztencia géneket tud átvenni	20 egység
TRN	A HGT-ek száma lépésenként minden egyedben	1 db
RM	A random irányba tett lépés hossza	5 egység
Populáció méretével összefüggő paraméterek		
N_{max}	Maximális populáció méret (sejtszám)	400 db
Osztódási ráta (p)	A populáció ekkora hányada osztódik	0,1 10%
Osztódási frekvencia	Ennyi lépésenként történik osztódás	10 iterációnként
Halálozási ráta (q)	A populáció ekkora hányada hal meg.	0,1 10%
Halálozási frekvencia	Ennyi lépésenként történik természetes halálozás	40 iterációnként

4.2. Rezisztencia gének transzfere a HGT modellben

Ebben az alfejezetben bemutatott szimulációimmal azt vizsgáltam, hogy véletlenszerű antimikrobiális faktor összetételű közösségek életében milyen szerepe lehet a horizontális géntranszfernek. Illetve, hogy a HGT milyen paramétereit a meghatározóak a géntranszfer sikeressége és a közösség összeszokása szempontjából.

Az érett közösségek kvantitatív jellemzésére az alábbi tulajdonságokat használtam:

i) a kolóniában megtalálható rezisztencia gének száma: megmutatja, milyen hatékonyan tud védekezni a közösség külső támadókkal (pl. patogénekkal) szemben, és hogy a jelenlévő gének mennyire elterjedtek (rezisztencia hányados): ez mutatja az összeszokás mértékét

ii) a kolóniában jelen lévő antimikrobiális faktorok száma: jelzi a közösség támadó erejét egy külső betolakodóval szemben

iii) klonalitás, sejtvonalak száma: megmutatja, hány sejt utódai alkotják a közösséget, ez a kolónia metabolikus (AM termelésen és rezisztencián túli) diverzitására, erejére enged

következtetni, mert a különböző fajta sejtek, különböző feladatokat képesek ellátni egy mikrobiomban.

4.2.1. Random kezdeti populációkból kialakuló közösségek típusai

A véletlenszerű kiindulási AM-rezisztencia génpárokkal rendelkező közösségek (melyekben a különböző AM profilú sejteket különböző fajúnak tekintetem) fejlődése során két kvalitatívan markánsan elkülönülő kimenet típust figyeltem meg. A szimuláció végén a közösség vagy egy sejt utódaiból állt, tehát monoklonális lett, vagy több sejtvonalat tartalmazott, poliklonális maradt. A kimenetek szempontjából leginkább meghatározó jelenségek a szimulációk során a HGT hatékony működésének és a sejtek egymással való versengésének (sejthalál AM-ok hatására) megléte vagy hiánya voltak. Ezek alapján a 4.2. táblázatban feltüntettem az említett három kvalitatív szempont összes lehetséges kombinációját és megvizsgáltam, mely esetek megvalósíthatóak a modellel és, hogy az egyes esetekben hogyan fejlődik a szimulált mikrobiális közösség.

A lehetséges releváns (ha történik változás a kezdeti állapothoz képest, vagy nem hal ki minden sejt) esetek közül poliklonális és monoklonális kimenet is többféleképpen valósulhat meg. A „Monoklonális I.” esetben a szimuláció kezdetén az AM-ok miatt a sejtek elpusztítják egymást csak egy sejt marad (véletlenszerűen), és ő szaporodik el az üres élettéren. Utódai mind azonosak, tehát nincs köztük versengés, de HGT-vel sem tudnak új géneket átvenni. A „Monoklonális II.” esetben a szimuláció kezdetén lezajló AM indukálta sejtpusztulást túlélő néhány sejt egymástól távol növekedni kezd, telepeket alkot, de ezen telepek tagjai közt nem alakul ki HGT, csak versengés, ami az egyik faj (sejttípus) elterjedésével és a többi kihalásával végződik. Ez az eset versengő fajok tipikus esete. Az „oligoklonális” közösséget nem egy (mint a „Monoklonális I.” esetben), hanem néhány igen hasonló AM profilú sejt alkotja, amelyek a közösség kialakulásának kezdeti fázisát túlélve képesek együtt élni és HGT segítségével összehangolni a néhány különböző rezisztenciájukat. Ez az eset hasonló (rokon) fajok együttélési képességét szemlélteti. Végül a „Normál, diverz” kimenet mutatja azt a poliklonális populációt, aminek a fejlődésében a HGT és az AM-ok révén megvalósuló sejtpusztulás is szerepet játszott. Ez a kívánt kimenet, ami egy HGT segítségével összeszokott közösséget mutat. A továbbiakban ezzel illetve a monoklonális esettel foglalkozom részletesebben.

4.2. táblázat: Az elméletileg lehetséges kolónia típusok a végső közösség klonalitása, a géntranszfer lehetősége és az AM okozta sejthalál szempontjából. A fehér háttérű esetek nem reálisak a modellben, a pirosak eredményezik a monoklonális, a kékek pedig a diverz közösségeket (a lilával jelzett esetben a kezdeti közösség marad meg). A táblázat jobb oldali oszlopában rövid magyarázat található az egyes esetekhez.

Végső kolónia típusa	Végső metagenom	Géntranszfer a szimuláció folyamán	AM okozta sejtpusztulás a szimuláció folyamán*	Megjegyzés
Normál, diverz (4.3.A. ábra)	Poliklonális	+	+	Megtörténik a mikrobiom evolúció, kívánt kimenet.
Nem tapasztalt	Monoklonális	+	+	Ha van transzfer, a végső állapot nem lehet monoklonális.
Nem tapasztalt	Poliklonális	-	+	Több stabil alpopulációt jelentene, a random mozgás miatt nem lehet.
Monoklonális II. (4.3.B. ábra)	Monoklonális	-	+	Az egyik alpopuláció elnyomja a többiét.
Kevésbé diverz, „oligoklonális”	Poliklonális	+	-	Néhány hasonló sejt utódai alkotják a végső telepet.
Nem tapasztalt	Monoklonális	+	-	Ha van transzfer, a végső állapot nem lehet monoklonális.
Kezdeti állapot (4.3. ábra bal oldala)	Poliklonális	-	-	A sejtek nincsenek hatással egymásra, marad a kezdeti állapot.
Monoklonális I. (4.3.B. ábra)	Monoklonális	-	-	1 sejt marad a szimuláció kezdete után, az ő utódai alkotnak telepet.

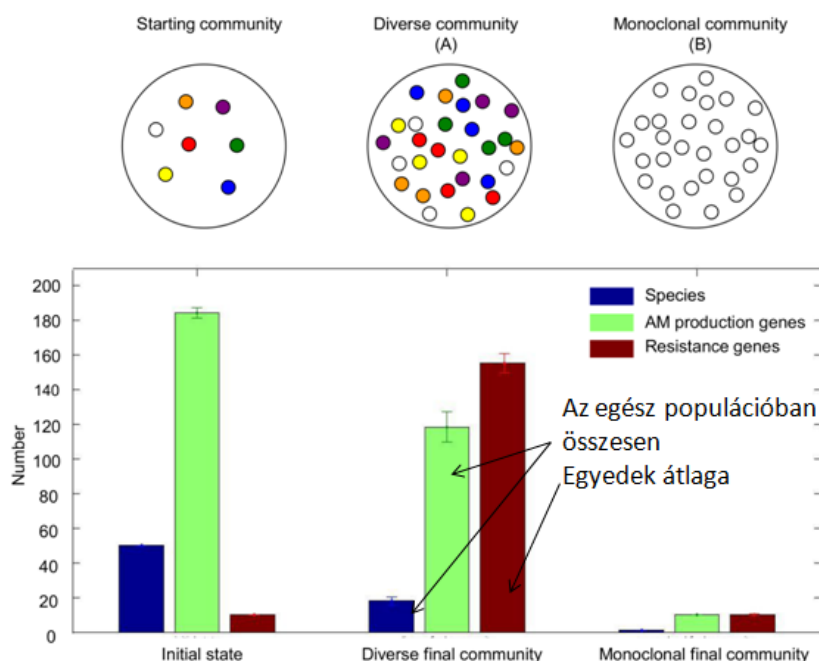
* A kezdeti néhány lépést leszámítva

A 4.3.A. ábra szemlélteti a poliklonális, sok sejtvonalat tartalmazó, diverz esetet. Ekkor az ágensek homogén, kevert közösséget alkotnak. Minden egyes faj csak néhány (itt 10 db) AMT-t termel, de a populációban jelenlévő összes AM-re rezisztens. Ez egybevág az egészséges, stabil mikrobiomok szerkezetével, ahol közösségi metagenom szinten sok AM és

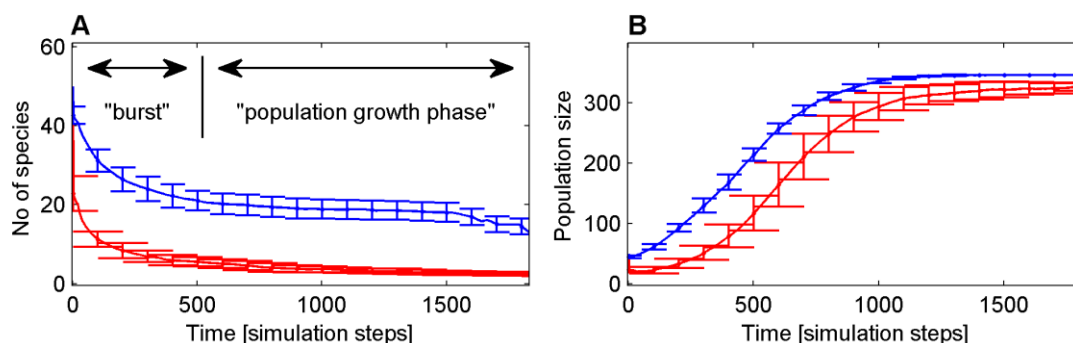
ugyanennyi rezisztencia gén található. Egy ilyen közösségben egy külső támadó nehezen marad életben, mivel a populáció sokféle AM-t termel ellen, és sok faktorára rezisztens lehet.

A 4.3.B. ábrán látható esetben egy faj elszaporodik, a többi kihál, így monoklonális közösség alakul ki diverz helyett. Ez figyelhető meg laboratóriumi körülmények közt is, amikor véletlenszerűen kiválasztott baktérium fajokat kevernek össze, a faj összetétel nem marad stabil egy vagy pár faj marad meg és terjed szét, a többi kihál [172]. A szimulációk során akkor kapjuk ezt a kimenetet, ha az adott paraméterek nem teszik lehetővé a HGT-t, így a túlélő faj egyedei egy készletnyi AM és rezisztencia génnel rendelkeznek csak.

Az közösség evolúciójának általános folyamata mindkét esetben azonos sémát követ, amiben két jól elkülöníthető részfolyamat figyelhető meg (4.4. ábra). A kezdeti fázisban a sejtvonalak (fajok) száma és az összes egyedszám is erősen lecsökken. Ekkor a különböző génkészlettel rendelkező sejtek még idegenek egymás számára és AM faktoraik segítségével megmérgezik a környezetükben lévőket. Ezt követi a növekedési fázis, amikor a sejtszám gyarapodni kezd és beáll a maximálisan megengedett szintre. A sejtvonalak száma ekkor már körülbelül konstans, ha lehetséges volt a géntranszfer a sejtek közt, akkor ekkorra összeszoktak, ha nem, akkor pedig már kipusztították egymást és csak egy faj maradt, és szaporodott el vetélytársak hiányában.



4.3. ábra: A szimulációs rendszerben előálló közösségek fő típusai. Ha lehetséges a HGT a sejtek közt, akkor a kezdeti populáció (balra) diverz közösséggé fejlődhet (A), amiben számos faj és antimikrobiális faktor van jelen és az előforduló AM-ok rezisztencia génjei szétterjedtek a közösség szinte minden tagjába. Ha a HGT nem hatékony, akkor egy faj klónjait tartalmazó, monoklonális populáció alakul ki (B), melyben csak egy fajnak megfelelő AM és rezisztencia gén készlet van. Az oszlopok 100 szimuláció átlagát mutatják szórással együtt. A kék oszlop a fajok számát mutatja, a zöld, hogy hányféle AM gén van a jelen az egész közösségben, a piros pedig, hogy egy ágensnek átlagosan hány rezisztencia génje van.



4.4. ábra: A közösség fajszámának (A) és egyedszámának (B) alakulása az időben (az idő szimulációs lépésekben értendő). A kék a diverz a piros a monoklonális kimenetelhez tartozó görbe. Mindkét esetben a fajszám és az egyedszám is erősen lecsökken a szimulációk elején, ekkor a sejtek még nem rezisztensek egymásra, de a fajszám csökkenése lassul, majd megáll, ha elkezdődik a géntranszfer (kék görbe). A populáció mértet pedig a modellben szereplő szigmoid összefüggés szerint változik. Az ábrán 100 kísérlet átlaga látható szórással.

4.2.2. A közösségek evolúcióját befolyásoló tényezők

A jellemző kimenetek azonosítása után a modellezett mikrobiomok fejlődését, evolúcióját befolyásoló tényezőket vizsgáltam. Ehhez a 4.3. táblázatban szereplő paraméter értékek mellett futtattam szimulációkat. Minden sejtsűrűség és interakció kiterjedtség mellett szisztematikusan szimulációkat futtattam a kezdeti génszám (NG), a letális dózis (vagy nem specifikus rezisztencia) (D) és a géntranszfer gyakoriság (TRN) vizsgált értékeivel, és ábrázoltam a végső populációk klonalitását (sejtvonalak számát), védekező (jelenlévő rezisztencia gén szám) és támadó (AM szám) erejét.

4.3. táblázat: A HGT modell paraméterterének feltérképezésére használt változók és vizsgált értékeik.

A nagyon lokális esetben az értékek a lokális harmadai, a globális esetben pedig a háromszorosai.

Nagy sejtsűrűség esetén ehhez hasonlóan a csésze sugara a normál érték harmada, kis sejtsűrűségnél pedig a háromszorosa.

Változó	vizsgált értékei
kezdeti génszám (NG) (db)	2;4;6;...;18;20
letális dózis (D) (db)	2;4;6;...;18;20
transzfer gyakoriság (TRN)	0; 1/5; 1/4; 1/3; 1/2; 1; 2; 3; 4; 5
interakciók kiterjedtsége: random mozgás hossza (RM); faktorok hatósugara (AR); génátvitel sugara (RR) (egység)	nagyon lokális interakciók: RM=5/3; AR=20/3; RR=20/3; lokális interakciók: RM=5; AR=20; RR=20; globális interakciók: RM=15; AR=60; RR=60
sejtsűrűség: Petri csésze sugár (egység)	nagy sejtsűrűség: 200/3; normál sejtsűrűség: 200; kis sejtsűrűség: 600

Az elvégzett 9000 szimuláció eredményeit az áttekinthetőség érdekében az alábbi módon ábrázoltam. Három ábrát készítettem a három vizsgált kimeneti paraméterhez, amiken színekkel jelöltem a kimeneti paraméter értékét az adott szimulációs változók esetén (a színskála mellékelve az ábrák mellett). Az ábrákon az x tengelyen az ágensek nem specifikus rezisztenciája (mennyi idegen AM-t visel el), az y tengelyen pedig a kezdeti génszám látható. Az így kapott síkokat a géntranszfer gyakoriságát jelző z tengely mentén egymásra rendeztem, majd a létrejövő háromdimenziós mátrixokat a sejtsűrűség és az interakciós kiterjedtségek szerint kétdimenziós táblázatba helyeztem. Az eredmények a függelékben az F.2-5. ábrákon láthatóak.

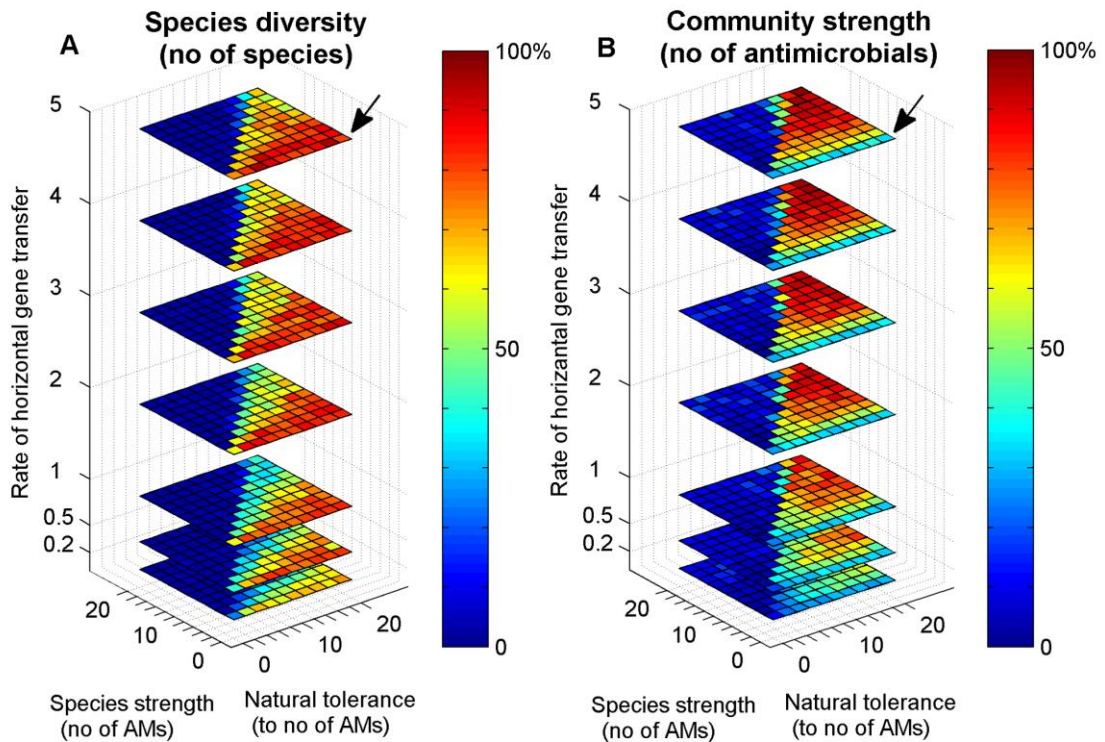
Az ezekről leolvasható általános megállapításokat a 4.4. táblázat foglalja össze. Az első fontos felismerés, hogy az interakciók típusa és a sejtsűrűség ugyanazt jelenti. Attól függően alakulnak a végső populáció tulajdonságai, hogy a sejtek, hány másik sejttel kerülnek kapcsolatba. Mindegy, hogy az interakciók sugarát, vagy a rendelkezésre álló életteret változtatjuk, mivel az ágenseknek nincs fizikai kiterjedésük a modellben. Ezek alapján az alábbi esetek különböztethetők meg: i) minden sejt elpusztul a szimuláció elején, mert túl sok idegen sejttel (és AM-aikkal) kerülnek kapcsolatba; ii) globális eset, ahol sok kapcsolat jön létre a sejtek közt; iii) lokális eset, ahol kevesebb a sejtek közti kapcsolat; iv) nagyon lassan evolválódó, „extrém lokális” eset, itt a maximális 5000 szimulációs lépés alatt nem szoknak össze a sejtek a kívánt mértékben, mert olyan kevés más sejttel kerülnek kapcsolatba.

4.4. táblázat: Jellemző kimenet típusok a HGT modellben.

	Kis sugarú interakciók RM=5/3; AR=RR=20/3	Normál sugarú interakciók RM=5; AR=RR=20	Nagy sugarú interakciók RM=15; AR=RR=60
Nagy sejtsűrűség Csésze sugara: 200/3	Lokális eset	Globális eset	Minden sejt elpusztul a szimulációk elején
Normál sejtsűrűség Csésze sugara: 200	Nem elég 5000 lépés az összeszokáshoz	Lokális eset	Globális eset
Kis sejtsűrűség Csésze sugara: 600	Nem elég 5000 lépés az összeszokáshoz	Nem elég 5000 lépés az összeszokáshoz	Lokális eset

A globális esetben a szimuláció kezdetén az egymásnak idegen sejtek több társukkal kerülnek kapcsolatba, mint a lokálisban, így a kezdeti versengés nagyobb, több sejt pusztul el az első néhány lépésben. A kevesebb megmaradó sejt kezdhet el összeszokni a HGT útján, ezért itt mind a klonalitás, mind a faktor, mind rezisztencia génszám kisebb a végső, egyensúlyi közösségben (mivel kevesebb sejt maradt meg több gén veszik ki a populációkból). Diverz közösségek itt csak kevés kezdeti gén és nagy tolerancia esetén képződnek és ezek értékei is elmaradnak a hasonló paraméterek melletti lokális eredményektől.

A lokális esetben (4.5. ábra) látható, hogy a paraméterter NG>D részén (kék terület) nem fejlődik ki poliklonális populáció, itt a sejtek nem koordinálják genetikai állományukat (nincs hatékony HGT), hanem versengenek és a szimuláció végén egy baktérium utódai alkotják a telepet (vagy mindenki kihal az első néhány lépésben). A paraméterter másik részén viszont poliklonális közösségek fejlődnek ki. Ezek diverz, HGT útján összeszokott több sejt vonalat tartalmazó mikrobiomok alkotják a modell kívánt kimenetét, amelyek kolónia szinten sok AM-t termelnek, és egyed szinten minden előforduló faktorra rezisztensek. A paraméterek hatását tekintve elmondható, hogy a gyakoribb géntranszfer (nagy TRN) növeli a végső diverzitást (4.5.A. ábra) és a jelen lévő AM-k mennyiségét is (4.5.B. ábra). Sejtenként kevesebb faktor szintén növeli a diverzitást, de a közösség támadóerejére (összes AM száma) természetesen nincs jó hatással. Az idegen AM-okkal szembeni természetes ellenálló képesség mértékének növekedése pedig növeli mind a közösségben megmaradó sejt vonalakat, mind az AM-ok számát. Ez vagy nagyon ellenálló sejteket, vagy nagyon gyenge AM-eket jelent. A két fogalom a modell szempontjából azonos, mindkettő a letális dózis (D) tulajdonságra, tehát arra utal, hogy egy sejt hány faktort képes speciálisan ellene szóló rezisztencia nélkül tolerálni (az AM-okat egységesen, ugyanolyan tulajdonságúnak kezeli a rendszer és a hatásaik, rezisztenciáik közt sincs átfedés). A legdiverzebb közösségek tehát gyakori HGT és sejtenként kevés, gyenge AM (vagy nagyon ellenálló sejtek) estén alakulnak ki. A támadó szempontból legerősebb közösségeknek pedig szintén a gyakori HGT, a gyenge AM-ok, de sejtenként sok faktor jelenléte kedvez.



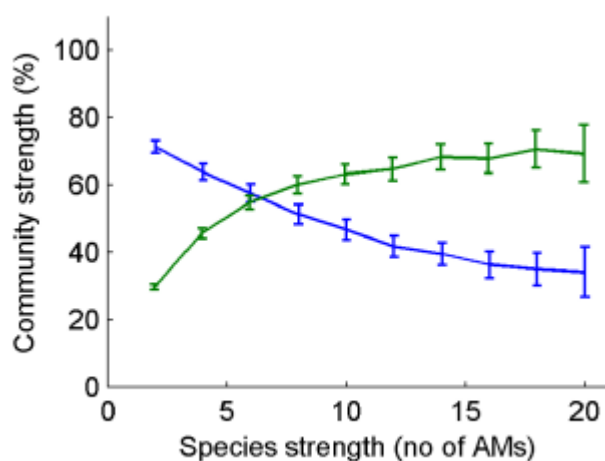
4.5. ábra: Lokális eset. A: a közösség diverzitása; B: támadó ereje. Mindkettő függ a HGT frekvenciájától és az egyedek tulajdonságaitól (a termelt antimikrobiális faktorok számától és a nem-specifikus rezisztencia mértékétől). Az intenzívebb HGT növeli a populáció erejét (felső és alsó panelek). A kevés faktort kifejező sejtek diverz, de gyengébb közösségeket alkotnak (például a fekete nyíllal jelzett eset).

Megfigyelhető tehát, hogy nem biztos, hogy a legnagyobb klonalitású, legdiverzebb populációk a legéletképesebbek, legellenállóbbak, legstabilabbak. A 4.5.B. ábrán látható (a fekete nyíllal jelzett terület), hogy nem az ő támadó erejük a legnagyobb a külső betolakodókkal szemben (kevesebb féle faktort tartalmaznak). Ilyen esetekben egymásra kezdetben is nagyon kevésbé veszélyes sejtek alkotják a közösséget (gyengék a faktoraik, vagy nagyon ellenállóak az idegen anyagokra). Ezek a szimuláció kezdetén sem pusztítják egymást jelentősen a faktoraikkal, ezért sok kis sejtvonal alakul ki. A kis, csak pár sejtet tartalmazó sejtvonalak kevésbé meghatározóak a telep élete, karaktere szempontjából, mint a nagy, sok sejtet tartalmazók, ezért indokolt lehet egy szignifikancia küszöböt szabni és csak az ez feletti sejtvonalakat számolni. Ez a küszöb esetünkben 3, az F.3. ábrán a legalább 3 sejtettel rendelkező sejtvonalak számát ábrázoljuk. Ekkor leginkább az F.2. ábrán a legtöbb sejtvonalat mutató esetekben csökken a klonalitás, bizonyítva, hogy ezek a telepek sok kis sejtvonalat tartalmaznak. A globális eseten ugyanakkor a szignifikancia küszöb nem változtat, mivel ebben a poliklonális közösségek kevés, de nagy létszámú sejtvonalból épülnek fel.

Szem előtt kell tartani azonban, hogy a modell az egyes fajok metabolikus tulajdonságaival közvetlenül nem foglalkozik. Annak becslésére, hogy a közösség

metabolikusan milyen sokszínű, például hogy milyen hatékonyan használja fel a környezete tápanyagait, az egyes fajok anyagcseréje hogyan segíti egymást, a diverzitás, a fellelhető fajok száma lehet az alkalmasabb mérőszám.

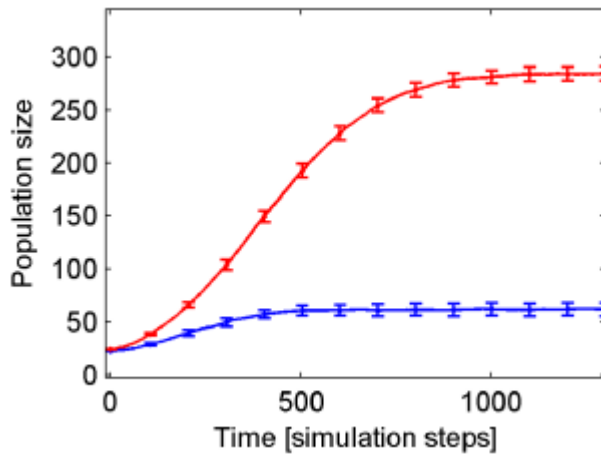
A fajok támadó erejének (AM tartalmának) hatását a közösség diverzitására (klonalitására) és együttes támadó erejére a 4.6. ábra foglalja össze. Ezen látszik, hogy az erősebb sejtek alkotta populáció kevésbé diverz (kék görbe) annak ellenére, hogy több AM-t tartalmaz. A nagyon erős ágensek ugyanis nem „csapatjátékosok” a modell szabályai szerint. A kevés AM-t tartalmazó ágensek könnyen alkotnak nagyon változatos, sok fajt tartalmazó, de gyengébb támadó erejű közösséget (zöld görbe). Összességében elmondható, hogy a fentiek alapján a HGT modellben ideális érett közösség akkor alakul ki, ha sem a diverzitással jelzett metabolikus erő, sem az AM termeléssel arányos támadó erő sincs túlsúlyban.



4.6. ábra: A 4.5. ábra tömörített adatai. A közösség támadó ereje (zöld görbe) és diverzitása (kék görbe) (y tengely) az egyes egyedek támadó erejének (x tengely) függvényében. Az erős egyedekből kevésbé diverz közösség alakul ki.

4.2.3. Különböző kezdeti populációk versengése összeszokás során

A fent leírt tendenciákat különböző populációk együttes vizsgálatával is alátámasztottam. A 4.7. ábrán például két olyan populáció látható, amelyek csak a nem-specifikus rezisztenciájukban (és kezdeti genomukban) különböznek. A kezdetben két azonos számú egyed tartalmazó monoklonális közösséget keverten helyeztem az élettérre és hagytam őket HGT segítségével összeszokni. A pirossal jelzett populáció több idegen faktort képes tolerálni, ezért hamarabb szokik hozzá más fajhoz, így hamarabb és gyorsabban indul növekedésnek és a végső közösséghez is több sejtrel járul hozzá, mint a kék, amelyik kevesebb idegen AM-t visel el a környezetében. Amint a sejtek átvették a másik faj rezisztencia génjeit, már nem jelentenek fenyegetést egymásra. Így a kék és a piros egyedek száma is állandósul a közösségben a modell szerint.



4.7. ábra: Más antimikrobiális faktor toleranciával (nem-specifikus rezisztenciával) rendelkező fajok versengése. A kézzel jelzett sejtek 10, a pirosak 15 idegen faktort képesek elviselni. A nagyobb toleranciájú faj szaporodik el jobban a közösségben, de a másik is tartósan jelen marad. A görbék 25 szimuláció átlagát mutatják a szórásokkal. Kezdetben mindkét populáció 25-25 ágenszt tartalmazott.

A fenti eredmények összefoglalásaként megállapítható tehát, hogy szimulációs eredményeim megmutatták, a horizontális géntranszfer képes elősegíteni olyan több fajt tartalmazó baktériumközösségek kialakulását, amelyek tagjai antimikrobiális faktorokat termelnek a többi faj ellen. A géntranszfer következtében a faktorok hatását kiküszöbölő rezisztencia gének szétterjednek a fajok közt és a populáció összeszokik, összeérik, tagjai már nem lesznek többé veszélyesek egymásra.

A paramétertér vizsgálata megmutatta, hogy a kívánt, biológiailag releváns, diverz populációk akkor alakulhatnak ki, ha az ágensek toleranciája az idegen faktorokkal szemben magasabb, mint a környező sejtek által termelt faktorok száma, és ha a géntranszfer nem nagyon lassú. Ekkor van idejük a sejteknek összeszokni, még mielőtt faktoraikkal elpusztítanák egymást és végül csak egy sejt és az utódai maradnának. (Ez az eset a gyakorlatban akkor áll fenn, ha idegen közegekből származó sejteket elegyítünk.) A szimuláció kimeneteként kapott végső populáció diverzitására még hatással van, hogy a sejtek mennyi másikkal vannak kapcsolatban, ezt a virtuális Petri csésze, vagyis a szimulált tér méretével, vagy a random mozgás valamint a gén illetve faktor érzékelés sugarának változtatásával állíthatjuk. Több kapcsolattal rendelkező sejtekből kezdetben több pusztul el, így kevésbé lesz diverz a végső baktérium telep.

A modellben implementált horizontális géntranszfer az eredmények alapján tehát fontos lehet olyan természetes, komplex mikrobiális közösségek kialakulása szempontjából, mint például a bélflóra, amely diverzitása révén képes sokrétű metabolikus funkciók ellátására.

4.3. Diverz, érett közösségek viselkedése

A HGT modellel érett közösségek kölcsönhatásai is vizsgálhatóak. Ezekhez a kísérletekhez előzőekben leírt módon állítottam elő és tároltam el populációkat és ezek egyedeit vittem fel a kísérletekhez a szimulációs teret jelentő virtuális Petri csészére. Fontos eltérés viszont az eddigiekhez képest, hogy ezekben az esetekben nem engedtem meg a horizontális géntranszfert a sejteknek. Ugyanis ekkor a két érett közösség összeszokásának nem pedig versengésének lennének tanúi. Ez biológiailag nem releváns, mert bár gyorsabb a random mutációk révén megvalósuló természetes szelekciónál mégis egy evolúciós léptékű folyamat. A populációk versengése pedig ökológiai jelenség és jóval rövidebb idő alatt játszódik le és végződik tartós egymás mellett éléssel, vagy azzal, hogy az egyik közösség kiszorítja a másikat. Az alábbiakban különböző összetételű érett mikrobiomok versengését mutatom be két egészségügyileg releváns helyzetet modellezve, az első eset a külső támadó kórokozóval szembeni védekezés, a másik pedig az antibiotikum rezisztens opportunisták fertőzés mikrobiális kezelése.

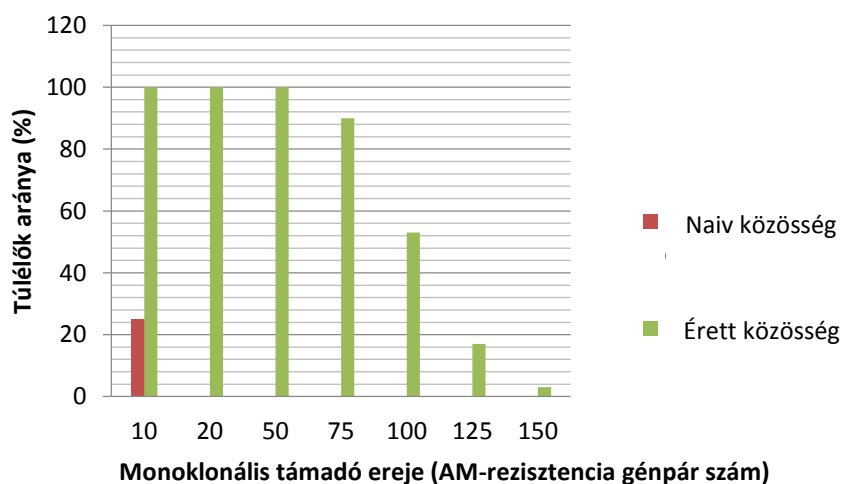
4.3.1. Az élettér védelme külső támadókkal szemben

Ezekben a kísérletekben 50 ágenszt tartalmazó poliklonális közösséghez adtam 25 egy fajból származó külső támadót. A támadók erőssége, tehát az általuk termelt AM-ok és rezisztenciák száma 10 és 150 között változott. Az egyik esetben a megtámadott közösség nem összeszokott naiv populáció volt, amely bár sok fajt és faktort tartalmazott, de a rezisztencia gének nem terjedtek el benne. Ezekben a kísérletekben megtiltottam a saját populáció elleni támadást, hogy a naiv közösség tagjai ne egymást pusztítsák el HGT híján, és ne ennek, hanem a külső támadóval folytatott interakciónak a hatása mutakozzon meg. A modell itt tehát csak a másik közösség által termelt idegen faktorokat számította és hasonlította össze a tolerancia szinttel. A másik esetben az előzőekkel megegyező támadók érett, összeszokott, diverz közösséget támadtak meg, melyben bár kevesebb faj és AM volt, a jelenlévő rezisztenciák viszont szétterjedtek a populációban (itt nem volt szükséges a saját sejtek megtámadásának mesterséges kiküszöbölése, mert ezek a nem jelentenek veszélyt egymásra).

Az eredmények alapján a naiv közösségeket (piros oszlopok), sokkal gyengébb támadók (az egyes naiv sejteknél erősebb sejtek) is kiszorítják az élettérből, mint az összeszokottakat (zöld oszlopok) (4.8. ábra). Ezen érett populációk a tagjaiknál egyenként nagyobb támadó erejű (AM számú) sejteket is elpusztítanak, mivel a közösség tagjainak változatos AM profilja széles spektrumú fenyegetést jelent, míg az elterjedt rezisztencia gének megóvják őket erős

támadókkal szemben is (ezek genomját ugyanabból a génkészletből sorsoltam, mint a védekező közösség tagjait). Csak a multirezisztens „szuper kórokozók” képesek szaporodni egy érett közösségben (4.8. ábra: 75-150 támadó erejű esetek). Ezek az esetek azonban biológiailag kevésbé relevánsak, mivel a faktorok általában összetett, „drága” molekulák, sok lépésben állítja őket elő a sejt, sok nyersanyag és energia árán, így a több faktort termelő sejtek anyagcseréje jóval gazdaságosabb, ezért is jó megoldás, ha minden faj csak néhány faktort állít elő és együttműködésük révén alakul ki egy komplex AM mintázat.

Az eredmények szerint tehát egy rezisztencia gének megosztásával összeszokott, diverz baktériumközösség ellenállóbb a külső támadókkal szemben, nehezebb megzavarni összetételét, mint egy csupán sok egymás mellett élő fajt tartalmazó telepét. A HGT útján megvalósuló genom szintű koordináció segíti tehát a kollektív területvédelmet, ami a mikrobiális közösség mellett a gazda szervezetet számára is előnyös. 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.



4.8. ábra: Összeszokott (zöld) és naiv (nem összeszokott) (piros) közösségek válasza a különböző erősségű monoklonális támadókra. A vízszintes tengelyen látható a támadó ereje (AM-rezisztencia génpárok száma), a függőleges tengelyen pedig a védekező közösség tagjainak arány a végső populációban. A támadó közösségek kezdetben 25 azonos sejtet, a védekező közösségek kezdetben 50 sejtet tartalmaztak, ezek közül a naiv közösségekben ez 50 fajt jelent átlagosan 181 AM-rezisztencia génpárral, az érett közösségekben pedig átlag 15 fajt, 109 AM és 180 rezisztencia génnel. Az értékek 100 kísérletből számított átlagok.

4.3.2. Mikrobiális terápia: patogének kiszorítása egészséges mikrobiális közösségek segítségével

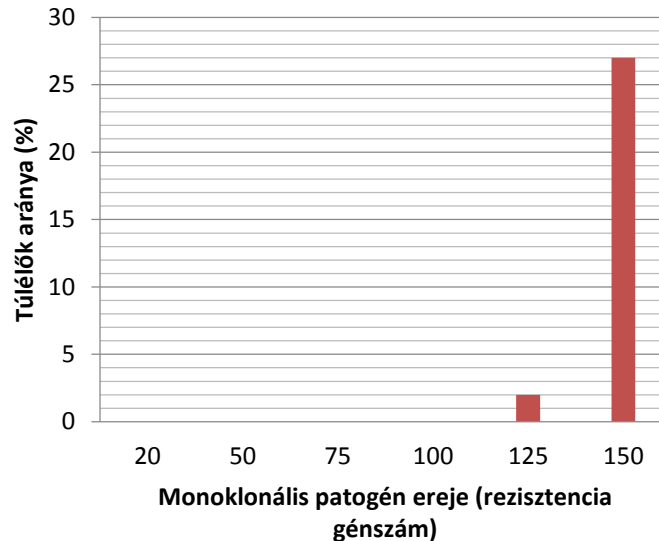
Az előző kísérlet fordítottja is megvalósítható a modellben. Ekkor egy multirezisztens baktériumfaj él a közegben, ahonnan egy diverz populáció képes kiszorítani. Az antibiotikum rezisztens kórokozók elleni küzdelem napjaink egyik fontos feladata az orvoslásban és a mezőgazdaságban egyaránt. Ez a kísérleti elrendezés jól modellezi például a *Clostridium difficile* fertőzés esetén alkalmazott mikrobiom transzplantációt.

A *C. difficile* antibiotikum rezisztens opportunistá patogén baktérium, ami az egészséges bélflórában is előfordulhat kis mennyiségben (más fajok nem engedik elszaporodni). Erős antibiotikumos kezelés hatására (például kórházi környezetben súlyos fertőzések vagy műtét miatt) a kórokozók mellett a bél normálflórájának nagy része is elpusztul. A *C. difficile* viszont ellenáll ezeknek a szereknek, spórákat képezve túlélhet (a megváltozott körülmények között ő van fitness előnyben), és a kezelés elmúltával újra vegetatív állapotba kerülhet. Ekkor a konkurencia hiányában elszaporodik a bélben, és ezzel kóros, diszbiotikus bélflórát hoz létre. Ez a csökkent diverzitású kóros közösség stabil, külső beavatkozás nélkül többnyire nem alakul vissza a természetes normálflórává, de nem látja el a normálbél flóra funkcióit sem, nem engedi megfelelően felszívódni a tápanyagokat, gyulladást, súlyos hasmenést okoz és ez gyakran az amúgy is legyengült szervezetű a beteg halálához vezet. Van néhány antibiotikum, melyekre a *C. difficile* érzékenyebb (pl. vancomycin, fidxomycin), de ezek alkalmazásánál egyrészt számolni kell a mellékhatásokkal, másrészt nagy az átmeneti javulást követő visszaesés veszélye is a kórokozó maradék spórái és a normálflóra hiánya miatt (az antibiotikumok nem teszik lehetővé ennek a visszaalakulását).

Célravezetőbb tehát a patogén kiirtása helyett a bél normálflórájának helyreállítására törekedni, mivel ennek nincsenek mellékhatásai, és ez az összeszokott mikrobiom lehetővé teszi a bélrendszer normális működését és tartósan nem engedi újra elszaporodni a *C. difficile*-t. A normálflóra helyreállításának az orvosi gyakorlatban alkalmazott módja az úgynevezett széklet transzplantáció (fecal transplantation). Ennek során egy egészséges (többnyire rokon) donor széklet mintájából kinyerik a benne található, a bélből származó baktériumközösséget és ezt juttatják be a beteg bélrendszerébe. Ez a HGT által összeszokott normálflóra megtelepedve tartósan kiszorítja a jórészt *Clostridiumot* tartalmazó diszbiózisosat és a fertőzés így megszűnik [173]–[175].

Az eljárás szimulálásához különböző számú (20-150) rezisztencia génnel rendelkező patogéneket készítettem és az ezek alkotta populációt támadtam meg egy érett, diverz közösség tagjaival (a kezdeti populációk aránya itt 50-50% volt). A transzplantált sejtek egyesével kevesebb AM gént tartalmaztak a patogénénél, de a populáció együtt sokféle faktort termelt és

sokra volt rezisztens. Így AM és rezisztencia komplexitása miatt életképesebbnek bizonyul a monoklonális kórokozónál, amelyet a nagyon nagy rezisztenciával rendelkező eseteken kívül teljesen ki tudott szorítani az élettérből (4.9. ábra). A hatás hasonlít a több különböző célpontra ható gyógyszer koktélokéra [176], azzal a fontos különbséggel, hogy ez a kezelés helyreállítja a normálflórát, amivel a bélrendszer egészségesen működhet. Megmutattam tehát, hogy vázolt kísérleti elrendezéssel *in silico* szimulálható a mikrobiom transzplantáció jelensége.



4.9. ábra: Összeszokott közösség és monoklonális multirezisztens patogén kölcsönhatása. A vízszintes tengelyen található a monoklonális közösség tagjainak védekező ereje (az általuk termelt faktorok száma 20), a függőleges tengelyen pedig arányuk (%) a végső közösségben. A támadó diverz, érett közösség átlagosan 10 fajt tartalmazott 81 AM-mel és 180 rezisztenciával. A szimulációk kezdetén 25-25 ágens volt mindkét közösségben. Az értékek 100 kísérletből számított átlagok.

Szimulációs eredményeim tehát felhívják a figyelmet arra, hogy a horizontális géntranszfer és a sejtek által termelt antimikrobiális faktorok segítségével magyarázható a mikrobiális közösségek külső kórokozók elleni védekezőképessége, valamint hogy ezek a közösségeket erős, akár antibiotikum rezisztens monoklonális patogének tartós kiszorítására, és a diverz mikrobiom helyreállítására is képesek. Ezek alapján a HGT szerepének kísérleti vizsgálata indokolt lehet a sok fajt tartalmazó mikrobiomok kialakulása, stabilitása és ellenálló képessége szempontjából. Az eredmények pedig fontos alapot szolgáltathatnak olyan mikrobiális közösségek mérnöki tervezéséhez, melyek a jövőben probiotikumként vagy a jelenleg hatékonyan nem kezelhető fertőzések elleni küzdelemben lesznek alkalmazhatóak.

5. Eredmények II: Önmérséklet a metabolikus koordinációt megvalósító QS modellben

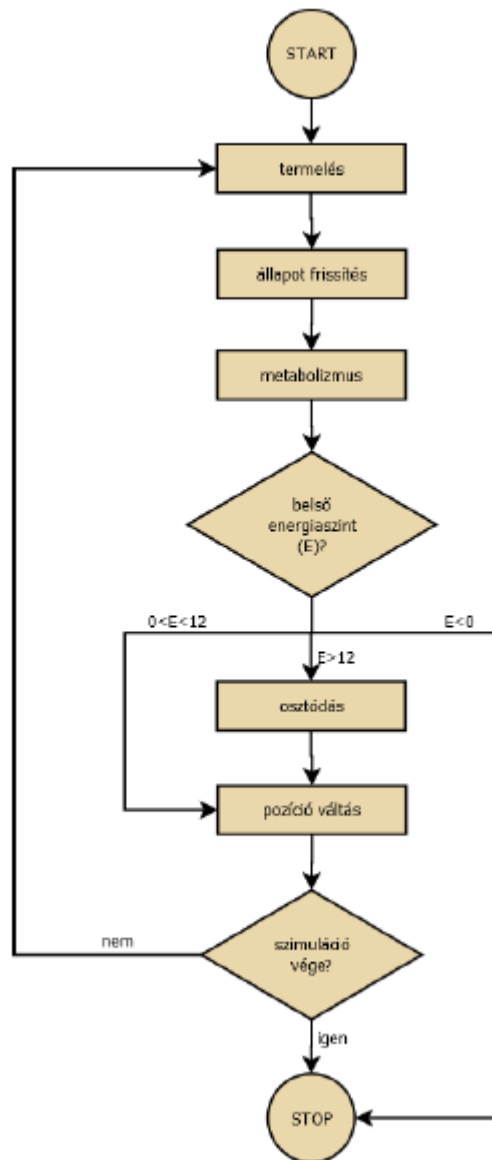
Az alábbi fejezetben a csoportunk által fejlesztett *P. aeruginosa* quorum sensing vezérelte rajzását leíró metabolikus koordináció modellel végzett kísérleteimet és eredményeimet mutatom be. Munkám fókuszában különböző, önmagukban is életképes (esetünkben növekedni és rajzani tudó) fajok együttélését lehetővé tevő tényezők vizsgálata állt. Vizsgálataim alapján a tartós együttélés kulcsa, hogy az azonos erőforrásokat fogyasztó fajok ne használják ki maximálisan ezeket az erőforrásokat, „gyakoroljanak valamiféle önmérsékletet” más fajoknak is hagyva életteret. Az önmérséklet egy lehetséges megnyilvánulásaként ebben a modellben a különböző QS küszöbök szerepére összpontosítottam. Az 5.1.-es alfejezetben bemutatom a modellt, jellemző viselkedését valamint fejlesztéseimet benne. Majd a további alfejezetekben sorra veszem a QS küszöbök hatását az együttélésre különböző fitnessű sejtek esetén (5.2.), az eddigieknél valószerűbb sejtípusokat vezetek be a rendszerbe (5.3.) és végül az antibiotikum termelés jelenlétében is vizsgálom az említett folyamatokat (5.4.).

5.1. A QS modell felépítése

Csoportunk egy hibrid *in silico* modellt alkotott a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing vezérelte rajzásának leírására, ebben a **baktériumokat ágensekkel**, a tápanyagokat, szignálokat és faktorokat pedig reakció-diffúziós egyenletekkel írták le. A modellben az ágensek random irányba mozognak, tápanyagot vesznek fel a környezetükből, az ebből nyert energiát használják aztán működésük fenntartására (metabolikus energiaszükséglet), jel és faktor termelésre, és adott energiaszint felett osztódnak két utódsejtre. Ha pedig energiaszintjük egy adott érték alá csökken, akkor elpusztulnak. A környezet szignál (S) és faktor (F) koncentrációját is érzékelik, és ha ezek átlépnek egy küszöbértéket (ezek hatását vizsgálom az 5.2. alfejezetben), akkor új állapotba kerülnek. Az **ágensek életciklusát** az 5.1. ábra, a legfontosabb paraméterek alapértelmezett értékeit pedig az 5.1. táblázat foglalja össze (a teljes használt paraméterkészletet a függelék megfelelő táblázatai tartalmazzák).

5.1. táblázat: A QS modell legfontosabb paramétereit és eredeti alapértelmezett értékeit (1 vad típusú faj és 1 QS rendszert tartalmazó AB termelés nélküli esetben). A leglényegesebb, szimulációk során módosított paraméterek kiemelve látszanak.

Paraméter	Jelentése	Alap értéke
Maximális lépésszám		5000 iteráció
Közeg paraméterek		
$Közeg_x$	A közeg szélessége (periodikus határ).	250 tér egység
$Közeg_y$	A közeg egyszerre megjelenített hossza (egy irányban végtelenített „sáv”).	2000 tér egység
$Cella_x$	Diffúziós cellák száma soronként.	50 db
$Cella_y$	Diffúziós cellák száma oszloponként.	400 db
Max. sejtszám	Maximális sejtszám diffúziós cellánként.	10 db
Kezdeti tápanyag	Kezdeti tápanyag mennyiség diffúziós cellánként.	500 egység
Diffúziós paraméterek		
D_T	A diffúzió időbeli lépésköze.	40
D_N	A tápanyag diffúziós együtthatója.	0,03
D_S	A jel diffúziós együtthatója.	0,02
D_F	A faktor diffúziós együtthatója.	0,05
Dec_s	A jel bomlási együtthatója.	0,001
Dec_f	A faktor bomlási együtthatója.	0,0001
Sejt paraméterek		
Állapotszám	A sejtek lehetséges metabolikus állapotainak száma.	4 db (AB jelenlétében 8 db)
Kezdeti sejtszám	Ennyi sejttel indul a szimuláció.	2000 db (10-10 sejt a közeg első 4 sorának minden cellájában)
Kezdeti energia	A sejtek energiája a szimuláció kezdetén.	0-12 E egység (random érték)
Osztódás utáni energia	Az utódsejtek kezdeti energiája osztódás után.	0,2 E egység
Metabolikus energia	Ennyi energiát (tápanyagot) használ el a sejt minden iterációban.	0,1 E egység
Osztódási energia küszöb (T_D)	Ekkora energia (tápanyag) szint elérése után osztódik a sejt	12 E egység
Tápanyag felvétel	Iterációnként ennyi tápanyagot vesz fel a sejt (ennyivel nő az energiája).	Nem rajzó sejt: 0,3 E egység Rajzó sejt: 0,5 E egység
Sebesség	Iterációnként ennyit tesz meg a sejt random irányba.	Nem rajzó sejt: 1,5 tér egység Rajzó sejt: 5 tér egység
Határ átlépési küszöb	Ennyi aktív sejt általi próbálkozás (oda kíván lépni) után válik egy diffúziós cella a telep részévé.	1 db
Jel küszöb (T_S)	A jel érzékelés küszöbértéke.	10 jel egység
Faktor küszöb (T_F)	A faktor érzékelés küszöbértéke.	10 faktor egység
Jeltermelés	A termelt jel mennyisége iterációnként.	Alapszintű: 0,1 jel egység Emeltszintű: 0,5 jel egység
Jeltermelési energia	A jeltermeléshez szükséges energia iterációnként.	Alapszintű: 0,005 E egység Emeltszintű: 0,025 E egység
Faktortermelés	A termelt faktor mennyisége iterációnként.	0,07 faktor egység
Faktortermelési energia	A faktortermeléshez szükséges energia iterációnként.	0,105 E egység



5.1. ábra: Az ágensek életciklusa a QS modellben [153].

Egy szignál és egy faktor esetén **4 állapotot** különböztetünk meg. Ezek feltételei és jellemzői:

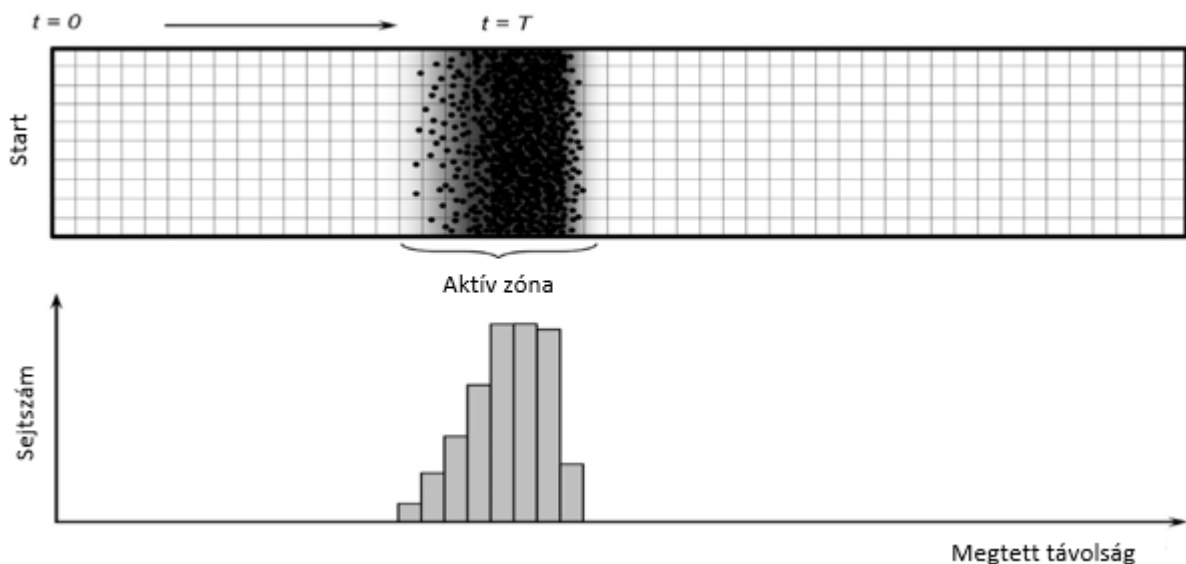
- i) alapállapot: küszöb alatti S és F szint: alapszintű S termelés
- ii) küszöb feletti S, küszöb alatti F szint: erősebb S termelés, F termelés
- iii) küszöb alatti S, küszöb feletti F szint: erősebb S termelés
- iv) aktív, rajzó állapot: küszöb feletti S és F szint: erősebb S termelés, F termelés, nagyobb sebesség, nagyobb tápanyag felvétel.

Alapállapotban a tehát a sejtek csak „jelzik, hogy jelen vannak”. Ha megfelelő mennyiségű jel gyűlt össze a környezetben, fokozódik a jeltermelés (pozitív visszacsatolás), és megindul a faktortermelés. Ha elég faktor (public good, például a rajzáshoz szükséges közeget kialakító anyag) gyűlt össze, akkor pedig elkezdődik a rajzás, ami élénkebb mozgással, és ennek

energiaigényét fedezendő nagyobb tápanyag felvétellel is jár. A sejtek csak ebben a rajzó állapotukban képesek új területet kolonizálni.

A **szimulációs tér** egy növekvő *P. aeruginosa* telep egy nyúlványát jelenti, az ágensek jellemzően az egyik végéből indulnak, ez fix határral lezárt, a tér két oldala periodikus határral van összekapcsolva a negyedik vizont végtelenített. A tér cellákra osztott egy cellán belül meghatározott számú sejt tartózkodhat csak (ez és a tápanyag szabályozzák a populáció létszámát). Az ágensek az aktuális cellájuk szignál, faktor koncentrációit érzékelik, és onnan vesznek fel tápanyagot és oda választják ki a QS anyagaikat is. Az anyagok adott sebességgel bomlanak és cellák közt az anyagok (explicit Euler módszerrel megoldott) reakció-diffúziós differenciálegyenleteknek megfelelően áramlanak. A modell alapértelmezett paramétereit a F.1.-F.3. táblázatok foglalják össze.

A sejtek működésük során felélik a cellában rendelkezésre álló tápanyagot, ami diffúzióval aztán pótlódik, de ez rendszerint csak kevés sejtnek elég. A rajzó állapotban lévő sejtek mozgásuk segítségével tudnak új cellákat „mehódítani”, új, érintetlen területet kolonizálni. Fontos kiemelni, hogy ez a mozgás random, a modell nem tartalmaz kemotaxist, ha a sejt olyan helyre lép, ahonnan már nincs tápanyag, akkor éhen hal. Maga a **rajzás**, tehát nincs explicit az ágensekbe kódolva, a tápanyag folyamatos felélése miatt kialakuló, a szabályokból áttételesen következő úgynevezett emergens tulajdonság. Egy nagy létszámú stabil közösségnek ezek alapján jellemzően túlnyomórészt rajzó állapotú sejtekből kell állnia, melyek egy mozgó sávban, mindig az élelemben gazdag terület szélén helyezkednek el, ez az úgynevezett **aktív vagy rajzási zóna** (5.2. ábra).



5.2. ábra: Az ágensek jellemző eloszlása és a kolónia haladása a táptalajon. [18] alapján

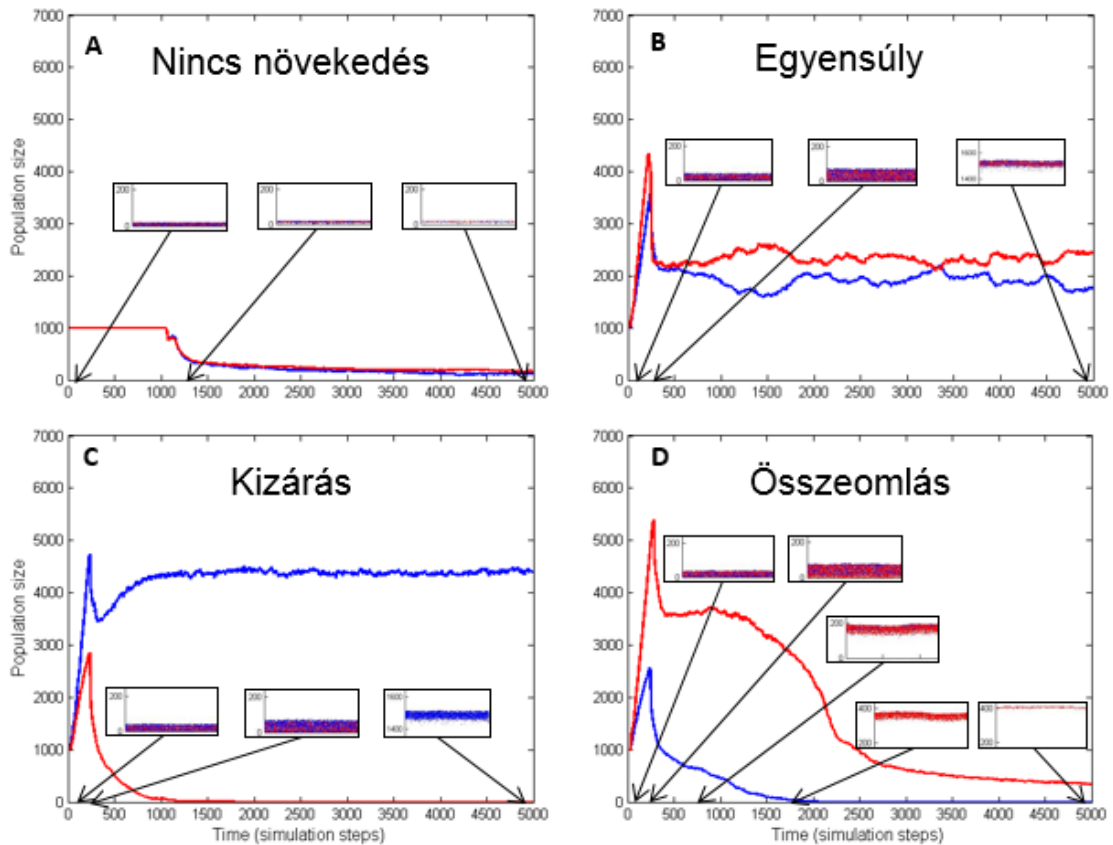
Az baktériumok korábban tárgyalt viselkedése az alapértelmezett, QS jel révén kommunikáló és a faktorral kooperáló úgynevezett **vad típusú (WT)** sejtekre jellemző. Ugyanakkor léteznek merőben eltérő működésű (mutáns) baktériumtörzsek is [177]. Az

úgynevezett **signal negative (SN)** sejtekben például nem működnek a jeltermelésért felelős gének, így azok nem képesek QS alapú kommunikációra. A receptoraik viszont aktívak, így a kívülről érkező, mások által termelt jeleket fel tudják fogni, és reagálnak is rájuk a faktorok (közös javak) termelésével (kooperálnak). Ez azt eredményezi, hogy míg önállóan nem képesek rajzani, addig külső jel jelenlétében, például WT sejtekkel együtt már igen (mintegy „dolgozókként” működnek a WT jelének irányítása alatt) [17]. Ezzel ellentétben a **signal blind (SB)** sejtek nem rendelkeznek se működő jeltermeléssel, se működő jel érzékeléssel, így mind a kommunikációból, mind a kooperációból ki vannak zárva, de a közös javak jelenlétében ők is képesek aktív, rajzó állapotba lépni. „Csaló” sejteknek is nevezhetők, mert nem járulnak hozzá az együttműködéshez, ugyanakkor élvezik az előnyeiket. Ez azt eredményezi, hogy a SN sejtekhez hasonlóan az SB baktériumok sem alkotnak önállóan életképes rajzó kolóniákat, és WT jelenlétében is elszaporodnak, és kiszorítják a WT-kat. A közös javak így elfogynak ezért a SB-k sem képesek tovább rajzani, felélik az elérhető tápanyagot és összeomlik a közösség. A mutáns sejtek azért szaporodnak el a WT-k rovására, mert rövidtávú szelekciós előnyt jelent számukra, hogy nem kell QS anyagok termelése energiát fordítaniuk, és így hamarabb, gyakrabban osztódhatnak. Az 5.3. alfejezetben ennek a kísérleti elrendezésnek a finomítását mutatom be.

5.1.1. Jellemző kimenetek

Csoportunk a modellel korábban számos kísérletet végzett, melyek eredményei több jellemző kategóriába sorolhatók a kialakuló közösségek viselkedése alapján [17],[170],[18]. Munkám első lépéseként az általam használt kísérleti elrendezéssel reprodukáltam ezeket, a különböző sejtípusok versengésével kialakuló, jól elkülöníthető jellemző kimeneteket (5.3. ábra). Az „A” esetben a közösség nem képes növekedni az adott körülmények között, általában azért, mert a sejtek nem tudják megtermelni a rajzáshoz szükséges közös javakat (faktorokat), mert például nem képesek quorum sensingre. Ekkor nem indul meg a rajzás, a baktériumok felélik a helyben rendelkezésükre álló tápanyagokat, és azután a nagy részük éhen hal. Egy kevés sejt marad meg csak a kolonizált élettér peremén, amelyek a diffúzióval odajutó tápanyagon vegetálnak. A „B” eset mutatja be azt az általában kívánatos eredményt, amikor a különböző sejtek stabilan együtt tudnak élni egy összetett közösséget alkotva. Ebben az esetben a két sejtípus homogén elegye népesíti be a rajzási sávot, de az együttélés a fajok teljes vagy részleges szeparációja útján is megvalósulhat. A „C” ábrán látható az úgynevezett kompetitív kizárás [178], ahol egy gyorsabban osztódó, fittebb, életkévesebb sejtípus gyorsabb növekedésének hála kiszorítja az adott körülmények közt kevésbé életképes másikat. Ezt az esetet látjuk akkor is, ha az egyik baktériumfaj kevesebb energiát használ anyagcseréje

fenntartására, szignál vagy faktor termelésre (tehát kommunikációra és kooperációra) a másikkal. Végül a „D” ábrán figyelhető meg az az eset, amikor a kezdetben fittebb sejtek (piros) kiszorítják a többit, ugyanakkor ők magukban nem képesek rajzást fenntartani, mert például nem termelnek elég szignált vagy faktort (pl. WT+SB esete). Ekkor a közösség egy kezdeti, rövid rajzó fázis után, amit a lassabban növekvő, de kommunikáló és kooperáló sejtek QS anyagai biztosítanak, megáll és összeomlik (az „A” esetben ismertett okok miatt). Későbbi eredményeim ezen esetek valamelyikébe lesznek besorolhatók.



5.3. ábra: A QS modell jellemző kimeneteit két faj versengése esetén. A: nincs növekedés, pl. a sejtek nem képesek QS-re (paraméterek: F.4. táblázat); B: stabil együttélés a különböző sejtípusok közt (paraméterek: F.3. táblázat); C: a fittebb sejtípus kiszorítja a kevésbé életképeset (paraméterek: F.3. táblázat); D: összeomlik a közösség (paraméterek: F.3., F.6. táblázatok). A kék és piros görbék jelzik az egyes sejt számokat az idő függvényében (szimulációs lépésenként). A kisebb betű képek a közösség jellemző képét mutatják a nyilak által jelzett lépésekkor (a kék és piros pontok jelzik a különböző típusú sejteket).

5.1.2. Fejlesztések a modellben

Munkám különböző fázisaiban különböző módosításokat hajtottam végre a modellben. **Változtattam a szignál és faktor küszöböket**, a sejtek „önmérsékletének” kifejezésére. A

baktériumok fitnessét az 5.2. alfejezetben az osztódási energiaküszöb módosításával befolyásoltam. Fitness, életképesség alatt a dolgozatban a populáció növekedési képességét értem, ami az osztódások gyakoriságával arányos, így az osztódási energiaküszöb paraméterrel befolyásolható közvetlenül, közvetetten pedig az összes energiaháztartást befolyásoló paraméter hat rá. Az 5.3. alfejezetben leírt eredményeknél finomítottam a módszert és az energetikai előnyt csökkentett jel és faktor termeléssel biztosítottam (lásd PM sejtek az 5.3. alfejezetben). Ezekben a kísérletekben a cél, olyan sejtek definiálása volt, melyek képesek rajzani önmagukban, de WT sejtekkel is stabilan együtt tudnak élni.

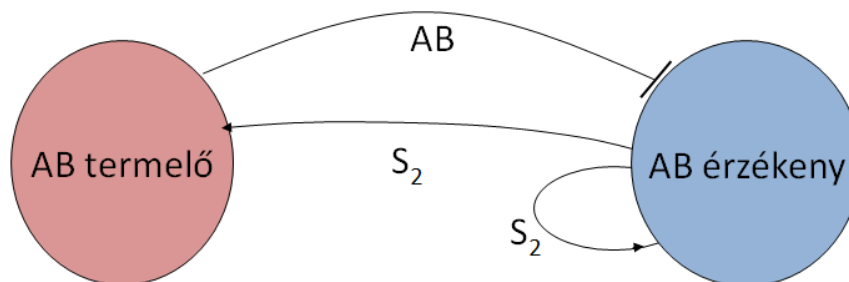
A modell korábban használt alapértelmezett paramétereivel nem tudtam elérni a fent vázoltakat, így az 5.2. táblázatban látható módon **változtattam meg a jeltermelés alap és maximális értékét és ezek energia szükségleteit**. Az alapszintű jeltermelés emelése tette lehetővé, hogy a sejtek hamarabb ériék el a kívánt jelszintet, így hamarabb kezdhessenek rajzásba. A maximális jeltermelés csökkentéssel pedig energiát takarítottak meg, így tápanyagszegény környezetben is tovább életben maradhattak (szélesedett az aktív zóna). Ezek után tudtam hatékonyan vizsgálni a későbbi alfejezetekben bemutatott rendszereket és paradigmákat. A használt sejtek jellemző paramétereit a F.3., F.6., F.7. táblázatok foglalják össze.

5.2. táblázat: Módosított paraméterek részleges mutánsok vizsgálatához. (Az értékek egységben értendők.)

	Eredeti érték	Új érték	Új érték (PM)
Alapszintű jeltermelési ráta	0,1	0,2	0,2
Alapszintű jeltermelés energiaszükséglete	0,005	0,01	0,01
Maximális jeltermelési ráta	0,5	0,34	0,4
Maximális jeltermelés energiaszükséglete	0,025	0,017	0,02

Ezek után **bevezettem az antibiotikum (AB) termelést** is a QS modellbe. Ehhez szükség volt néhány módosításra. Az antibiotikum a tápanyaghoz, a jelhez és a faktorhoz hasonlóan diffundál a közegben, tehát egy új diffúziós réteget definiáltam a számára. Az AB termelő sejtek előállítják a saját jelük (S1), faktoruk (F1) és az antibiotikumot (AB) (ennek energiaigénye megegyezik a jellel jelen esetben) és érzékelik a saját jelük, faktoruk és a másik faj jelét (S2). Az AB érzékeny sejtek termelik a saját jelük (S2), faktoruk (F2) és érzékelik a saját jelük, faktoruk és a másik faj antibiotikumát (lásd 5.4. ábra). Ez azt vonja maga után, hogy az ágensek állapotainak száma duplázódik négyről nyolcra (minden állapothoz tartozik AB-os eset is). Az új elrendezés lehetséges állapotait és azok főbb tulajdonságait az 5.3. táblázat foglalja össze. További változás, hogy most már két rajzó állapot is van, tehát a rajzó sejtek számát (ami az új élettér kolonizálásához szükséges) az alapján definiáltam újra, hogy mennyi ágens mozog maximális, rajzó sebességgel (szemben azzal, hogy mennyi van 4-es állapotban). Ez a

változtatás rugalmasabbá tette a modellt, könnyebb különféle viselkedésű sejteket definiálni benne. Az antibiotikum hatása is többféle lehet. Munkám során két esetet vizsgáltam. Az egyikben az AB érzékeny sejt AB jelenlétében extra energia befektetésével képes életben maradni (baktericid hatás), tehát energetikai hátrányba kerül a termelővel szemben. A másik esetben az AB hatására az érzékeny sejt visszalép alapállapotba, és nem képes tovább rajzani (bakteriosztatikus hatás), ez felfogható úgy, hogy az antibiotikum blokkolja a QS-t. Az antibiotikum termelő és az arra érzékeny sejtek jellemző paramétereit a F.8.-F.11 táblázatok foglalják össze. Kapcsolódó eredményeim az 5.4. alfejezetben olvashatók.



5.4. ábra: Az antibiotikum termelés és érzékelés vázlatos szemléltetése.

5.3. táblázat: AB termelő és AB érzékeny sejtek lehetséges állapotai.

Állapot	AB termelő			AB érzékeny		
	Termel	Érzékel	Viselkedés	Termel	Érzékel	Viselkedés
1	alap S1	-	nyugalmi állapot	alap S2	-	nyugalmi állapot
2	S1+F1	S1	nyugalmi állapot	S2+F2	S2	nyugalmi állapot
3	S1	F1	nyugalmi állapot	S2	F2	nyugalmi állapot
4	S1+F1	S1+F1	rajzás	S2+F2	S2+F2	Rajzás
5	alap S1+AB	S2	nyugalmi állapot	alap S2	AB	nyugalmi állapot és AB válasz
6	S1+F1+AB	S1+S2	nyugalmi állapot	S2+F2	S2+AB	nyugalmi állapot és AB válasz
7	S1+AB	F1+S2	nyugalmi állapot	S2	F2+AB	nyugalmi állapot és AB válasz
8	S1+F1+AB	S1+F1+S2	rajzás	S2+F2	S2+F2+AB	Rajzás és/vagy AB válasz

5.2. QS küszöbértékek szerepe különböző baktériumpopulációk együttélésében

A természetes baktériumközösségek rendszerint sok fajt tartalmaznak, melyek tartósan képesek együttélni és együttműködni, biztosítva ezzel az adott mikrobiom faji és funkcionális sokféleségét, alkalmazkodóképességét. Ezek a fajok szükségszerűen nem azonos fitnessűek, némelyek gyorsabban, mások lassabban nőnek. A gyorsabban, gyakrabban osztódók mégsem szorítják ki a többieket [179], mint azt az egyszerű fajok közti versengés esetén várnánk, akkor

sem, ha hasonlóak az igényeik, pl. ugyanazt a táplálékot fogyasztják. Ezek a legéletképesebb baktériumok tehát nem viselkednek teljesen mohó módon, képesek valamilyen szintű önmérsékletre, az egyéni és a kolónia szintű érdekek közötti egyensúly kialakítására. Munkám során a QS modell segítségével ennek a jelenségnek kulcs mechanizmusait, paramétereit igyekeztem azonosítani. Csoportunk korábban már megmutatta, hogy a QS anyagok és a különböző tápanyagforrások megosztása hozzájárul a kooperáció kialakulásához [18]. Én vizsgálataim során egy másik jelenség hasonló hatásaival foglalkoztam.

Ismert, hogy egy QS receptor több QS jelre is érzékeny lehet [180], lehetővé téve ezzel a fajok közti kommunikációt (a baktériumok „értik egymás nyelvét”), vagy más fajok „lehallgatását” [17]. Sok baktériumhoz hasonlóan [139], [181] a *P. aeruginosa* is több AHL típusú quorum sensing rendszerrel rendelkezik [82]. Ezen rendszerek jelei hasonló alapszerkezetűek, de a homoszerin lakton gyűrűhöz minden esetben más acil csoport kapcsolódik. A receptor AHL-kötő zseb része a saját jelmolekulájára optimalizált, de kisebb hatékonysággal, nagyobb jel koncentráció esetén a sajátjához hasonló jeleket is képes kötni [90]. Ez azt jelenti, hogy különböző fajok más-más küszöbértékekkel reagálnak ugyanarra a jelre. Ez az egyszerű és elterjedt jelenség vajon állhat a bakteriális önmérséklet hátterében, elősegítheti diverz közösségek kialakulását? Ezekre a kérdésekre kerestem a választ a QS modell segítségével.

5.2.1. Magasabb QS válasz küszöb, mint önmérséklet

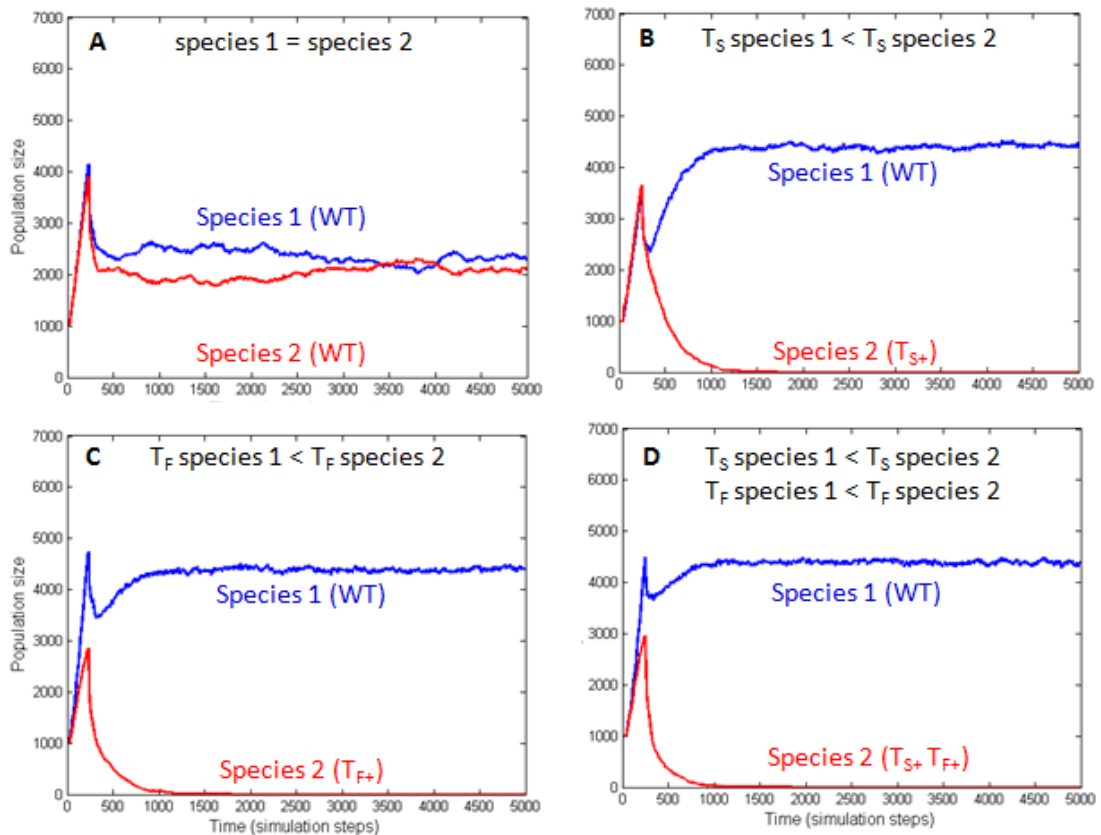
Tegyük fel, hogy két azonos tápanyagért versengő faj (species 1 és species 2) minden paramétere azonos, kivéve például azt a QS jel küszöböt, ami elérése után a sejtek alapállapotból aktív állapotba lépnek és rajzásba kezdenek, ami a telep gyorsabb növekedését teszi lehetővé (tápanyagban gazdag régióba léphetnek, ahol gyorsabban osztódnak). Ekkor, azonos QS jelet és faktort használó sejtek esetén, a telep növekedésével növekszik a jelszint, ami először átlépi az első faj (species 1) alacsonyabb, majd a második magasabb jel küszöbét (species 2) is. A küszöbök alatt mindkét faj alapállapotban van, felettük lehetnek aktívak, gyorsabban növekedők (ha a faktor mennyisége is megfelelő). A két küszöb között viszont az első faj előnybe kerül a másikkal szemben, mert ebben az intervallumban csak ő lehet aktív. Természetesen hasonlóak a körülmények a faktor küszöbértékének emelésekor is.

A válasz küszöb emelés tehát azt jelenti, hogy az adott faj nem él maximálisan a lehetőségeivel, később, szűkebb koncentráció tartományban aktiválja a QS rendszereit és kezd el rajzani, ez egyfajta önmérsékletként fogható fel. Fontos megjegyezni, hogy a válasz küszöbök csökkentése viszont nem jelenthet feltétlenül fitness növekedést. A QS túl korai aktiválása,

amikor még nem érték el a sejtek a hatékony koncentrációjukat, kifejezetten hátrányos. Az önmérséklet tehát pontosabban az ideális küszöbértéktől való eltérésként fogalmazható meg.

5.2.2. QS válasz küszöb különbségek hatása a stabil együttélésre

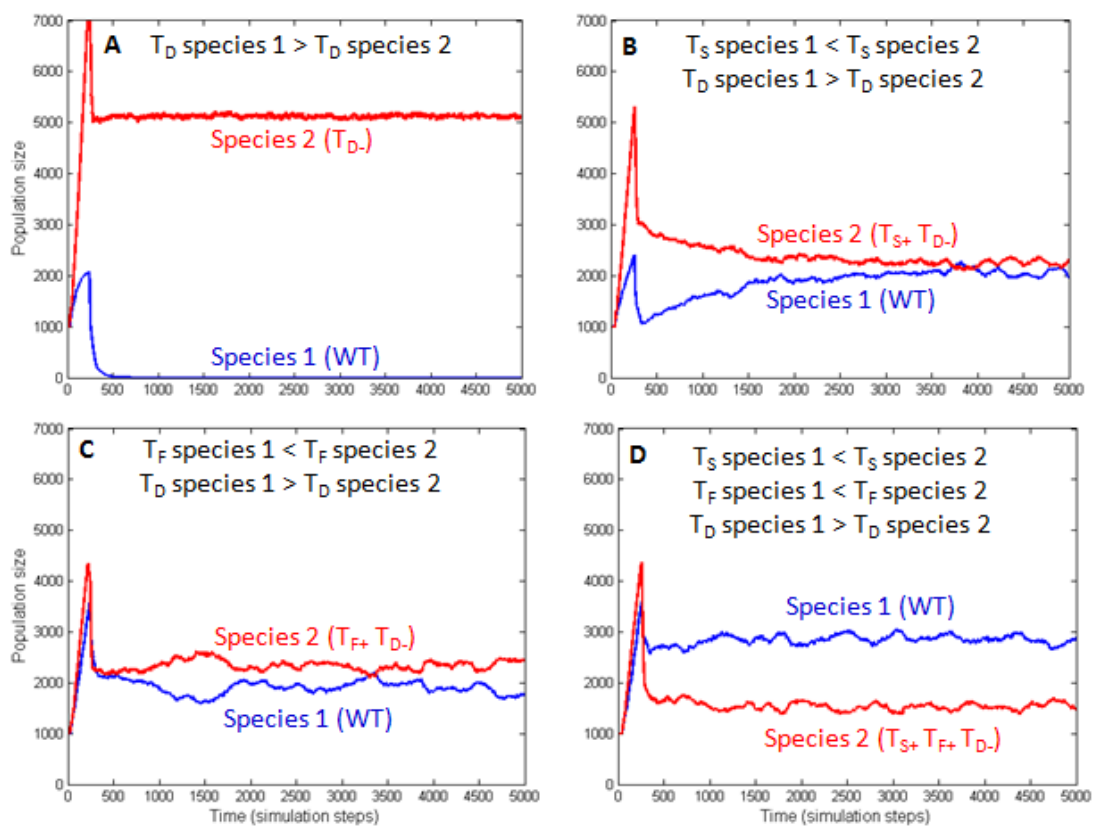
Az 5.5. ábrán látható, hogy míg azonos fajok képesek együttélni (5.5.A) addig a magasabb válasz küszöb a jel (5.5.B), a faktor (5.5.C), vagy mindkettő (5.5.D) esetén hátrányt jelent és a moderált faj kiszorulását eredményezi a közösségből. A kísérlet paramétereit az 5.4. táblázat foglalja össze.



5.5. ábra: WT, species 1 (kék) és módosított QS válasz küszöbű species 2 (piros) fajok versengése. A: azonos fajok képesek együttélni; B: WT és magasabb jelküszöbű (T_{S+}) faj versengése során az utóbbi kipusztul; C: WT és magasabb faktorküszöbű (T_{F+}) faj versengése során az utóbbi kipusztul; D: WT és magasabb jel- és faktorküszöbű (T_{S+} , T_{F+}) faj versengése során az utóbbi kipusztul. Az ábrák az egyes közösségek egyedszámát mutatják a szimulációs lépések függvényében. A szimulációk 5000 lépésig futottak és a kiindulási populáció 1000-1000 sejt volt mindkét sejtípusból.

Más eredményt kaptam viszont, amikor olyan fajok együttélését vizsgáltam, amelyek fitnessze nem volt egyforma. Mivel dolgozatomban a fajok fitnessze szaporodási sebességükkel arányos, ezért a fitnessz előny legegyszerűbben az osztódási energia küszöb (T_D) csökkentésével

volt elérhető, így ugyanis a sejtek hamarabb elérik a szükséges energiát, gyakrabban osztódnak, gyorsabban gyarapodik a számuk. Egyébként azonos paraméterekkel rendelkező sejtek esetén a fittebb kiszorítja a lassabban osztódót (5.6.A ábra). Az előző kísérlet ágenseit használva az eleve előnyösebb helyzetben lévő (WT) faj osztódási küszöbét csökkentve értelemszerűen az 5.5.B,C,D ábrákon láthatóakhoz hasonló eredményeket kaptam. A QS válasz küszöbök miatt hátrányban lévő fajnak fitness előnyt biztosítva viszont kialakult mind az emelt jel (5.6.B ábra), emelt faktor (5.6.C ábra) és emelt jel és faktor küszöb esetén is (5.6.D ábra) a stabil együttlés a két sejt populáció között. Ezekben az egyensúlyi közösségekben kisebb fluktuációktól eltekintve stabilan a küszöbértékekre jellemző volt a fajok aránya. A kísérlet paramétereit az 5.4. táblázat foglalja össze.



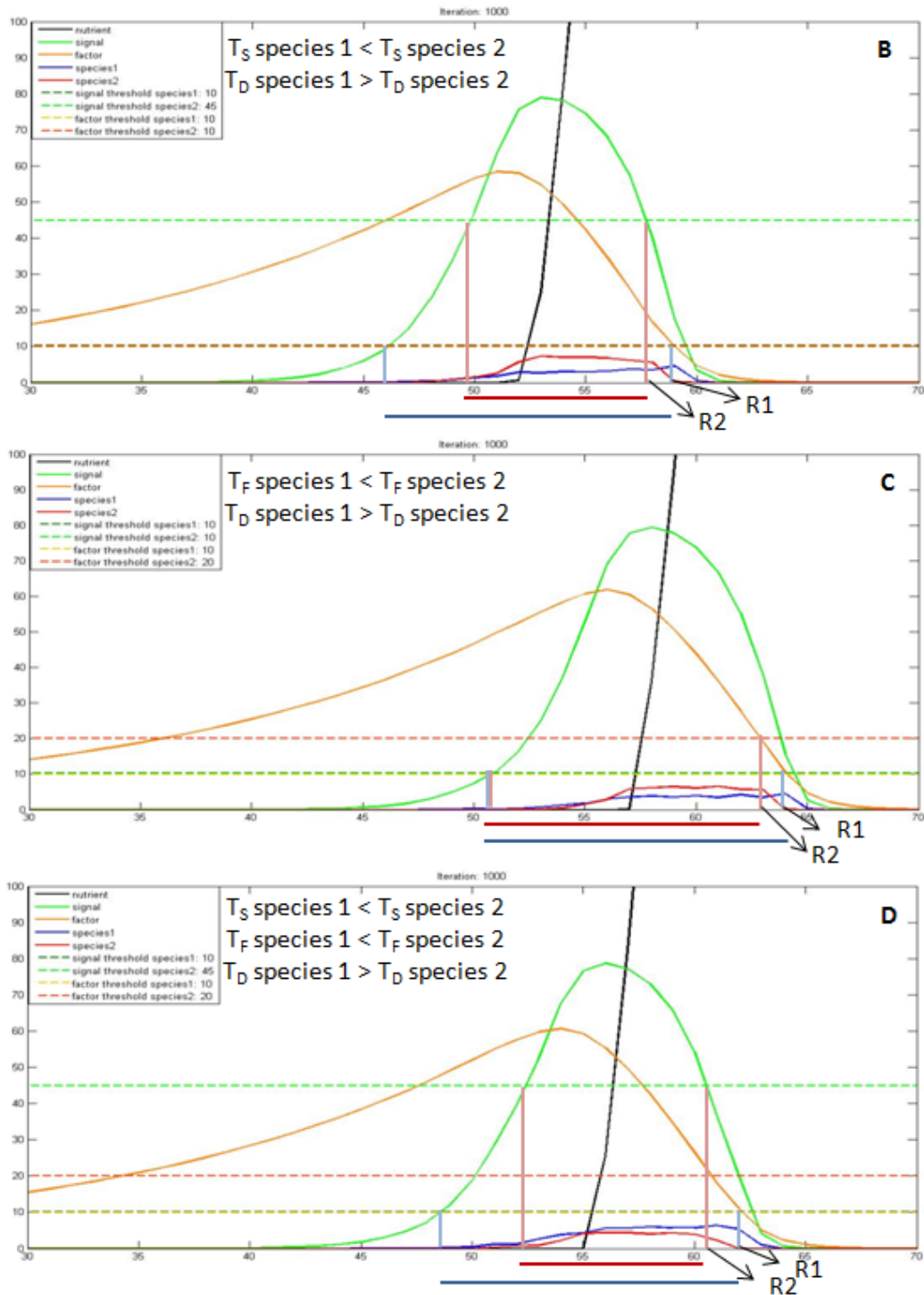
5.6. ábra: WT, species 1 (kék) és módosított QS válasz küszöbű fittebb species 2 (piros) fajok versengése. A: a WT és a fittebb (alacsonyabb osztódási küszöbű) faj (T_D) versengése során a WT kipusztul; B: WT és magasabb jelküszöbű, de fittebb (T_{S+} , T_D) faj képes stabilan együttléni; C: WT és magasabb faktorküszöbű, de fittebb (T_{F+} , T_D) faj képes stabilan együttléni; D: WT és magasabb jel- és , de fittebb (T_{S+} , T_{F+} , T_D) faj képes stabilan együttléni. Az ábrák az egyes közösségek egyedszámát mutatják a szimulációs lépések függvényében. A szimulációk 5000 lépésig futottak és a kiindulási populáció 1000-1000 sejt volt mindkét sejtípusból.

5.4. táblázat: Módosított szignál, faktor és osztódási küszöbök a bakteriális önmérséklet vizsgálatához.

Sejt modell	Osztódási küszöb (T_D)	Szignál küszöb (T_S)	Faktor küszöb (T_F)
Alap modell, WT (5.5. és 5.6. ábrák)			
WT	12	10	10
Modellek emelt QS válaszküszöbökkel (5.5. ábra)			
T_{F+}	12	45	10
T_{S+}	12	10	20
$T_{F+}T_{S+}$	12	45	20
Modellek emelt QS válaszküszöbökkel és/vagy növelt fitnesszel (5.6. ábra)			
T_{D-}	6	10	10
$T_{F+}T_{D-}$	6	45	10
$T_{S+}T_{D-}$	6	10	20
$T_{F+}T_{S+}T_{D-}$	6	45	20

Az együttélés kulcsa mindhárom esetben, hogy míg a magasabb és az alacsonyabb QS válasz küszöb közti koncentráció tartományban a lassabban növekvő faj (WT) tud csak rajzani, van tehát előnyben, addig a rajzási sáv egyéb régióiban, ahol mindketten aktív állapotban vannak, a gyorsabban növekvő a domináns. Ahogy az 5.7. ábra is mutatja a sejtek által termelt diffundáló QS anyagok alapján a két sejtípus más-más zónában aktív. A WT sejtek hamarabb kezdenek rajzani, az aktív sáv elején csak ők vannak még aktív állapotban, ez az ő régiójuk. A sáv többi részében viszont, ahol a gyorsabban osztódó sejtek is rajzó állapotban vannak, már ezek kerekednek felül a versengés során. (A sáv vége, ahol már nincs tápanyag, most kevésbé fontos.) A tápanyag fogyásával a rajzási öv folyamatosan halad előre a jel és faktor koncentráció gradiensekkel együtt, így a WT sejtek számára is folyamatosan biztosított a tápanyagban gazdag rajzási „frontvonal”, ahol nem kell a másik, gyorsabban osztódó fajjal versengeniük.

A megemelt QS szignál és faktor küszöbök értékeit a kísérletekhez úgy választottam meg, hogy a sejtek még önmagukban is rajzásra képesek maradjanak, de a WT dominálta sáv is kellően széles legyen ahhoz, hogy ott egy magát stabilan megújítani tudó, kellően nagyszámú közösség jöhessen létre. Ez itt 2-4-szeres küszöb emeléseket jelent, a természetben ezek a különbségek jóval nagyobbak is lehetnek [179]. A különböző küszöbértékeket a szignál és a faktor különböző gradiensei indokolják (lásd 5.7. ábra), amik a modellben az eltérő anyag termelési, lebomlási és diffúziós paraméterek miatt alakulnak ki.



5.7. ábra: Jellemző koncentráció viszonyok az 5.6. ábrán összegzett stabil együttélést eredményező szimulációk során. B: magasabb jel, alacsonyabb osztódási küszöb; C: magasabb faktor alacsonyabb osztódási küszöb; D: magasabb jel, faktor és alacsonyabb osztódási küszöb. A folytonos vonalak jelzik a tápanyag (fekete), a jel (zöld) és a faktor (narancssárga) koncentrációjának átlagos eloszlását a szimulációs rács soraiban, a szaggatott vonalak pedig a küszöbértékeket. Kék vonal a WT, piros vonal a módosított (fittebb, de moderált viselkedésű) sejtek mennyiségének átlagos eloszlása a szimulációs rácsra. A kék és piros vízszintes vonalak jelzik a régiót, ahol az egyes fajok aktívak. Mindhárom ábrán látható, hogy a WT hamarabb kezd rajzani így az aktív zóna elején van egy terület (R1 és 2 közt), ahol csak ő aktív, és van előnyben.

Számítógépes szimulációs eredményeim tehát megmutatták, hogy a QS modellben különböző fitnessű fajok tartós, stabil együttélését elősegítheti, ha a fittebb faj nem használja ki maradéktalanul a teljes életterét, „önmérsékletet tanúsít”, amely önmérséklet pedig elérhető a QS válaszküszöbök emelésével. Ez felhívja a figyelmet ennek a természetben is igen elterjedt egyszerű jelenségnek a szerepére az életterek felosztásában és ezáltal a komplex mikrobiális közösségek fenntartásában. A kevésbé életképes, lassabban növekvő fajokra is szükség van ugyanis egy közösségben, mivel ezek előállíthatnak például a többi faj számára fontos anyagokat vagy előkészíthetik az életteret más sejtek megtelepedéséhez. A komplex, különböző fitnessű fajokat tartalmazó rendszerek egy másik előnye, hogy hatékonyabban képesek alkalmazkodni a változó környezethez. Míg egy monokultúra esetén ehhez mutációkkal végbemenő evolúciós változások szükségesek, addig egy diverz közösségben nagyobb eséllyel lesz az új körülményeket jobban elviselő faj, ami elszaporodva valamelyest megváltoztatja fajösszetételt, ami lényegesen gyorsabb, ökológiai léptékű adaptálódást jelent. Eredményeim alapján quorum sensinget használó baktériumok között a különböző válasz küszöböknek fontos szerepe lehet ezen folyamatok megvalósításában.

5.3. Mérsékelt paraziták vizsgálata

Az előző fejezetben a fitness előnyt egyszerűen az osztódási energiaküszöb (T_D) csökkentése jelentette. Ilyen előny viszont elérhető más módon is, például az 5.1. alfejezetben tárgyalt SB és SN mutáns sejtek is gyorsabban szaporodnak a WT-nél, mivel nem kell kommunikációs (jel) és/vagy kooperációs (faktor) anyagok termelésére fordítaniuk energiát. Ezek a mutánsok viszont önmagukban nem életképesek, nem tudnak hatékonyan terjeszkedni, rajzó közösséget létrehozni. Természetes körülmények között az együttélő fajok (sokszor a paraziták is) képesek önálló életre [182], nincsenek teljes mértékben rászorulva az együttműködő partnerükre (a gazdára), annak jelenléte „csupán” segítség számukra. Azonban invazívak, ha a gazda közelébe kerülnek, képesek elszaporodni a kedvező közegben, ugyanakkor nem szorítják ki onnan, a nekik előnyt biztosító sejteket sem (mint ahogy a SB sejtek teszik). Tehát csak annyira használják ki a gazdát, hogy tartósan „hasznot húzassanak belőle”, de annak ez ne legyen elviselhetetlenül hátrányos. Ezt a jelenséget nevezhetjük fenntartható parazitizmusnak, ami az eddig használt interakciós sémáknál [17] valóságosabb, reálisabb megközelítés.

A fenntartható parazitizmus modellezéséhez a WT és az SB sejtek közti úgynevezett részleges mutáns (partial mutant, PM) sejteket definiáltam, amelyek szignál és faktor termelése,

tehát QS képessége a WT-hez képest csökkent, de nem 0, mint az SB esetén (nem knock out mutációval van dolgunk tehát). Ilyen mutánsok a természetben is kialakulhatnak. Például, ha a LuxR receptor fehérje DNS-kötő képessége csökken egy genetikai változás miatt, akkor kevésbé hatékonyan serkenti a közös javak és QS jelek termelését és így a sejt kommunikációs és kooperációs képessége is csökken. A tartós együttélés érdekében ezt az energiatakarékosabb működést szükséges kompenzálni, amit az előző fejezetben ismertetett módon, a szignálküszöb emelésével oldottam meg (ez pl. a LuxR csökkent AHL-kötő képességnek feleltethető meg).

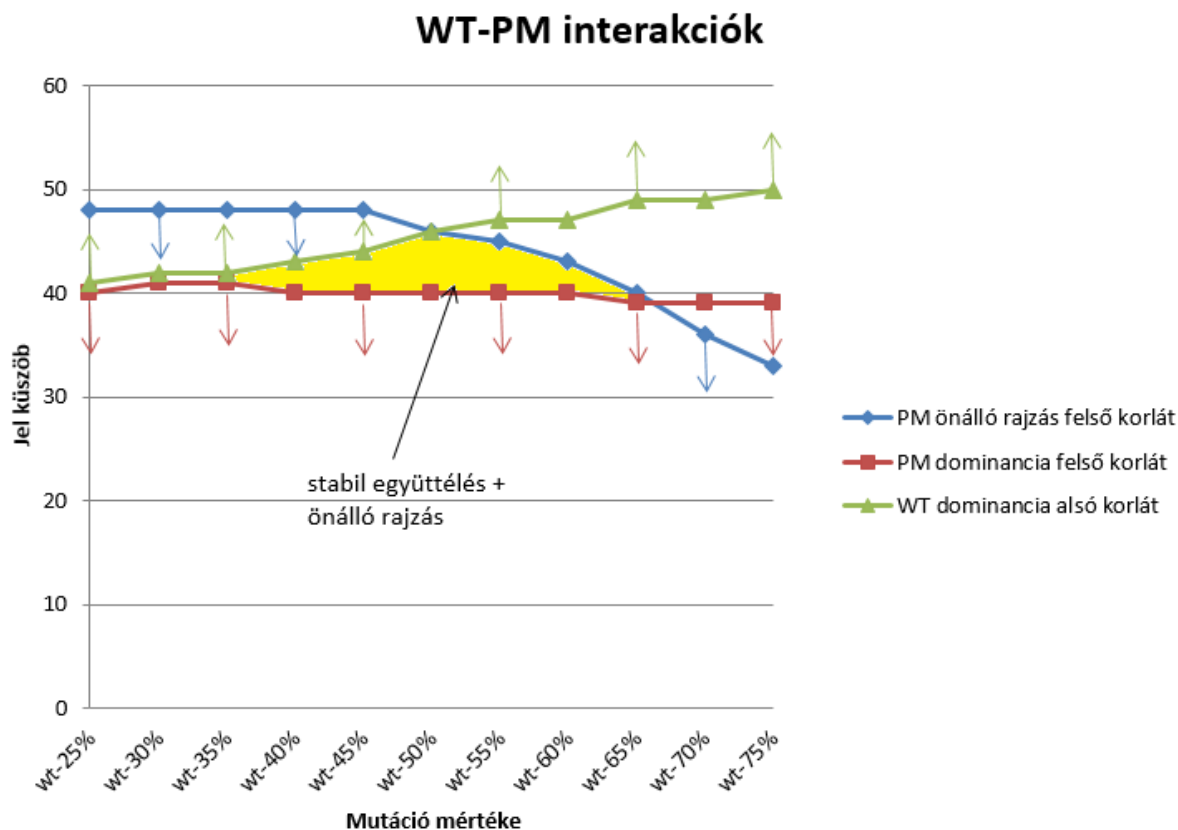
5.3.1. Önállóan rajzó, WT-vel stabil együttélésre képes mérsékelt paraziták definiálása

A parazitizmus vizsgálatának első eredményeit Bihary Dóra írta le disszertációjában [153]. Egyáltalán nem kooperáló (SB-hez hasonló) parazitákat használt és megmutatta, hogy az önmérséklet különböző formái segítik a tartós együttélés kialakítását a WT sejtekkel. Az önmérsékletet négyféleképpen fogalmazta meg, az előző fejezetben említett magasabb jel és faktor küszöbön túl vizsgálta annak hatását is, ha a parazita saját jelét érzékelve kerüli el a túlszaporodását, illetve ha csak bizonyos rendelkezésre álló tápanyagszint felett marad aktív állapotban. Ezek a paraziták viszont nem voltak képesek önállóan, a WT sejtek nélkül rajzani.

Ennek elérése érdekében vezettem be a részleges mutánsokat (PM). Az ágensek eredeti paraméterei mellett viszont így sem tudtam önállóan rajzó és a WT-vel is stabil együttélést kialakító sejteket definiálni, így korábban rajzó és szélesebb aktív sávot alkotó ágenseket definiáltam az 5.1.2. alfejezetben leírt módon. Így már elérhető volt a kívánt viselkedések összessége az 5.8. ábrán a sárgával jelölt területhez tartozó paraméterek (a WT-40% és WT-65% közti mutációk valamint 40-45-ös jel küszöb) esetén (A kísérlet paramétereit az F.1. F.2., F.6., F.7. táblázatok foglalják össze.). Az ábra vízszintes tengelyén jelöltem a mutációk súlyosságát. A WT-60% jelölés például azt jelenti, hogy a WT-hez képest 60%-kal kisebb az aktív állapotba lépéskor a jel és a faktor termelés növekedése, így ezek a sejtek csak a WT „40%-nyit” kommunikálnak és kooperálnak. A függőleges tengelyen a jel válaszküszöb látható. Az önmérsékletnek azért ezt a módját választottam, mert ezt tartottam a legkönnyebben interpretálhatónak és a biológiai analógiák terén is a legkézenfekvőbbnek.

A paramétertér feltérképezése (15000 lépéses szimulációk) megmutatta, hogy alacsony jel küszöbök esetén a PM sejtek kiszorítják a WT-t a közösségből (5.8. ábra piros vonal alatt), túl magas küszöbnél viszont nem képesek rajzani, így a WT marad csak meg (5.8. ábra zöld vonal felett). Súlyosabb mutációk és magasabb jel küszöbök esetén alakulhat ki tartós együttélés a különböző sejtek közt (szétváló zöld és piros vonal közt), ugyanakkor a súlyosabb QS

mutációk csökkentik a PM közösség önálló életképességét, csak alacsonyabb jel küszöbvel tudják elindítani a rajzást (5.8. ábra kék vonal alatt).

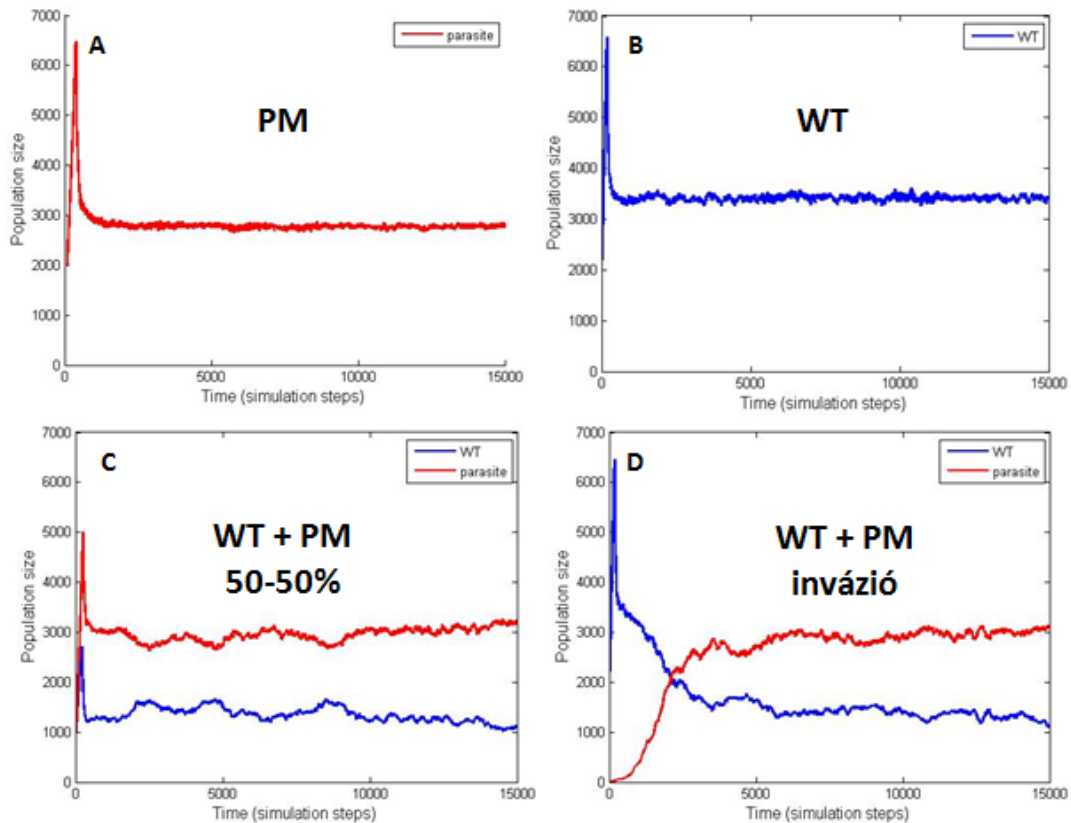


5.8. ábra: A fenntartható parazitizmus paramétereinek meghatározása (a jel és faktor termelés csökkenésének hatása a QS jel válasz küszöb függvényében). A kék vonal alatt a sejtek nem képesek önállóan rajzani. Kevert kezdeti telep esetén a piros vonal alatt a PM sejtek kiszorítják a WT-kat a zöld felett pedig a WT sejtek a PM-kat. A sárgával jelölt részen találhatóak a WT-vel stabil közösséget kialakítani képes és önállóan is rajzó és részleges mutánsok paramétere. A szimulációk 15000 iteráció hosszúak voltak.

5.3.2. Az életképes és stabil mérsékelt paraziták tulajdonságai

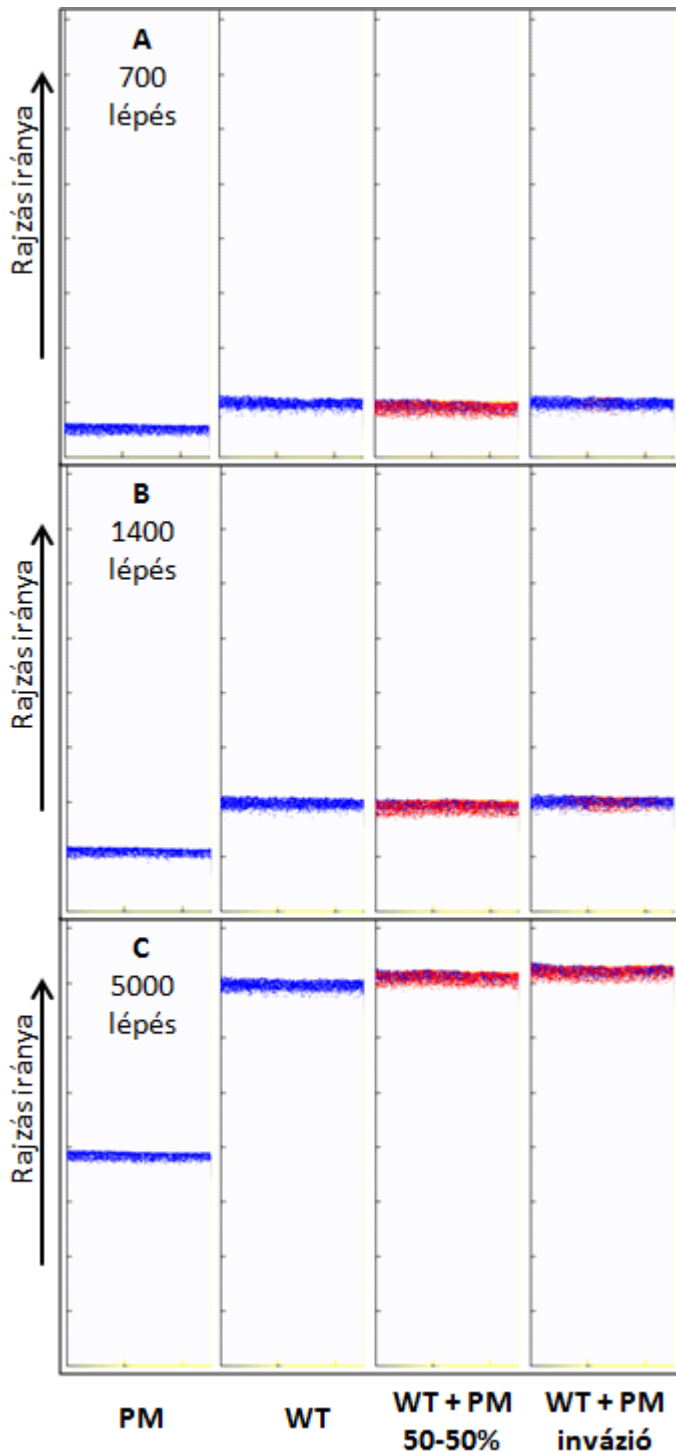
A tartós együttélés körülményeinek vizsgálatára a WT-65%-os 40-es jelküszöbű mérsékelt parazitát (PM) választottam, mivel ez volt a legkevésbé kommunikáló és kooperáló ágens típus, ami még önállóan is képes volt rajzani, tehát itt volt várható a legnagyobb különbség a PM (5.9.A ábra) és a WT (5.9.B ábra) viselkedés közt. Minkét sejtípus stabilan rajzó közösséget alakít ki, de a PM-ek rajzása később kezdődik, mivel a csökkent QS és a magasabb jel küszöb miatt lassabban tudják elérni az ehhez szükséges koncentráció viszonyokat. A keskenyebb rajzási sáv miatt (5.2.2. alfejezet) a stabil PM populáció létszáma is kisebb a WT-nél. Az 5.9.C ábrán látható, hogy a kétféle sejt képes együttélni, ha 50-50%-ban vannak jelen

kezdetben, de a PM invazív is (5.9.D ábra), tehát kis kezdeti mennyiségből indulva, például szennyezésként a közösségbe kerülve is elterjed a WT közt, de nem szorítja ki azt teljesen. A PM/WT arány mindkét esetben ugyanazon jellemző érték körül mozog, ami a QS csökkenés (finesz előny) és az önmérséklet (jel küszöb) mértékétől függ.



5.9. ábra: 40-es szignál küszöbű WT-65%-os mérsékelt parazita életképessége egyedül, invazivitása, valamint tartós együttélése WT sejtekkel. A: PM sejtek egyedül; B: WT sejtek egyedül; C: 50-50% PM és WT sejtéből álló kezdeti populáció fejlődése; D: 4 db PM és 1996 db WT sejtéből álló kezdeti közösség fejlődése (invazivitás). Piros vonal a PM, kék a WT sejtszáma a szimuláció során. A szimulációk 2000 db ágenssel indultak és 15000 iteráción át futottak.

Az 5.10. ábra az előző 4 kísérletből (PM egyedül, WT egyedül, 50-50% PM-WT, PM invazivitás) mutat pillanatképeket a telepekről különböző időpillanatokban. A jobb oldali panelen látszik, hogyan kolonizálja a kezdetben kisszámú PM a WT dominálta telepet. Másrészt látható, hogy a tisztán PM telep lassabban, kevésbé hatékonyan rajzik, mint a tisztán WT, a kevert telepek viszont szintén a WT sebességével haladnak. Ennek háttérében az áll, hogy amint arról az 5.2. alfejezetben írtam, a rajzási sáv eleje csak a WT sejteké, a nagyobb QS válaszküszöbük miatt mások ott nem lehetnek jelen aktívan. Ugyanakkor ez a rajzási front határozza meg az egész közösség sebességét (amely területeket az itteni sejtek birtokba vesznek, a telep részévé tesznek, oda a többiek is beléphetnek már). A megfelelő koncentrációviszonyok



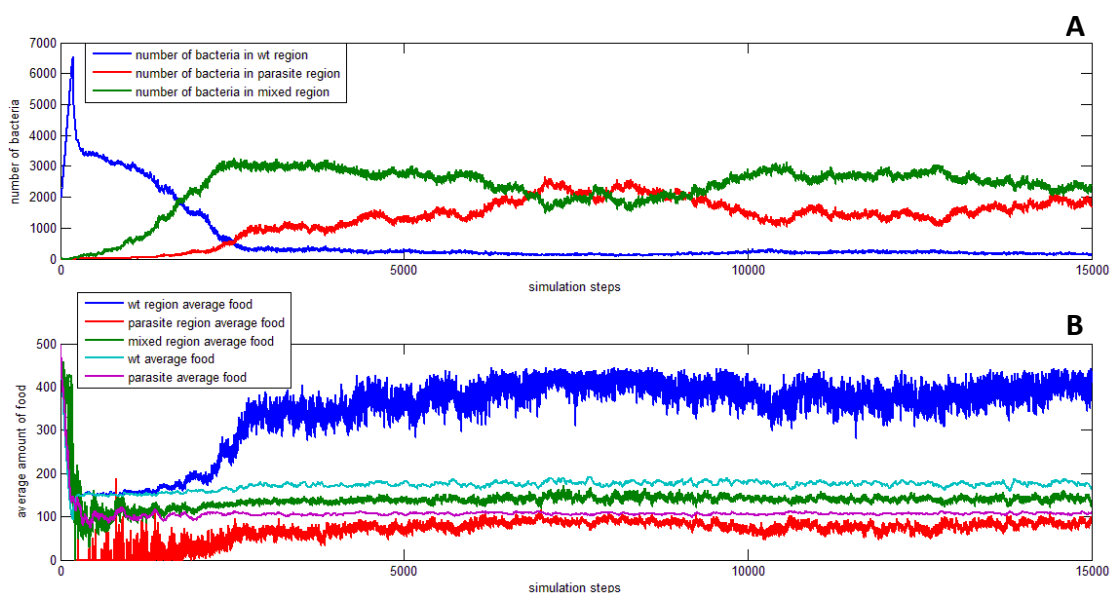
5.10. ábra: 40-es szignál küszöbű WT-65%-os mérsékelt parazita (PM); WT; 50-50%-os kezdeti elegyűk és kezdetben 4 db PM ágenszt tartalmazó populációk rajzása. A pillanatfelvételek a szimulációs teret mutatják A: 700; B: 1400; C: 5000 lépés után. A pontok az ágensek, a két jobboldali panelen kékek a WT, pirosak a PM ágensek. A szimulációk 2000 db ágenssel indultak és 15000 iteráción át futottak.

közt fittebb, gyorsabban növekvő PM elől tehát „előre menekülnek” a WT sejtek és ezzel „utat törnek” az egész közösség számára.

Az invazivitás szimulációja során vizsgáltam a szeparáció mértékét és az egyes sejtípusok számára elérhető átlagos tápanyagmennyiségeket is. A szeparáció becsléséhez kihasználtam, hogy a modellben a tér diffundáló anyagok (pl. a tápanyag) miatt cellákra osztott. Cellánként meghatároztam az egyes sejtípusok arányát, és ez alapján osztottam a cellákat tisztán WT, tisztán PM és kevert csoportra, majd összegeztem az egyes csoportokban az ágensek számát [18]. A csoportosításhoz 80%-os „tisztasági küszöböt” alkalmaztam, tehát például 10 sejt esetén az adott cellában maximum 2 lehetett más típusú, mint a többi, ahhoz, hogy a cellát még tisztának tekintsem. Jellemzően 6-7 sejtet tartalmazott 1-1 cella, így legfeljebb 1 sejt lehetett eltérő. Az 5.11.A ábra alapján ezzel a szigorú küszöbértékkel a sejtek nagy része kevert (zöld vonal) vagy tisztán PM (piros vonal) régióban található, és csak kevés sejt van tiszta WT területen (kék vonal),

ez a rajzás „frontvonala”. (A küszöb csökkentésével nő a WT régiós sejtek száma a keverték rovására.)

Az 5.11.B ábrán látható az egyes régiókban élő sejtek átlagos tápanyag ellátottsága. Ezt úgy számoltam, hogy megszoroztam a régió minden cellájában a sejtszámot az ott lévő tápanyag mennyiséggel, majd normáltam a sejtek számával. Ez megadja, hogy a régió egy sejtje átlagosan mennyi tápanyaghoz férhet hozzá, milyen gazdag élelemben a közeg, ahol él. Az eredmények azt mutatják, hogy a WT régióban (ez a rajzási front) a legtöbb a tápanyag (kék vonal), a PM dominálta részen pedig a legkevesebb (piros vonal) (ez az aktív zóna tápanyagszegény vége). Itt a PM sejtek gazdaságosabb működésük (csökkentett QS) miatt tudnak tovább életben maradni, mint a WT-k. A kevert régió átlagos tápanyagtartalma (zöld vonal) a két tiszta rész közé esik. Hasonló eredményeket kapunk akkor is, ha nem osztjuk régiókra az életteret, hanem minden WT vagy PM sejtre összegezzük a cellája tápanyagmennyiségét és ezt normáljuk az adott típusú sejtek számával. Ekkor is a WT sejtek élnek átlagosan tápanyagban gazdagabb közegben (ciánkék vonal), mint a PM-ek (lila vonal).



5.11. ábra: 40-es szignál küszöbű WT-65%-os invazív PM és WT sejtek szeparációja és tápanyag hozzáférése. A: az egyes régiók (WT régió: kék, PM régió: piros, kevert régió: zöld) sejtszámának alakulása a szimuláció során; B: a régiók sejtjeinek (WT régió: kék, PM régió: piros, kevert régió: zöld) és az egyes sejteknek (WT: ciánkék, PM: lila) az átlagos tápanyag hozzáférése a szimuláció során. A szimuláció 2000 db ágenssel indult és 15000 iteráción át futott.

A tartós együttélés kulcsa tehát itt is az, hogy a különböző sejtípusok legalább részlegesen felosztják egymás között az életteret, ez esetben a rajzási sávot. A WT sejtek a dominánsak a sáv elején, mivel itt csak ők lehetnek aktív állapotban, a PM sejtek pedig a többi részen, ahol gyorsabban osztódhatnak, mivel energiájuk kisebb részét fordítják QS anyagok termelésére. A sáv elején több a tápanyag, itt a nagyobb energia szükségletű, „többet dolgozó”

WT „úttörők” vannak többségben, míg hátul a tápanyagban szegény részeken az energiatakarékosabb PM sejtek képesek tovább életben maradni. A kevert kolóniák egyedszáma így nagyobb lesz, mint az egy féle sejtet tartalmazóké, ami az egy közösségen belüli eltérő QS jel érzékenység és kooperációs faktor termelés közösségi szintű előnyeire utal. Ez a jelenség egyfajta emergens, az egyszerű viselkedési szabályokból előálló munkamegosztásként is értelmezhető. A WT sejtek vezetik a rajzást, a PM sejtek pedig felhasználják a maradék tápanyagot is. A feladatok és a preferált pozíciók felosztás bár nem létszükséglet, de kifejezetten előnyös a mérsékelt parazita számára, mert létszámát tekintve ő a domináns a közösségben és a WT segítségével gyorsabban, hatékonyabban rajzik, mint egymaga. A WT számára az együttélés a sejtszámok tekintetében hátrányos, de nem elviselhetetlen (nem szorul ki a közösségből), a rajzás sebessége szempontjából viszont semleges (a kevert közösségek is olyan sebességgel rajzanak, mint a tiszta WT telepek). Ezzel a kísérleti elrendezéssel egy a mikrobiomok természetes dinamikájához hasonlóbb *in silico* rendszert sikerült alkotnom, ahol egy önmagában is életképes sejtípus (faj) képes megtelepedni egy új élettérben, tartósan kihasználni annak eredeti tagjait, és ahol a különböző fajok koordinálják működésüket valamint elhelyezkedésüket a telepen.

5.4. Az antibiotikum termelés hatása különböző baktériumpopulációk együttélésére

A fent leírtak ellenére a természetes mikrobiális közösségekben az erőforrásokért történő versengés szerepe sem hanyagolható el. A pozitív kooperációs faktorok mellett a sejtek negatívan is képesek hatni egymásra. Ezen a „kémiai harctéren” a legismertebb „fegyver” az antibiotikum (AB) termelés. A *Chromobacterium violaceum* (*Cv*) például képes érzékelni a *Burkholderia thailandensis* (*Bt*) baktérium QS jelét és AB termeléssel válaszolni erre. A *Cv* tehát „lehallgatja” a *Bt* kémiai kommunikációját és a QS aktivációs küszöb elérése előtt elkezd AB-t termelni ellene. A *Bt* így nem képes megtelepedni *Cv* által lakott élettérben [183]. Az ehhez hasonló mechanizmusok, ahol egy sejt úgy védekezik a versenytársával szemben, hogy annak kémiai jelét érzékelve antimikrobiális anyagokat termel ellene, igen elterjedtek az élővilágban [184], [185]. Ezért merül fel a kérdés, hogy ilyen körülmények közt is kialakulhat-e stabil, tartós együttélés a sejtek közt, illetve hogy a QS válasz küszöbök modulálása milyen hatással van erre. Az alábbiakban ezekre a kérdésekre keresem a választ az AB termeléssel és érzékeléssel bővített QS modell segítségével.

5.4.1. Szignalizációs stratégiák

Az antibiotikum termelést két fajt tartalmazó közösségekben vizsgáltam, ahol az AB termelő (ABP) faj képes érzékelni, „lehallgatni” az AB-ra érzékeny (ABS) másik faj QS jelét, és ha ez átlép egy határt, akkor antibiotikum termelésbe kezdeni ellene. Ez egy igen egyszerű kísérleti elrendezés, ugyanakkor már itt is több lehetőséget kell megvizsgálni. A két faj QS rendszerei lehetnek például azonosak, teljesen vagy csak részben különbözőek, és az AB jelenléte vagy hiánya mellett ezek az elrendezések is befolyásolják az együttélés lehetőségét. Csoportunk korábban vizsgálta az egyes quorum sensing rendszerek közti áthallást, más fajok jelének és/vagy faktorának hasznosítását és ennek hatását az együttélésre [18]. AB termelés nélkül végzett kontroll kísérleteim eredményei egyeznek ezekkel a korábbi megfigyelésekkel.

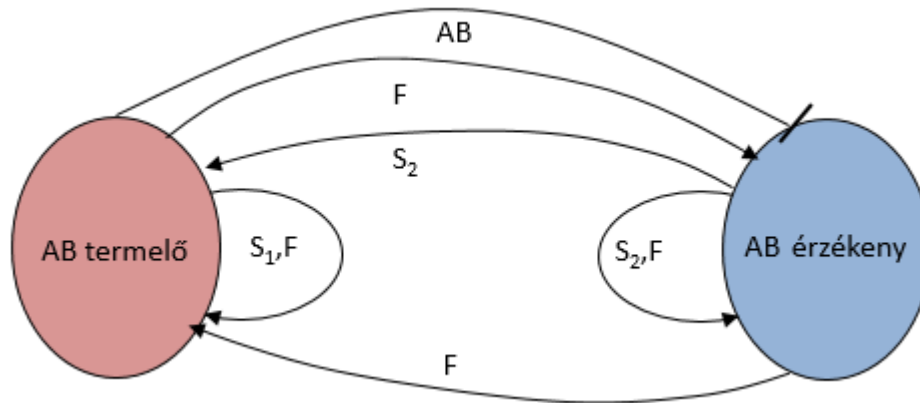
Azonos QS rendszerek esetén nem értelmezhető az antibiotikum termelés fent bemutatott sémája. Itt a fittebb (például alacsonyabb osztódási küszöbű vagy kisebb metabolikus energia igényű) faj kiszorítja a másikat, de ez a fitness előny kompenzálható a „önmérséklettel”, QS küszöbök módosításával, amint azt a korábbi alfejezetekben látható volt. A különböző szignált és faktort (de azonos tápanyagot) használó sejtek nem képesek tartósan együttélni [18], a gyorsabban növekvő faj kiszorítja a másikat. Ezen az antibiotikum termelés sem változtat. Ekkor, amennyiben az AB termelés nem igényel olyan nagy energiát a sejtektől, hogy emiatt komoly hátrányba kerüljenek, ők kerülnek ki győztesen a versengésből és népesítik be az életteret. Ezen ABP sejtek előnye csökkenthető például magasabb metabolikus energia, osztódási energia küszöb alkalmazásával, az AB termelés költségének emelésével vagy az ABS sejtek toleranciájának növelésével. Így a két faj életképessége egyensúlyba hozható és időszakos együttélés létre is jöhet közöttük, amit viszont a korábbi megfigyelésekkel összhangban [18] véletlenszerűen az egyik faj elterjedése és másik kihatása követ (sztochasztikus kizárás). A részben különböző QS rendszerek közül a vázolt AB termelési séma mellett csak a különböző jel, azonos faktor eset értelmezhető. Itt kialakulhat a tartós együttélés azonos fitness vagy önmérséklet esetén, ami AB jelenlétében is fenntartható, amennyiben az AB termelő sejteknek van valamilyen fitness csökkentő „hátrányos” tulajdonságuk. A továbbiakban ezzel az utóbbi esettel foglalkozom részletesebben. A különböző QS rendszerekkel végzett szimulációim eredményeit pedig az 5.5. táblázat foglalja össze.

5.5. táblázat: A különböző szignalizációs stratégiák és a moderált viselkedés hatásainak összefoglalása. Az eredményeket szolgáltató szimulációk 5000 iteráció hosszúak voltak és 1000-1000 kezdeti sejttel mindkét fajból.

		Nincs „önmérséklet”	„Önmérséklet”
Közös QS rendszer	nincs AB termelés	a fittebb faj kiszorítja a másikat, tartós együttélés azonos fitness esetén	lehet tartós együttélés
Különböző QS rendszer	nincs AB termelés	a fittebb faj kiszorítja a másikat, véletlen kizárás azonos fitness esetén	a fittebb faj kiszorítja a másikat
	AB termelés	az AB termelő kiszorítja a másikat	
Részben különböző QS rendszer (azonos faktor)	nincs AB termelés	a fittebb faj kiszorítja a másikat, tartós együttélés azonos fitness esetén	lehet tartós együttélés
	AB termelés	az AB termelő kiszorítja a másikat	

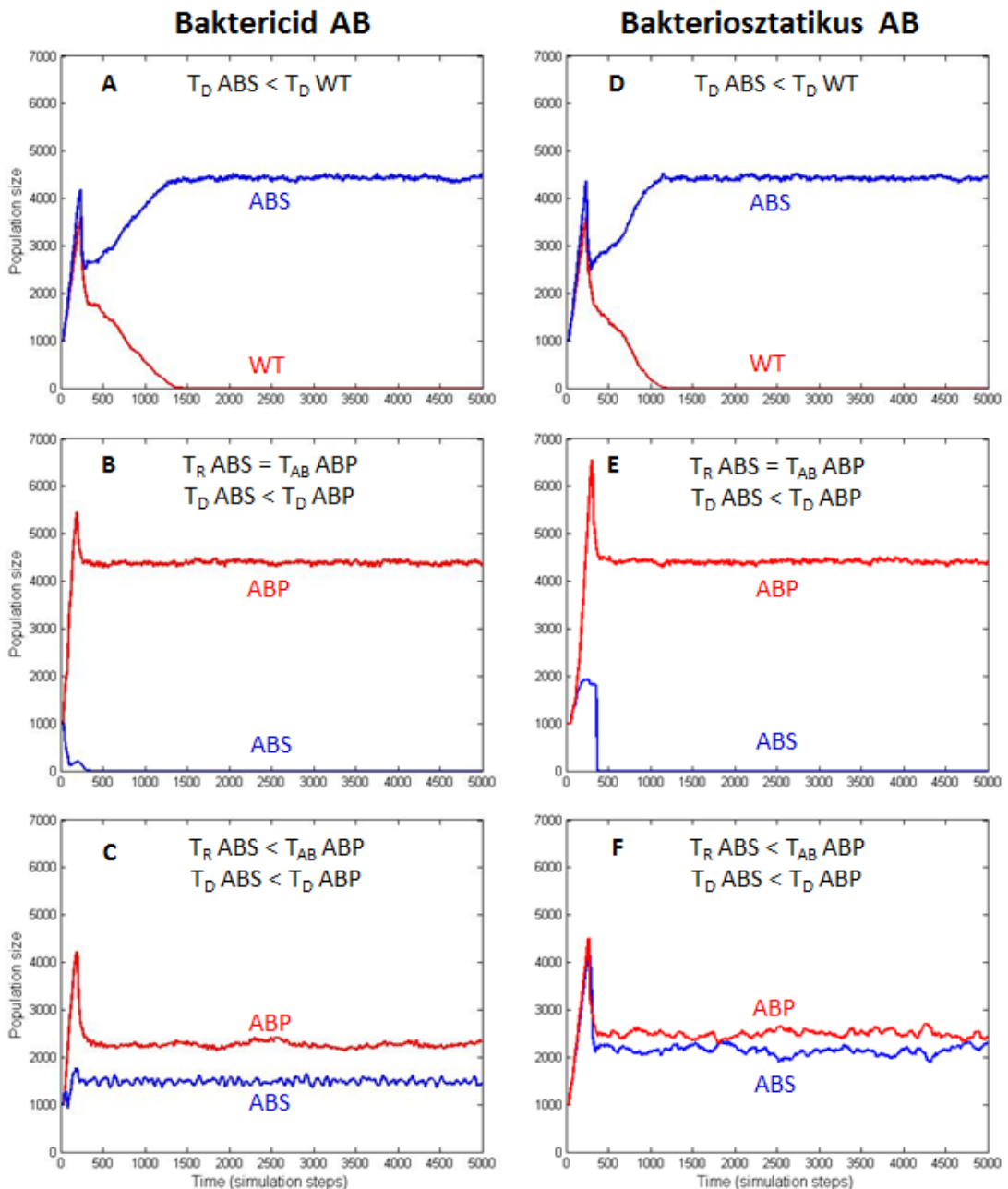
5.4.2. Az antibiotikum termelés hatása és típusai

A vizsgált rendszerben mindkét faj ugyanazt a QS faktort (F) termeli és érzékeli, tehát a sejtek képesek kooperálni, de közvetlenül kommunikálni nem, mivel a szignáljaik különböznek (S1, S2). Az AB termelő faj egyedei viszont érzékelik, „lehallgatják” a másik szignálját, és ha ez meghalad egy bizonyos koncentrációt, elkezdnek AB-t termelni ellene (5.12. ábra). Az AB pedig bizonyos koncentráció (természetes tolerancia) felett valamilyen hátrányt okoz a rá érzékeny fajnak. (Az AB termelés energiaszükséglete a bemutatott szimulációkban a jeltermelés energiaszükségletével egyenlő, tehát nem jelent komoly metabolikus terhet.) Kétféle hátrányt, AB hatásmechanizmust implementáltam a modellben. Az egyikben az ABS sejt AB jelenlétében csak extra energia befektetésével képes életben maradni, tehát energetikai hátrányba kerül a termelővel szemben. Ez a hátrány a bemutatott szimulációkban jelentős, tehát az ABS sejtek gyors halálához vezet (baktericid hatás). A másik esetben az AB hatására az ABS sejt visszalép alapállapotba, és nem képes tovább rajzani (bakteriosztatikus hatás), ez felfogható úgy, hogy az antibiotikum blokkolja a QS-t. A használt sejtípusok paramétereit az F.8-F11. táblázatok foglalják össze.



5.12. ábra: Különböző szignálokat (S1, S2), azonos faktort (F) és antibiotikum (AB) termelést magában foglaló rendszer szabályozásának vázlata.

Az 5.13. ábrán látható kísérletekben az ABS sejtek kis fitness előnyben voltak az AB-t termelőkkel szemben (alacsonyabb volt az osztódási küszöbük). Ekkor, mint várható volt AB termelés nélkül ki is szorították a másik fajt (5.13.A és D ábrák). Az azonban AB termeléssel képes volt védekezni ez ellen, gátolni tudta a másik faj terjedését és így más folyamatok játszódhattak le. Amennyiben az AB termelés beindításának küszöbértéke (T_{AB}) megegyezett az ABS faj rajzási küszöbével (T_R) (az ABS szignálját érzékeli az ABP), akkor az ABS faj egyáltalán nem tudott aktív állapotba lépni és hamarosan kipusztult (5.13.B és E ábrák). Azonban, ha az AB termelés csak magasabb S2 jelszintnél indult be, akkor mindkét sejt tartósan fennmaradhatott a közösségben, mivel az ABP „önmérséklete”, moderált viselkedése révén engedte rajzani az ABS-t is (alacsonyabb szignálszintek mellett) (5.13.C és F ábrák). A kísérletek paramétereit az 5.6. táblázat foglalja össze.



5.13. ábra: ABS (kék) és ABP (piros) fajok versengése. A,B,C: baktericid antibiotikum hatás; D,E,F: bakteriosztatikus antibiotikum hatás. A,D: nincs AB termelés, a fittebb (alacsonyabb osztódási küszöbű) ABS kiszorítja a WT-t; B,D: az ABP AB termelése olyan koncentrációnál kezdődik, amikor az ABS rajzása ($T_{R\text{ABS}}=T_{AB\text{ABP}}$), az ABS kipusztul; C,F: az ABS magasabb koncentrációnál kezd AB-t termelni, mint, ahogy az ABP rajzani kezd ($T_{R\text{ABS}}<T_{AB\text{ABP}}$), a két faj képes stabilan együttélni. Az ábrák az egyes közösségek egyedszámát mutatják a szimulációs lépések függvényében. A szimulációk 5000 lépésig futottak és a kiindulási populáció 1000-1000 sejt volt mindkét sejtípusból.

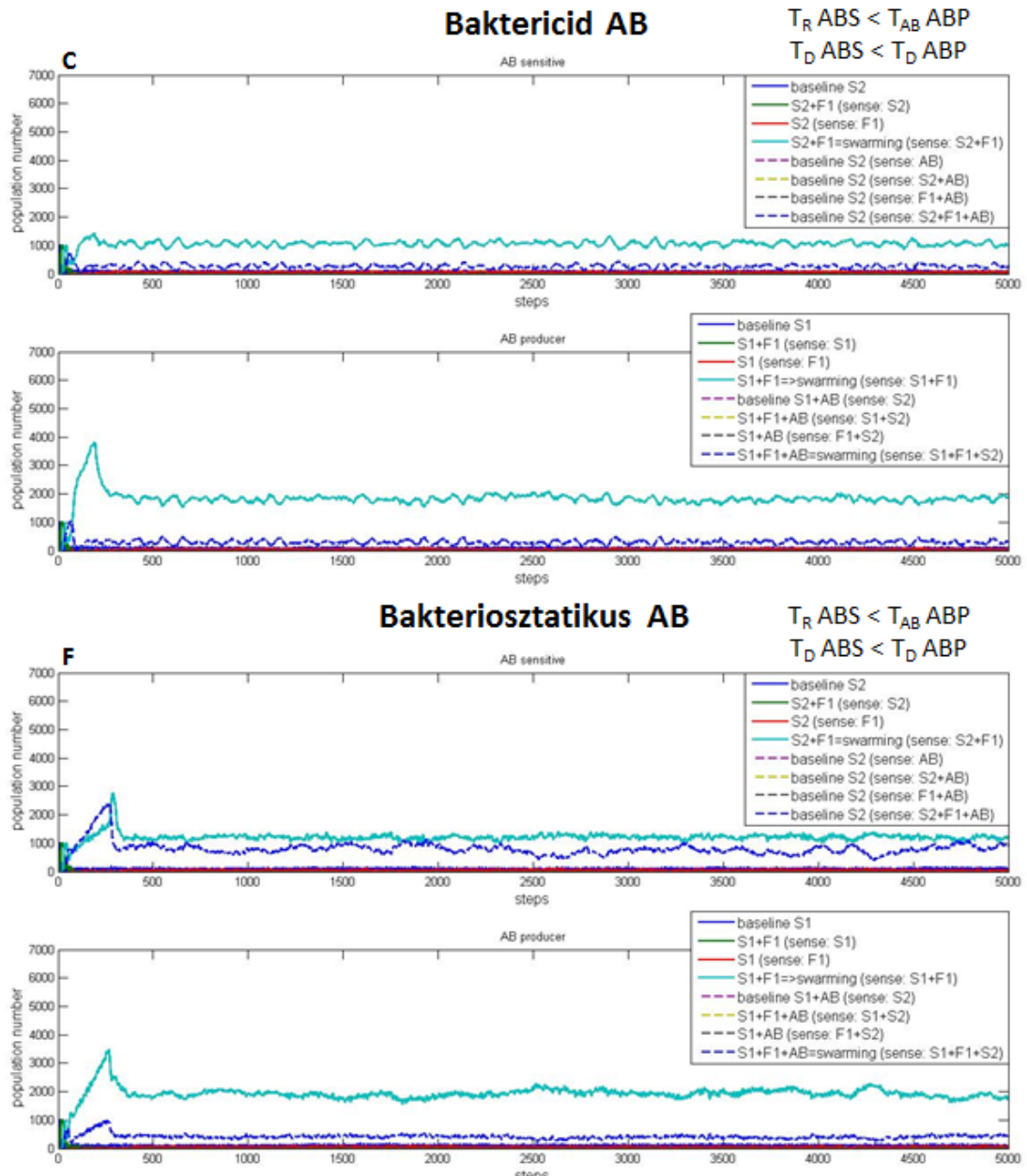
5.6. táblázat: Antibiotikum termelési és osztódási küszöbök az antibiotikum hatásának vizsgálatához.

Sejt modell	Osztódási küszöb (T_D)	AB termelési küszöb (T_{AB})	Válasz küszöb (T_R)
Alap modell, WT (piros 5.13.A,D ábrák)	12	-	-
Antibiotikum érzékeny modell (kék 5.13. ábra)			
ABS	11	-	10
Baktericid antibiotikum termelő modell, ABP (piros 5.13.B,C ábrák)			
$T_{AB}=T_R$	12	10	-
$T_{AB}>T_R$	12	30	-
Bakteriosztatikus antibiotikum termelő modell, ABP (piros 5.13.E,F ábrák)			
$T_{AB}=T_R$	12	10	-
$T_{AB}>T_R$	12	30	-

A kétféle antibiotikum hatásmechanizmus alkalmazásakor azonban másként szorítja ki az ABP az ABS fajt és másként alakul ki az együttélés is köztük. Baktericid esetben önmérséklet nélkül (5.13.B ábra) az AB termelő azonnal elpusztítja az AB érzékeny fajt, moderált AB termeléskor pedig stabil arány alakul ki a két sejtípus között (5.13.C ábra). Ha azt vizsgáljuk, hogy az egyes fajok egyedei milyen metabolikus állapotban vannak a szimuláció során (5.14.C ábra), akkor látszik, hogy a sejtek többsége mindkét fajban rajzó állapotú és mindig csak kevés sejt érintett az AB termelésben (kevés az AB termelő, és a hatást elszenvedő is). Ezt támasztják alá a kialakuló koncentráció gradiensek is (F.6.C ábra). Ennek hátterében az áll, hogy az AB hatását csak nagyon rövid ideig képesek tolerálni az ABS sejtek, így koncentrációjuk (ami jelanyaguk koncentrációján keresztül nyilvánul meg), ha meghaladja az AB termelés küszöbértéket, gyorsan visszaesik a küszöb alá, kisebb mennyiségű AB hatására is. Az ABS koncentráció csökkenésével pedig leáll az AB termelés is. Ez okozza az ABS sejtszám finom, de folyamatos fluktuációját egy egyensúlyi érték körül a szimuláció során. Az ABP faj tehát gyorsan, finoman (kis AB termeléssel célzottan az ABS feldúsulások helyén), és hatékonyan képes az ABS fajt egy adott szinten tartani.

A bakteriosztatikus hatás az előzővel szemben csak az ABS sejtek rajzását blokkolja, visszaveti őket alapállapotba, ahol lassabban mozognak, nem vesznek részt a QS-ben, de ezért kevesebb energiát is fogyasztanak, így tápanyagszegény környezetben tovább életben maradhatnak, kellő tápanyagforrás esetén pedig gyorsabban is osztódhatnak rajzó társaiknál növelve ezzel koncentrációjukat. Az 5.13.E ábrán is látható, hogy amíg van tápanyag, életben maradnak AB hatása alatt is. Stabil együttélés esetén pedig a közösségben tartósan jelen van az antibiotikum (F.6.F ábra) és az ennek kitett sejtek mennyisége is számottevő (5.14.F ábra). Az AB itt tehát egy „puhább”, kevésbé drasztikus, de folyamatos hatást fejt ki, ami mellett az ABS populáció egy része tartós gátlásban, de esetleges hasznos metabolikus funkcióit a közösség

javára ellátva él. Nem tudja azonban kiszorítani az ABP-t, mert amikor elől elszaporodik, az ott beinduló AB termelés lelassítja és így háttérbe kényszerül a rajzási frontról.



5.14. ábra: Az 5.13.C és F ábrák sejtszámai sejt állapotoként a szimulációk során. C: baktericid AB hatás; F: bakteriosztatikus hatás. A fenti ábrák az ABS; lentiek az ABP sejtek állapot szerinti eloszlását mutatják; a ciánkék vonalak az AB termelésben és a rá adott válaszban nem érintett sejteket; a sötétkék szaggatott vonalak pedig az AB-t termelő és az AB által befolyásolt sejteket jelölik (a többi állapot mennyisége nem jelentős). A szimulációk 5000 lépésig futottak és a kiindulási populáció 1000-1000 sejt volt mindkét sejttípusból.

Kétféle antibiotikum hatásmechanizmussal is megmutattam tehát, hogy modellünkben a válaszküszöbök révén megvalósuló önmérséklet képes kompenzálni az AB termelés jelentette előnyt olyan azonos tápanyagforráson versengő, de közös faktort használó (kooperálásra is

képes) fajok esetén. Ezen eredmények alapján megállapítható tehát, hogy a QS modellben antibiotikumok (negatív, gátló kölcsönhatások) jelenlétében, amint az a természetes mikrobiális közösségekben is megfigyelhető, lehetséges tartós együttélés különböző sejttípusok között, ha kialakulhatnak olyan körülmények, ahol növekedhet az AB érzékeny sejt is.

6. Összefoglalás

6.1. Új tudományos 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 összeszokott diverz mikrobiom meg tudja védeni magát még az egyes tagjainál jóval erősebb külső betolakodókkal szemben is, míg egy nem összeszokott (naiv) közösség tagjait nagyszámú, náluk erősebb monoklonális támadó-csoport képes kiszorítani, (4.8. ábra). Ennek hátterében az áll, hogy gyakorlatilag kizárt, hogy egy a közösségen kívülről érkezett betolakodó *ab ovo* rezisztens legyen a közösségben jelen lévő összes AM-ra. Ez egyébként 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 (4.9. ábra).

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 (5.5. és 5.6. ábrák). Ennek oka, hogy míg az első esetben az alacsonyabb küszöb értékek egyértelműen szelektációs 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.

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 realisabb, a természetes közösségekben megfigyeltekre jobban hasonlító együttműködési formát írtam le.

Kapcsolódó publikációk: [J2], [C1]

Ebben az elrendezésben 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 (5.9. ábra). 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 hasznosítja 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.

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 másikkal.

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 (5.13. 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.

6.2. Az eredmények alkalmazási 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 kizorításuk 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 antibiotikus 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 célspecifikus 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 előállítás).

Eredményeim reményeim szerint hozzájárulnak ezen tudományos területek kibontakozásához és széles körben hasznosítható biotechnológiai alkalmazások megvalósulásához.

A szerző publikációi

- [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.

Irodalomjegyzék

- [1] R. F. A. Moritz and H. Bürgin, “Group Response to Alarm Pheromones in Social Wasps and the Honeybee,” *Ethology*, vol. 76, no. 1, pp. 15–26, Apr. 2010.
- [2] F. Huntingford, “Animal Contests | Animal Contests, Ian C.W. Hardy, Mark Briffa (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge (2013), Pp. 379. Price £45 hardback,” *Anim. Behav.*, vol. 86, no. 5, pp. 1108–1110, Nov. 2013.
- [3] I. Giardina, “Collective behavior in animal groups: Theoretical models and empirical studies,” *HFSP J.*, vol. 2, no. 4, pp. 205–219, 2008.
- [4] K. Kawasaki, A. Mochizuki, M. Matsushita, T. Umeda, and N. Shigesada, “Modeling spatio-temporal patterns generated by *Bacillus subtilis*,” *J Theor Biol*, vol. 188, pp. 177–185, 1997.
- [5] C. Picioreanu, J.-U. Kreft, and M. C. M. Van Loosdrecht, “Particle-based multidimensional multispecies biofilm model,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 5, pp. 3024–40, May 2004.
- [6] P. Atkins and J. de Paula, *Atkins’ Physical Chemistry*, 8th ed. Oxford University Press, 2006.
- [7] C. W. Reynolds, “Flocks, herds and schools: a distributed behavioral model,” *Computer Graphics*, vol. 21. ACM, pp. 25–34, 1987.
- [8] C. M. Macal and M. J. North, “Tutorial on agent-based modelling and simulation,” *J. Simul.*, vol. 4, no. 3, pp. 151–162, Sep. 2010.
- [9] N. R. Jennings, “On agent-based software engineering,” *Artif. Intell.*, vol. 117, no. 2, pp. 277–296, Mar. 2000.
- [10] M. Chamanbaz, D. Mateo, B. M. Zoss, G. Tokić, E. Wilhelm, R. Bouffanais, and D. K. P. Yue, “Swarm-Enabling Technology for Multi-Robot Systems,” *Front. Robot. AI*, vol. 4, p. 12, Apr. 2017.
- [11] J. Von Neumann and O. Morgenstern, *Theory of games and economic behavior*. Princeton University Press, 2007.
- [12] M. Gardner, “Mathematical Games,” *Sci. Am.*, vol. 223, no. 4, pp. 120–123, Oct. 1970.
- [13] “Behavioral Animation.” [Online]. Available: <https://www.red3d.com/cwr/behave.html>. [Accessed: 11-Mar-2019].
- [14] E. Ben-Jacob, O. Schochet, A. Tenenbaum, I. Cohen, A. Czirók, and T. Vicsek, “Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies,” *Nature*, vol. 368, no. 6466, pp. 46–9, Mar. 1994.
- [15] W. C. Fuqua, S. C. Winans, and E. P. Greenberg, “Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators,” *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 2, pp. 269–75, Jan. 1994.
- [16] S. Netotea, I. Bertani, L. Steindler, V. Venturi, S. Pongor, and A. Kerenyi, “A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an ‘activation zone,’” *Biol Direct*, vol. 4, p. 6, 2008.
- [17] V. Venturi, I. Bertani, A. Kerenyi, S. Netotea, and S. Pongor, “Co-swarming and local collapse: quorum sensing conveys resilience to bacterial communities by localizing cheater mutants in *Pseudomonas aeruginosa*,” *PLoS One*, vol. 5, p. e9998, 2010.
- [18] Á. Kerényi, D. Bihary, V. Venturi, and S. Pongor, “Stability of Multispecies Bacterial Communities: Signaling Networks May Stabilize Microbiomes,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e57947, Mar. 2013.
- [19] E. Abatenh, B. Gizaw, Z. Tsegaye, and G. Tefera, “Microbial Function on Climate Change - A Review,” *Environ. Pollut. Clim. Chang.*, vol. 02, no. 01, 2018.
- [20] I. Cho and M. J. Blaser, “The human microbiome: at the interface of health and disease,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 260–70, Mar. 2012.
- [21] F. Guarner and J.-R. Malagelada, “Gut flora in health and disease,” *Lancet*, vol. 361, no. 9356, pp. 512–519, Feb. 2003.
- [22] G. C. Actis, “The gut microbiome,” *Inflamm. Allergy Drug Targets*, vol. 13, no. 4, pp. 217–23, 2014.
- [23] A. B. Shreiner, J. Y. Kao, and V. B. Young, “The gut microbiome in health and in disease,” *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 31, no. 1, pp. 69–75, Jan. 2015.

- [24] F. Bäckhed, C. M. Fraser, Y. Ringel, M. E. Sanders, R. B. Sartor, P. M. Sherman, J. Versalovic, V. Young, and B. B. Finlay, “Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications.,” *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 5, pp. 611–22, Nov. 2012.
- [25] P. H. Rampelotto, “Extremophiles and extreme environments.,” *Life (Basel, Switzerland)*, vol. 3, no. 3, pp. 482–5, Aug. 2013.
- [26] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, “Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body.,” *PLoS Biol.*, vol. 14, no. 8, p. e1002533, Aug. 2016.
- [27] S. Mondot, T. de Wouters, J. Doré, and P. Lepage, “The Human Gut Microbiome and Its Dysfunctions,” *Dig. Dis.*, vol. 31, no. 3–4, pp. 278–285, 2013.
- [28] E. F. Smith and E. F. Smith, *Bacteria in relation to plant diseases*, by Erwin F. Smith. Washington, D.C. : Carnegie institution of Washington, 1905.
- [29] A. Ross-Gillespie and R. Kümmerli, “Collective decision-making in microbes.,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, p. 54, 2014.
- [30] C. D. Nadell, K. Drescher, and K. R. Foster, “Spatial structure, cooperation and competition in biofilms,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 9, pp. 589–600, Sep. 2016.
- [31] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.,” *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–22, May 1999.
- [32] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton, “Biofilms as Complex Differentiated Communities,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 187–209, Oct. 2002.
- [33] W. van Schaik, “The human gut resistome.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1670, p. 20140087, Jun. 2015.
- [34] S. Sukumar, A. P. Roberts, F. E. Martin, and C. J. Adler, “Metagenomic Insights into Transferable Antibiotic Resistance in Oral Bacteria,” *J. Dent. Res.*, vol. 95, no. 9, pp. 969–976, Aug. 2016.
- [35] E. Harrison and M. A. Brockhurst, “Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process,” *Trends Microbiol.*, vol. 20, no. 6, pp. 262–267, Jun. 2012.
- [36] D. A. I. Mavridou, D. Gonzalez, W. Kim, S. A. West, and K. R. Foster, “Bacteria Use Collective Behavior to Generate Diverse Combat Strategies,” *Curr. Biol.*, vol. 28, no. 3, pp. 345–355.e4, Feb. 2018.
- [37] J. N. Wilking, V. Zaboradaev, M. De Volder, R. Losick, M. P. Brenner, and D. A. Weitz, “Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 3, pp. 848–52, Jan. 2013.
- [38] G. P. Dubey and S. Ben-Yehuda, “Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication,” *Cell*, vol. 144, no. 4, pp. 590–600, Feb. 2011.
- [39] A. K. Baidya, S. Bhattacharya, G. P. Dubey, G. Mamou, and S. Ben-Yehuda, “Bacterial nanotubes: a conduit for intercellular molecular trade,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 42, pp. 1–6, Apr. 2018.
- [40] G. P. Dubey, G. B. Malli Mohan, A. Dubrovsky, T. Amen, S. Tsipshtein, A. Rouvinski, A. Rosenberg, D. Kaganovich, E. Sherman, O. Medalia, and S. Ben-Yehuda, “Architecture and Characteristics of Bacterial Nanotubes,” *Dev. Cell*, vol. 36, no. 4, pp. 453–461, Feb. 2016.
- [41] M. Eisenbach, “Bacterial Chemotaxis,” in *eLS*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
- [42] S. de Oliveira, E. E. Rosowski, and A. Huttenlocher, “Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 6, pp. 378–91, 2016.
- [43] D. Dormann and C. J. Weijer, “Chemotactic cell movement during development.,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 13, no. 4, pp. 358–64, Aug. 2003.
- [44] J. Adler, “Chemotaxis in bacteria.,” *Science*, vol. 153, no. 3737, pp. 708–16, Aug. 1966.
- [45] M. P. Francino, *Horizontal gene transfer in microorganisms*. Caister Academic Press, 2012.
- [46] V. J. FREEMAN, “Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*.,” *J. Bacteriol.*, vol. 61, no. 6, pp. 675–88, Jun. 1951.
- [47] Ochiai, T. Yamanaka, K. Kimura, and O. Sawada, “Inheritance of drug resistance (and its transfer) between *Shigella* strains and between *Shigella* and *E. coli* strains (in Japanese).,” *Hihon Iji Shimpou*, vol. 1861, 1959.
- [48] W. K. Purves et al., *Life, the Science of Biology*. W. H. Freeman and Company, 2007.
- [49] C. M. Thomas and K. M. Nielsen, “Mechanisms of and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 9, pp. 711–721, Sep. 2005.

- [50] M. Kowarsky, J. Camunas-Soler, M. Kertesz, I. De Vlaminck, W. Koh, W. Pan, L. Martin, N. F. Neff, J. Okamoto, R. J. Wong, S. Kharbanda, Y. El-Sayed, Y. Blumenfeld, D. K. Stevenson, G. M. Shaw, N. D. Wolfe, and S. R. Quake, “Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 36, pp. 9623–9628, Sep. 2017.
- [51] M. R. Clokie, A. D. Millard, A. V Letarov, and S. Heaphy, “Phages in nature.,” *Bacteriophage*, vol. 1, no. 1, pp. 31–45, Jan. 2011.
- [52] K. Todar, *Online Textbook of Bacteriology*. 2008.
- [53] J. W. Little, “Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion,” in *Phages*, American Society of Microbiology, 2005, pp. 37–54.
- [54] K. Willi, H. Sandmeier, E. M. Kulik, and J. Meyer, “Transduction of antibiotic resistance markers among *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains by temperate bacteriophages Aa phi 23.,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 53, no. 11–12, pp. 904–10, Dec. 1997.
- [55] N. J. Bitto, R. Chapman, S. Pidot, A. Costin, C. Lo, J. Choi, T. D’Cruze, E. C. Reynolds, S. G. Dashper, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, T. P. Stinear, K. J. Stacey, and R. L. Ferrero, “Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7072, Aug. 2017.
- [56] S. Yaron, G. L. Kolling, L. Simon, and K. R. Matthews, “Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 10, pp. 4414–20, Oct. 2000.
- [57] E. S. Gloag, L. Turnbull, A. Huang, P. Vallotton, H. Wang, L. M. Nolan, L. Mililli, C. Hunt, J. Lu, S. R. Osvath, L. G. Monahan, R. Cavaliere, I. G. Charles, M. P. Wand, M. L. Gee, R. Prabhakar, and C. B. Whitchurch, “Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 28, pp. 11541–11546, Jul. 2013.
- [58] M. KASUYA, “TRANSFER OF DRUG RESISTANCE BETWEEN ENTERIC BACTERIA INDUCED IN THE MOUSE INTESTINE.,” *J. Bacteriol.*, vol. 88, no. 2, pp. 322–8, Aug. 1964.
- [59] J. Wiedenbeck and F. M. Cohan, “Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches.,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 35, no. 5, pp. 957–76, Sep. 2011.
- [60] E. V Koonin and Y. I. Wolf, “Evolution of microbes and viruses: a paradigm shift in evolutionary biology?,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 2, no. September, p. 119, Jan. 2012.
- [61] C. S. Smillie, M. B. Smith, J. Friedman, O. X. Cordero, L. A. David, and E. J. Alm, “Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome,” *Nature*, vol. 480, no. 7376, pp. 241–244, 2011.
- [62] E. V Koonin, K. S. Makarova, and L. Aravind, “Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification.,” *Annu Rev Microbiol.*, vol. 55, pp. 709–742, 2001.
- [63] L. Liu, X. Chen, G. Skogerbo, P. Zhang, and R. Chen, “The human microbiome: a hot spot of microbial horizontal gene transfer.,” *Genomics*, vol. 100, pp. 265–270, 2012.
- [64] A. P. Roberts, J. Kreth, A. Mira, and N. S. Jakubovics, “The impact of horizontal gene transfer on the adaptive ability of the human oral microbiome,” 2014.
- [65] H. Dang and C. R. Lovell, “Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments.,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 1, pp. 91–138, Mar. 2016.
- [66] T. Akiba, K. Koyama, Y. Ishiki, S. Kimura, and T. Fukushima, “On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*.,” *Jpn J Microbiol.*, vol. 4, pp. 219–227, 1960.
- [67] J. O’neill, “TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE,” 2016.
- [68] H. Jeong, S. Sung, T. Kwon, M. Seo, K. Caetano-Anollés, S. H. Choi, S. Cho, A. Nasir, and H. Kim, “HGTtree: database of horizontally transferred genes determined by tree reconciliation.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D610–9, Jan. 2016.
- [69] T. W. Schoener, “The newest synthesis: understanding the interplay of evolutionary and ecological dynamics.,” *Science*, vol. 331, pp. 426–429, Jan. 2011.
- [70] J. N. Thompson, “The coevolving web of life.,” *Am. Nat.*, vol. 173, no. 2, pp. 125–140, 2009.
- [71] J. N. Thompson, *The Geographic Mosaic of Coevolution*. Chicago, IL.: University of Chicago Press, 2005.
- [72] E. B. Thompson and R. A. Bradshaw, “Overview of Cell–Cell and Cell–Matrix Interactions,” in *Handbook of Cell Signaling*, Elsevier, 2010, pp. 2591–2592.

- [73] A. Tomasz and S. M. Beiser, "Relationship between the competence antigen and the competence-activator substance in pneumococci.," *J. Bacteriol.*, vol. 90, no. 5, pp. 1226–32, Nov. 1965.
- [74] K. H. Nealson, T. Platt, and J. W. Hastings, "Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system.," *J. Bacteriol.*, vol. 104, no. 1, pp. 313–22, Oct. 1970.
- [75] V. Venturi, G. Rampioni, S. Pongor, and L. Leoni, "The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*," *Mol. Microbiol.*, vol. 82, no. 5, pp. 1060–1070, Dec. 2011.
- [76] C. M. Waters and B. L. Bassler, "QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 319–346, Nov. 2005.
- [77] P. Williams, K. Winzer, W. C. Chan, and M. Camara, "Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1483, pp. 1119–1134, 2007.
- [78] S. Elias and E. Banin, "Multi-species biofilms: living with friendly neighbors," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, no. 5, pp. 990–1004, Sep. 2012.
- [79] O. Rendueles and J.-M. Ghigo, "Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, no. 5, pp. 972–989, Sep. 2012.
- [80] B. L. Bassler, "Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria," *Cell*, vol. 109, pp. 421–4., 2002.
- [81] L. Steindler, I. Bertani, L. De Sordi, S. Schwager, L. Eberl, and V. Venturi, "LasI/R and RhlI/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, pp. 5131–5140, 2009.
- [82] J. Lee and L. Zhang, "The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*," *Protein Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 26–41, Jan. 2015.
- [83] Z. Gelencsér, B. Galbáts, J. F. Gonzalez, K. S. Choudhary, S. Hudaiberdiev, V. Venturi, and S. Pongor, "Chromosomal arrangement of AHL-driven quorum sensing circuits in *Pseudomonas*," *ISRN Microbiol.*, vol. 2012, p. 6, 2012.
- [84] V. Venturi, C. Wang, L. Zhang, P. Williams, L. Pierson, M. Camara, A. Hamood, and A. Filloux, "Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 274–291, Mar. 2006.
- [85] J. H. Lee, Y. Lequette, and E. P. Greenberg, "Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor," *Mol. Microbiol.*, vol. 59, pp. 602–609, 2006.
- [86] R. S. Reis, A. G. Pereira, B. C. Neves, and D. M. G. Freire, "Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 11, pp. 6377–6384, Jun. 2011.
- [87] V. Dekimpe and E. Deziel, "Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors," *Microbiology*, vol. 155, no. 3, pp. 712–723, Mar. 2009.
- [88] J. Lee, J. Wu, Y. Deng, J. Wang, C. Wang, J. Wang, C. Chang, Y. Dong, P. Williams, and L.-H. Zhang, "A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 339–343, May 2013.
- [89] S. T. Rutherford and B. L. Bassler, "Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 11, pp. a012427–a012427, Nov. 2012.
- [90] L. A. Hawver, S. A. Jung, and W. L. Ng, "Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 40, no. 5, pp. 738–752, 2016.
- [91] E. Takano, "g-Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, pp. 287–294, 2006.
- [92] Y.-L. Du, X.-L. Shen, P. Yu, L.-Q. Bai, and Y.-Q. Li, "Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 23, pp. 8415–26, Dec. 2011.
- [93] C. M. Waters and B. L. Bassler, "The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 19, pp. 2754–2767, Oct. 2006.
- [94] F. Rezzonico, T. H. M. Smits, and B. Duffy, "Detection of AI-2 Receptors in Genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosystems," *Sensors*, vol. 12, no. 5, pp. 6645–6665, May 2012.
- [95] S. C. Winans, "Bacterial Esperanto," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 83–84, Feb. 2002.

- [96] A. Vendeville, K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang, and K. R. Hardie, "Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LUXS and pathogenic bacteria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 5, pp. 383–396, May 2005.
- [97] M. J. Federle, "Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling," *Contrib. Microbiol.*, vol. 16, pp. 18–32, 2009.
- [98] K. Holmes, T. J. Tavender, K. Winzer, J. M. Wells, and K. R. Hardie, "AI-2 does not function as a quorum sensing molecule in *Campylobacter jejuni* during exponential growth in vitro," *BMC Microbiol.*, vol. 9, no. 1, p. 214, Oct. 2009.
- [99] M. Whiteley and P. Stephen, "Review quorum sensing research," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 551, no. 7680, pp. 313–320, 2017.
- [100] C. Fuqua and E. P. Greenberg, "Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 685–695, Sep. 2002.
- [101] A. M. Lazdunski, I. Ventre, and J. N. Sturgis, "Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 7, pp. 581–592, Jul. 2004.
- [102] M. E. A. Churchill and L. Chen, "Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling.," *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 1, pp. 68–85, Jan. 2011.
- [103] E. Papaioannou, P. D. Utari, and W. J. Quax, "Choosing an appropriate infection model to study quorum sensing inhibition in *Pseudomonas* infections.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 19309–40, Sep. 2013.
- [104] J. Hodgkinson, S. D. Bowden, W. R. J. D. Galloway, D. R. Spring, and M. Welch, "Structure-activity analysis of the *Pseudomonas* quinolone signal molecule.," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 14, pp. 3833–7, Jul. 2010.
- [105] S. P. Diggle, S. Matthijs, V. J. Wright, M. P. Fletcher, S. R. Chhabra, I. L. Lamont, X. Kong, R. C. Hider, P. Cornelis, M. Cámara, and P. Williams, "The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment," *Chem. Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2007.
- [106] E. Arslan, "Quantification and comparison of quorum sensing response to various quinolone molecules in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*," 2012.
- [107] A. Chapalain, M.-C. Groleau, S. Le Guillouzer, A. Miomandre, L. Vial, S. Milot, and E. Déziel, "Interplay between 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinoline and N-Acyl-Homoserine Lactone Signaling in a *Burkholderia cepacia* Complex Clinical Strain.," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 1021, 2017.
- [108] S. Sun, L. Zhou, K. Jin, H. Jiang, and Y.-W. He, "Quorum sensing systems differentially regulate the production of phenazine-1-carboxylic acid in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 30352, Sep. 2016.
- [109] A. B. Flavier, S. J. Clough, M. A. Schell, and T. P. Denny, "Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*," *Mol. Microbiol.*, vol. 26, no. 2, pp. 251–9, Oct. 1997.
- [110] K. Kai, H. Ohnishi, M. Shimatani, S. Ishikawa, Y. Mori, A. Kiba, K. Ohnishi, M. Tabuchi, and Y. Hikichi, "Methyl 3-Hydroxymyristate, a Diffusible Signal Mediating *phc* Quorum Sensing in *Ralstonia solanacearum*," *ChemBioChem*, vol. 16, no. 16, pp. 2309–2318, Nov. 2015.
- [111] Y. Hikichi, Y. Mori, S. Ishikawa, K. Hayashi, K. Ohnishi, A. Kiba, and K. Kai, "Regulation Involved in Colonization of Intercellular Spaces of Host Plants in *Ralstonia solanacearum*," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, p. 967, 2017.
- [112] A. O. Brachmann, S. Brameyer, D. Kresovic, I. Hitkova, Y. Kopp, C. Manske, K. Schubert, H. B. Bode, and R. Heermann, "Pyrones as bacterial signaling molecules," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 573–581, 2013.
- [113] S. Brameyer, H. B. Bode, and R. Heermann, "Languages and dialects: Bacterial communication beyond homoserine lactones," *Trends Microbiol.*, vol. 23, no. 9, pp. 521–523, 2015.
- [114] A. Tiaden and H. Hilbi, " α -Hydroxyketone Synthesis and Sensing by *Legionella* and *Vibrio*," *Sensors*, vol. 12, no. 3, pp. 2899–2919, Mar. 2012.
- [115] U. Schell, S. Simon, T. Sahr, D. Hager, M. F. Albers, A. Kessler, F. Fahrnbauer, D. Trauner, C. Hedberg, C. Buchrieser, and H. Hilbi, "The α -hydroxyketone LAI-1 regulates motility, Lqs-dependent phosphorylation signalling and gene expression of *Legionella pneumophila*," *Mol. Microbiol.*, vol. 99, no. 4, pp. 778–793, Feb. 2016.
- [116] R. Hochstrasser and H. Hilbi, "Intra-Species and Inter-Kingdom Signaling of *Legionella pneumophila*," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 79, Feb. 2017.

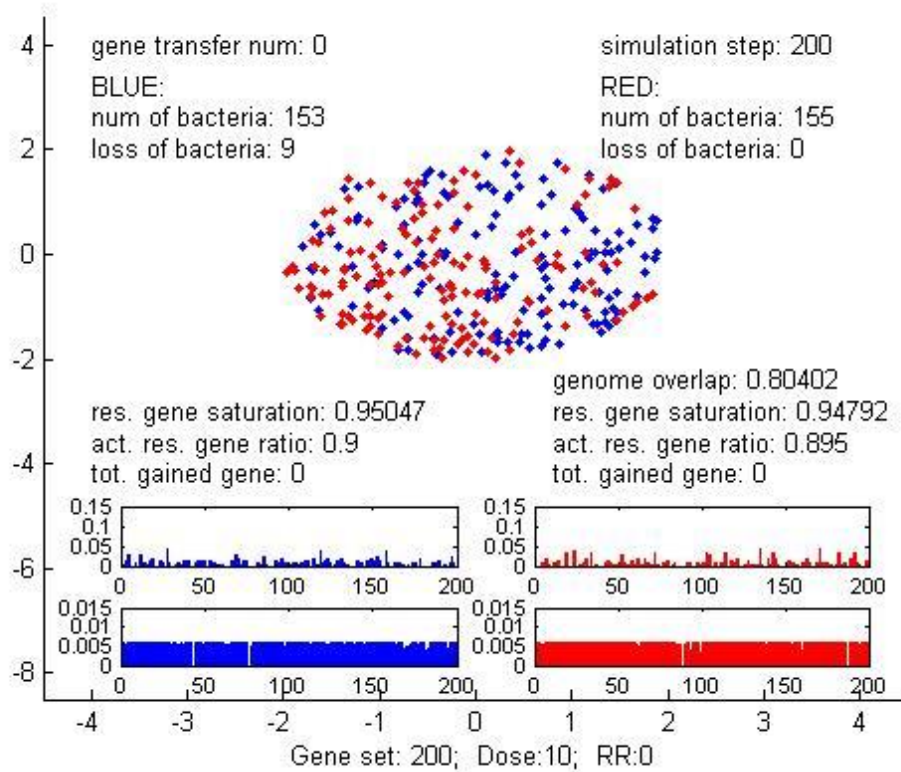
- [117] L. Zhou, L.-H. Zhang, M. Cámara, and Y.-W. He, “The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover.,” *Trends Microbiol.*, vol. 25, no. 4, pp. 293–303, Apr. 2017.
- [118] Y. Guo, Y. Zhang, J.-L. Li, and N. Wang, “Diffusible Signal Factor-Mediated Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*,” *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 25, no. 2, pp. 165–179, Feb. 2012.
- [119] A. Suppiger, A. K. Eshwar, R. Stephan, V. Kaefer, L. Eberl, and A. Lehner, “The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 18753, Jan. 2016.
- [120] A. Rahmani-Badi, S. Sepehr, H. Fallahi, and S. Heidari-Keshel, “Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique.,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, p. 383, 2015.
- [121] M. B. Clarke and V. Sperandio, “Events at the Host-Microbial Interface of the Gastrointestinal Tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on.,” *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, vol. 288, no. 6, pp. G1105–G1109, Jun. 2005.
- [122] M. M. Kendall and V. Sperandio, “Cell-to-Cell Signaling in *Escherichia coli* and *Salmonella*,” *EcoSal Plus*, vol. 6, no. 1, May 2014.
- [123] L. C. Cook and M. J. Federle, “Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 38, no. 3, pp. 473–92, May 2014.
- [124] Y.-H. Li and X. Tian, “Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms.,” *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 3, pp. 2519–38, 2012.
- [125] B. Lasarre, C. Aggarwal, and M. J. Federle, “Antagonistic Rgg regulators mediate quorum sensing via competitive DNA binding in *Streptococcus pyogenes*,” *MBio*, vol. 3, no. 6, Jan. 2013.
- [126] L. Mashburn-Warren, D. A. Morrison, and M. J. Federle, “A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator.,” *Mol. Microbiol.*, vol. 78, no. 3, pp. 589–606, Nov. 2010.
- [127] L. Fontaine, C. Boutry, M. H. de Frahan, B. Delplace, C. Fremaux, P. Horvath, P. Boyaval, and P. Hols, “A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*,” *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 5, pp. 1444–54, Mar. 2010.
- [128] M. Thoendel, J. S. Kavanaugh, C. E. Flack, and A. R. Horswill, “Peptide signaling in the staphylococci.,” *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 1, pp. 117–51, Jan. 2011.
- [129] L. Slamti, S. Perchat, E. Huillet, and D. Lereclus, “Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect.,” *Toxins (Basel)*, vol. 6, no. 8, pp. 2239–55, Jul. 2014.
- [130] S. E. Hoover, A. J. Perez, H.-C. T. Tsui, D. Sinha, D. L. Smiley, R. D. Dimarchi, M. E. Winkler, and B. A. Lazazzera, “A new quorum sensing system (TprA/PhrA) for *Streptococcus pneumoniae* D39 that regulates a lantibiotic biosynthesis gene cluster HHS Public Access,” *Mol Microbiol*, vol. 97, no. 2, pp. 229–243, 2015.
- [131] M. Okada, I. Sato, S. J. Cho, H. Iwata, T. Nishio, D. Dubnau, and Y. Sakagami, “Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX.,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 23–4, Jun. 2005.
- [132] A. Oslizlo, P. Stefanic, S. Vatovec, S. Beigot Glaser, M. Rupnik, and I. Mandic-Mulec, “Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *B. acillus* spp. isolates from tomato rhizosphere,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 527–540, May 2015.
- [133] M. Gobetti, M. De Angelis, R. Di Cagno, F. Minervini, and A. Limitone, “Cell-cell communication in food related bacteria,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 34–45, 2007.
- [134] T. Fujii, C. Ingham, J. Nakayama, M. Beerthuyzen, R. Kunuki, D. Molenaar, M. Sturme, E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. de Vos, “Two homologous Agr-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1.,” *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 23, pp. 7655–65, Dec. 2008.
- [135] F. C. Petersen, G. Fimland, and A. A. Scheie, “Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 61, no. 5, pp. 1322–34, Sep. 2006.
- [136] E. Miller, M. Kjos, M. Abrudan, I. S. Roberts, J.-W. Veening, and D. Rozen, “Crosstalk and eavesdropping among quorum sensing peptide signals that regulate bacteriocin production in *Streptococcus pneumoniae*,” *bioRxiv*, 2017.

- [137] J. C. Jimenez and M. J. Federle, "Quorum sensing in group A Streptococcus," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. September, pp. 1–17, 2014.
- [138] L. E. Q. Michiel Kleerebeezema, "Peptide pheromone dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram positive bacteria : a case of multicellular behavior," *Peptides*, vol. 22, no. 10, pp. 1579–1596, 2001.
- [139] Z. Gelencsér, K. S. Choudhary, B. G. Coutinho, S. Hudaiberdiev, B. Galbáts, V. Venturi, and S. Pongor, "Classifying the topology of AHL-driven quorum sensing circuits in proteobacterial genomes.," *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 5, pp. 5432–44, 2012.
- [140] K. S. Choudhary, S. Hudaiberdiev, Z. Gelencsér, B. Gonçalves Coutinho, V. Venturi, and S. Pongor, "The organization of the quorum sensing luxI/R family genes in Burkholderia.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 7, pp. 13727–47, Jul. 2013.
- [141] I. Dogsa, K. S. Choudhary, Z. Marsetic, S. Hudaiberdiev, R. Vera, S. Pongor, and I. Mandic-Mulec, "ComQXPA quorum sensing systems may not be unique to Bacillus subtilis: a census in prokaryotic genomes.," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96122, 2014.
- [142] K. P. T. Silva, P. Chellamuthu, and J. Q. Boedicker, "Quantifying the strength of quorum sensing crosstalk within microbial communities," *PLOS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 10, p. e1005809, Oct. 2017.
- [143] G. Rampioni, L. Leoni, and P. Williams, "The art of antibacterial warfare: Deception through interference with quorum sensing-mediated communication," *Bioorg. Chem.*, vol. 55, pp. 60–68, Aug. 2014.
- [144] N. Kylilis, Z. A. Tuza, G.-B. Stan, and K. M. Polizzi, "Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 2677, Dec. 2018.
- [145] E. P. Greenberg, "Bacterial communication and group behavior," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 9, pp. 1288–1290, Nov. 2003.
- [146] Y.-H. Dong, L.-H. Wang, J.-L. Xu, H.-B. Zhang, X.-F. Zhang, and L.-H. Zhang, "Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase," *Nature*, vol. 411, no. 6839, pp. 813–817, Jun. 2001.
- [147] M. Elias and D. S. Tawfik, "Divergence and Convergence in Enzyme Evolution: Parallel Evolution of Paraoxonases from Quorum-quenching Lactonases," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2012.
- [148] M. Givskov, R. de Nys, M. Manefield, L. Gram, R. Maximilien, L. Eberl, S. Molin, P. D. Steinberg, and S. Kjelleberg, "Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling.," *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 22, pp. 6618–22, Nov. 1996.
- [149] M. Hentzer, H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J. W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Høiby, and M. Givskov, "Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors.," *EMBO J.*, vol. 22, no. 15, pp. 3803–15, Aug. 2003.
- [150] Q. H. Christensen, T. L. Grove, S. J. Booker, and E. P. Greenberg, "A high-throughput screen for quorum-sensing inhibitors that target acyl-homoserine lactone synthases," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 34, pp. 13815–13820, Aug. 2013.
- [151] M. Starkey, F. Lepine, D. Maura, A. Bandyopadhyaya, B. Lesic, J. He, T. Kitao, V. Righi, S. Milot, A. Tzika, and L. Rahme, "Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt Quorum-Sensing Regulated Acute and Persistent Pathogenicity," *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 8, p. e1004321, Aug. 2014.
- [152] N. Bouayed, N. Dietrich, C. Lafforgue, C.-H. Lee, and C. Guigui, "Process-Oriented Review of Bacterial Quorum Quenching for Membrane Biofouling Mitigation in Membrane Bioreactors (MBRs).," *Membranes (Basel)*, vol. 6, no. 4, Dec. 2016.
- [153] D. Bihary, "A baktériumok quorum érzékelésének ágens alapú modellezése," 2014.
- [154] P. Gerlee and A. R. A. Anderson, "Stability Analysis of a Hybrid Cellular Automaton Model of Cell Colony Growth," May 2007.
- [155] E. Ben-Jacob, I. Cohen, and H. Levine, "Cooperative self-organization of microorganisms," *Adv. Phys.*, vol. 49, pp. 395–554, 2000.
- [156] T. Vicsek and A. Zafeiris, "Collective motion," Oct. 2010.
- [157] D. Helbing, I. Farkas, and T. Vicsek, "Simulating dynamical features of escape panic," *Nature*, vol. 407, no. 6803, pp. 487–490, Sep. 2000.

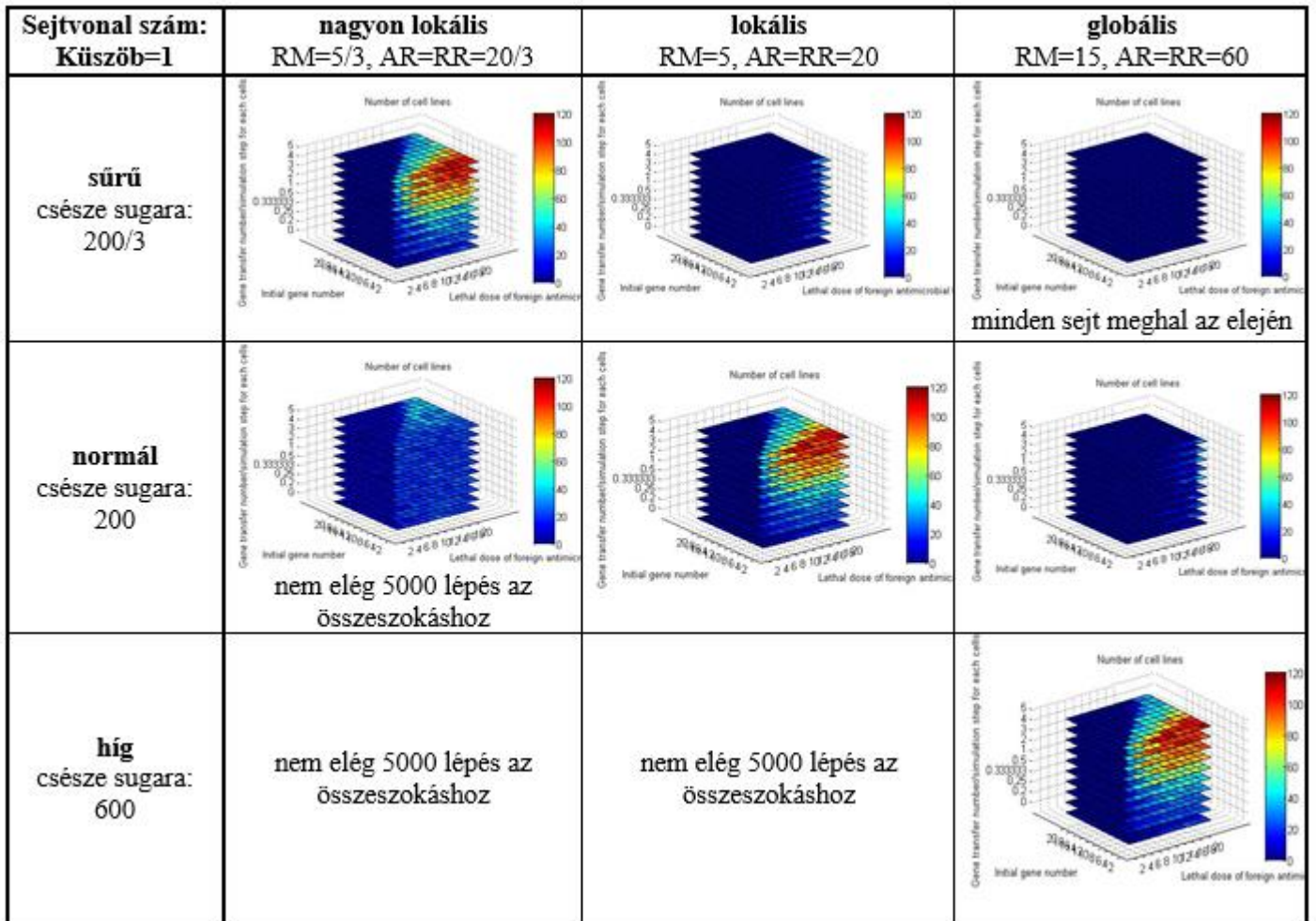
- [158] J. Pitt-Francis, P. Pathmanathan, M. O. Bernabeu, R. Bordas, J. Cooper, A. G. Fletcher, G. R. Mirams, P. Murray, J. M. Osborne, A. Walter, S. J. Chapman, A. Garny, I. M. M. van Leeuwen, P. K. Maini, B. Rodríguez, S. L. Waters, J. P. Whiteley, H. M. Byrne, and D. J. Gavaghan, “Chaste: A test-driven approach to software development for biological modelling,” *Comput. Phys. Commun.*, vol. 180, no. 12, pp. 2452–2471, Dec. 2009.
- [159] G. R. Mirams, C. J. Arthurs, M. O. Bernabeu, R. Bordas, J. Cooper, A. Corrias, Y. Davit, S.-J. Dunn, A. G. Fletcher, D. G. Harvey, M. E. Marsh, J. M. Osborne, P. Pathmanathan, J. Pitt-Francis, J. Southern, N. Zemzemi, and D. J. Gavaghan, “Chaste: An Open Source C++ Library for Computational Physiology and Biology,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, no. 3, p. e1002970, Mar. 2013.
- [160] S. S. Jang, K. T. Oishi, R. G. Egbert, and E. Klavins, “Specification and Simulation of Synthetic Multicelled Behaviors,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 1, no. 8, pp. 365–374, Aug. 2012.
- [161] K. Oishi and E. Klavins, “Framework for Engineering Finite State Machines in Gene Regulatory Networks,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 652–665, Sep. 2014.
- [162] M. Gutiérrez, P. Gregorio-Godoy, G. Pérez del Pulgar, L. E. Muñoz, S. Sáez, and A. Rodríguez-Patón, “A New Improved and Extended Version of the Multicell Bacterial Simulator gro,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 1496–1508, Aug. 2017.
- [163] J. B. Xavier, C. Picioreanu, and M. C. M. van Loosdrecht, “A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms,” *Environ. Microbiol.*, vol. 7, no. 8, pp. 1085–1103, Aug. 2005.
- [164] L. A. Lardon, B. V. Merkey, S. Martins, A. Dötsch, C. Picioreanu, J.-U. Kreft, and B. F. Smets, “iDynoMiCS: next-generation individual-based modelling of biofilms,” *Environ. Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 2416–2434, Sep. 2011.
- [165] J.-U. Kreft, G. Booth, and J. W. T. Wimpenny, “BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth,” *Microbiology*, vol. 144, no. 12, pp. 3275–3287, Dec. 1998.
- [166] T. E. Gorochowski, A. Matyjaszkiewicz, T. Todd, N. Oak, K. Kowalska, S. Reid, K. T. Tsaneva-Atanasova, N. J. Savery, C. S. Grierson, and M. di Bernardo, “BSim: An Agent-Based Tool for Modeling Bacterial Populations in Systems and Synthetic Biology,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e42790, Aug. 2012.
- [167] T. J. Rudge, P. J. Steiner, A. Phillips, and J. Haseloff, “Computational Modeling of Synthetic Microbial Biofilms,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 1, no. 8, pp. 345–352, Aug. 2012.
- [168] L. Dupuy, J. Mackenzie, T. Rudge, and J. Haseloff, “A System for Modelling Cell–Cell Interactions during Plant Morphogenesis,” *Ann. Bot.*, vol. 101, no. 8, pp. 1255–1265, May 2008.
- [169] V. Venturi, Á. Kerényi, B. Reiz, D. Bihary, and S. Pongor, “Locality versus globality in bacterial signalling: can local communication stabilize bacterial communities?,” *Biol. Direct*, vol. 5, pp. 1–6, 2010.
- [170] 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 Comput.*, vol. 13, no. 1, pp. 21–28, 2012.
- [171] 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.,” *J. Mol. Model.*, vol. 20, no. 7, p. 2248, Jul. 2014.
- [172] G. Hardin, “The competitive exclusion principle,” *Science (80-)*, vol. 131, no. 3409, pp. 1292–1297, 1960.
- [173] V. Bucci, S. Bradde, G. Biroli, and J. B. Xavier, “Social Interaction, Noise and Antibiotic-Mediated Switches in the Intestinal Microbiota,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 8, no. 4, p. e1002497, Apr. 2012.
- [174] A. Vrieze, P. F. de Groot, R. S. Kootte, M. Knaapen, E. van Nood, and M. Nieuwdorp, “Fecal transplant: A safe and sustainable clinical therapy for restoring intestinal microbial balance in human disease?,” *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 27, no. 1, pp. 127–137, Feb. 2013.
- [175] T. D. Lawley, S. Clare, A. W. Walker, M. D. Stares, T. R. Connor, C. Raisen, D. Goulding, R. Rad, F. Schreiber, C. Brandt, L. J. Deakin, D. J. Pickard, S. H. Duncan, H. J. Flint, T. G. Clark, J. Parkhill, and G. Dougan, “Targeted Restoration of the Intestinal Microbiota with a Simple, Defined Bacteriotherapy Resolves Relapsing *Clostridium difficile* Disease in Mice,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 10, p. e1002995, Oct. 2012.
- [176] P. CSERMELY, V. AGOSTON, and S. PONGOR, “The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 178–182, Apr. 2005.
- [177] S. Netotea, I. Bertani, L. Steindler, A. Kerényi, V. Venturi, and S. Pongor, “A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an "activation zone",” *Biol. Direct*, vol. 4, p. 6, Feb. 2009.

- [178] G. F. Gause, "Experimental studies on the struggle for existence: 1. Mixed population of two species of yeast.," *J. Exp. Biol.*, vol. 9, pp. 389–402, 1932.
- [179] N. Kashtan, S. E. Roggensack, S. Rodrigue, J. W. Thompson, S. J. Biller, A. Coe, H. Ding, P. Martinen, R. R. Malmstrom, R. Stocker, M. J. Follows, R. Stepanauskas, and S. W. Chisholm, "Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*," *Science*, vol. 344, no. 6182, pp. 416–20, Apr. 2014.
- [180] Y. Tashiro, Y. Yawata, M. Toyofuku, H. Uchiyama, and N. Nomura, "Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms," *Microbes Environ.*, vol. 28, no. 1, pp. 13–24, 2013.
- [181] W.-L. Ng and B. L. Bassler, "Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 43, no. 1, pp. 197–222, Dec. 2009.
- [182] T. Hosni, C. Moretti, G. Devescovi, Z. R. Suarez-Moreno, M. B. Fatmi, C. Guarnaccia, S. Pongor, A. Onofri, R. Buonaurio, and V. Venturi, "Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease," *ISME J.*, vol. 5, pp. 1857–1870, 2011.
- [183] J. R. Chandler, S. Heilmann, J. E. Mittler, and E. P. Greenberg, "Acyl-homoserine lactone-dependent eavesdropping promotes competition in a laboratory co-culture model.," *ISME J.*, vol. 6, no. 12, pp. 2219–28, Dec. 2012.
- [184] G. Liu, K. F. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan, "Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomycetes.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 1, pp. 112–43, Mar. 2013.
- [185] H. Zhu, S. K. Sandiford, and G. P. van Wezel, "Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, no. 2, pp. 371–386, Feb. 2014.

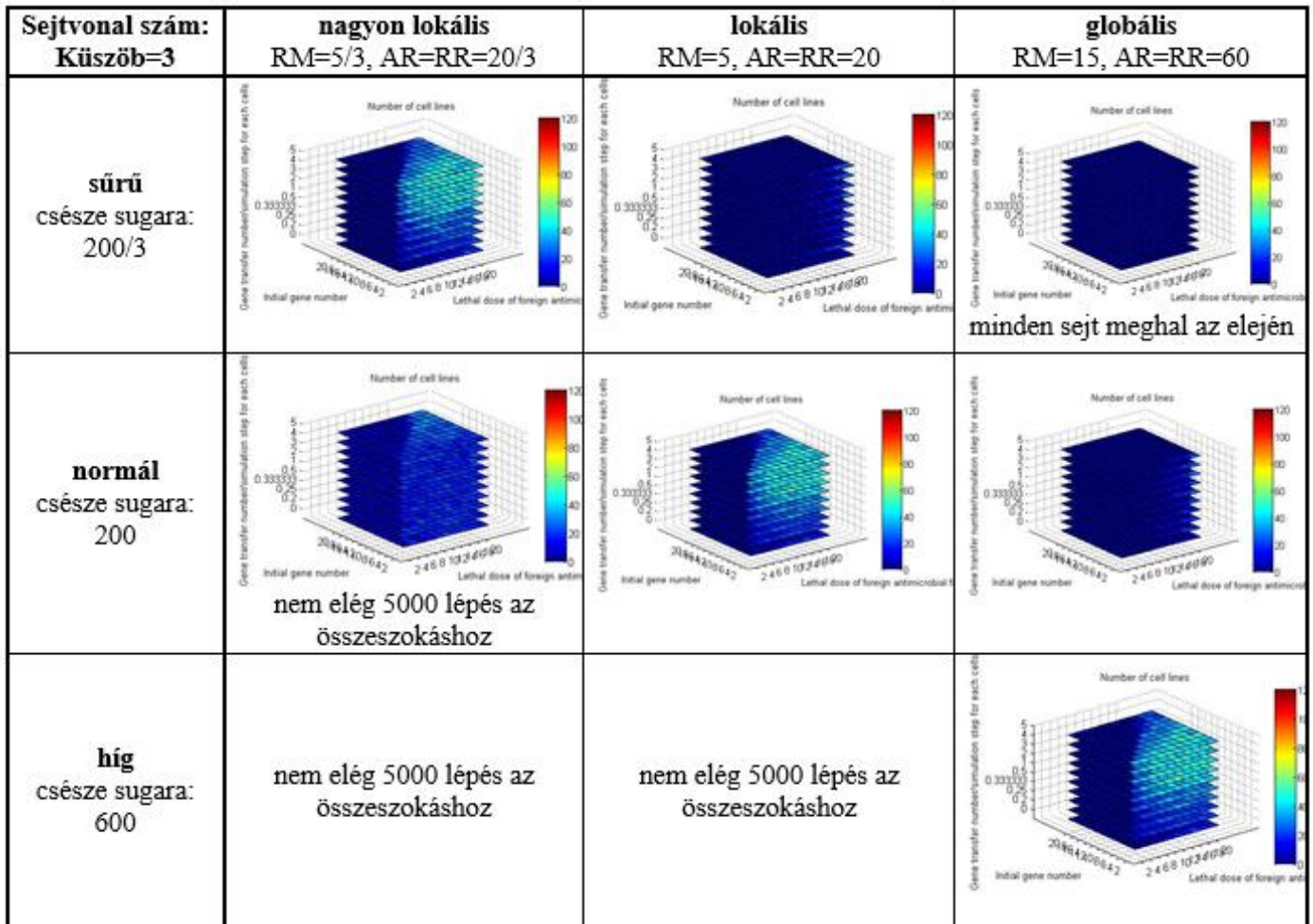
Függelék



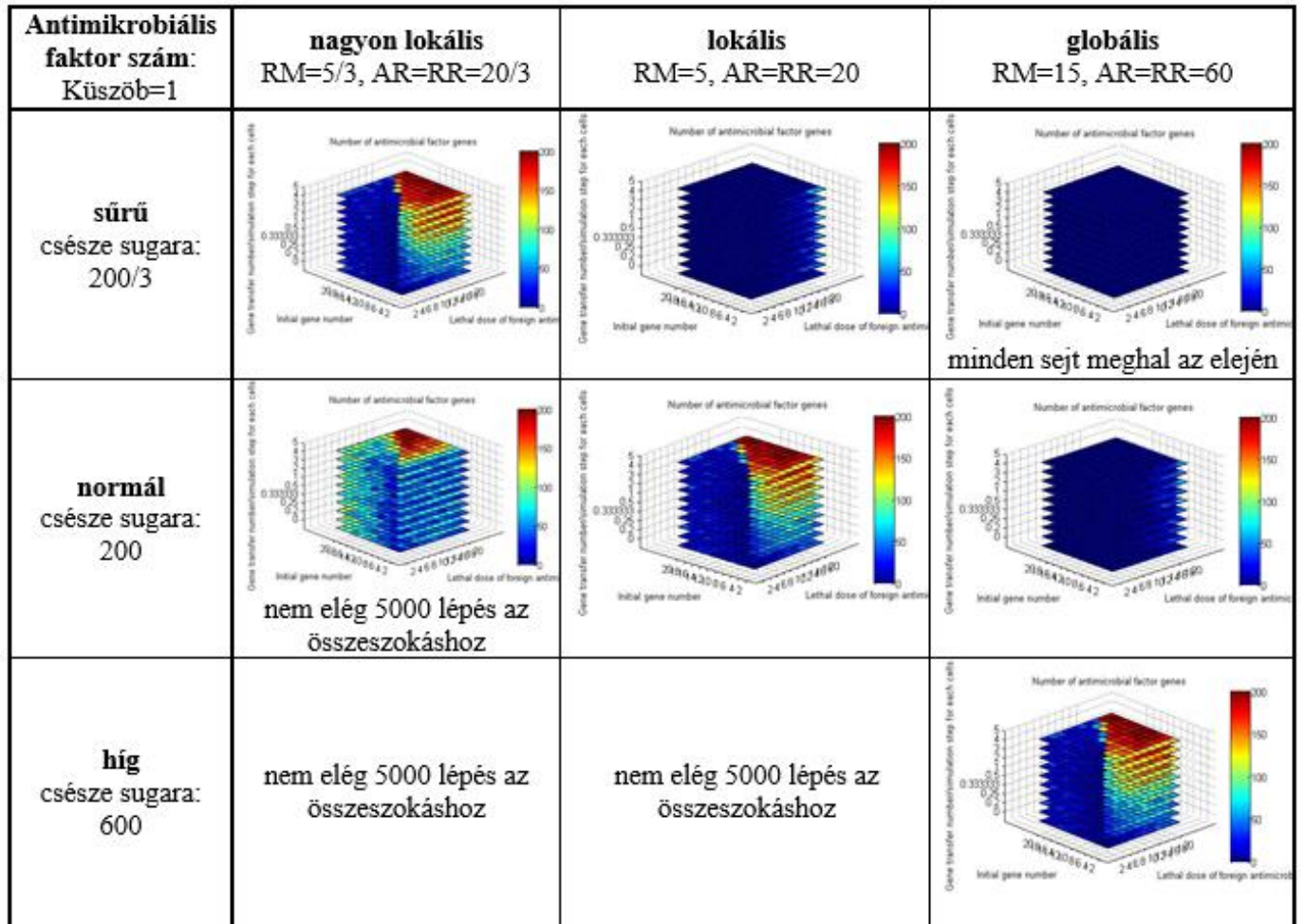
F.1. ábra: A HGT program felülete. Fent két versengő közösség egyedei láthatók kék és piros színnel a szimulációs térben. A lenti oszlopdigramok mutatják az AM (fent) és a rezisztencia gének (lent) arányát a közösségek metagenomjaiban.



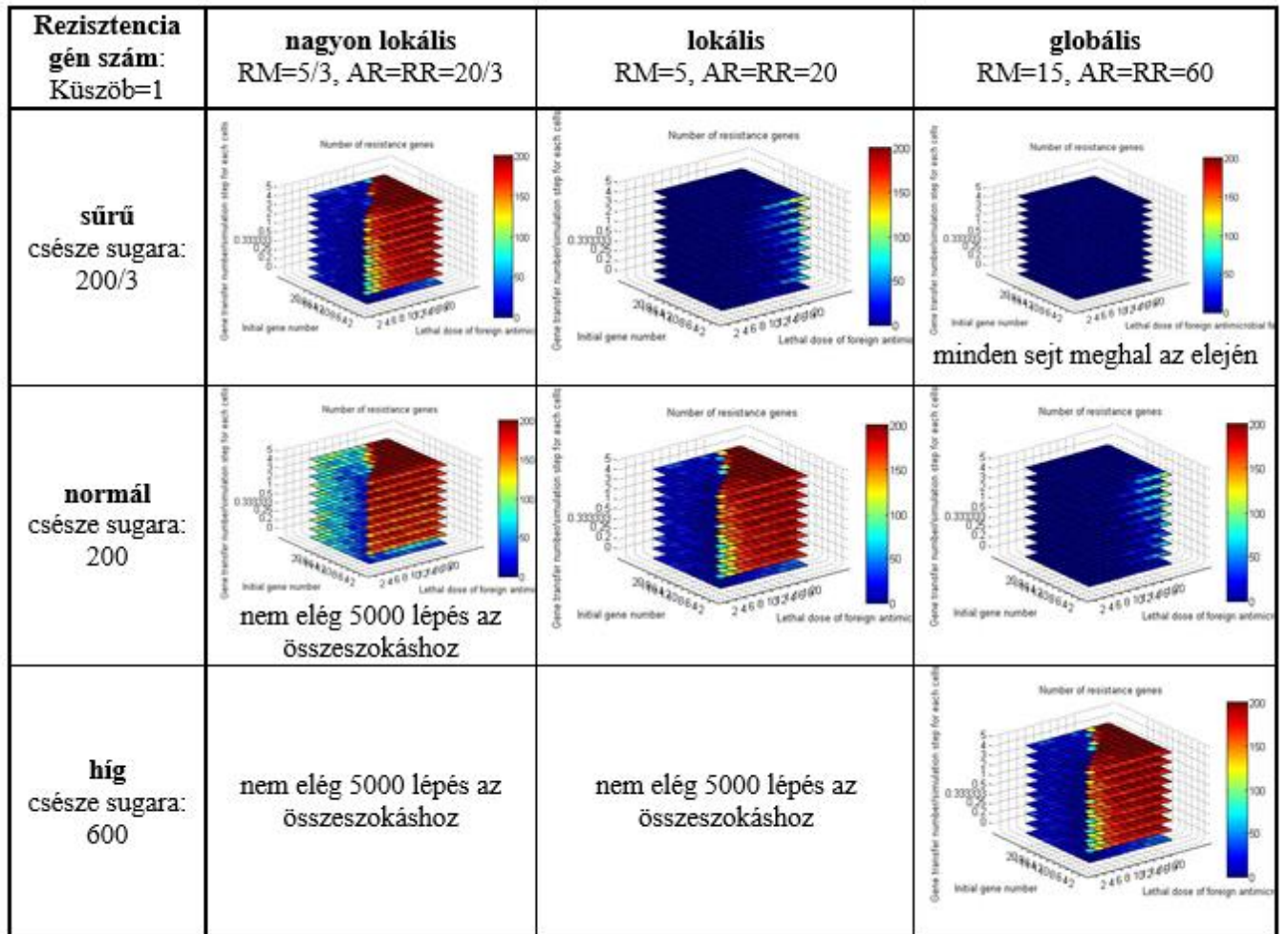
F.2. ábra: A sejtvonalak számának (klonalitás) alakulása a vizsgát paraméterek függvényében.



F.3. ábra: A sejtvonalak számának (klonalitás) alakulása a vizsgát paraméterek függvényében, ha csak a legalább 3 sejtet tartalmazó sejtvonalakat ábrázoljuk.



F.4. ábra: Az antimikrobiális faktorok számának alakulása a vizsgált paraméterek függvényében.

F.5. ábra: A rezisztenciag \acute{e} nek s \acute{a} m \acute{a} nak alakul \acute{a} sa a vizsg \acute{a} t param \acute{e} terek f \acute{u} ggv \acute{e} ny \acute{e} ben.

A quorum sensing szimulációk paramétereit

F.1. táblázat: A QS modell fő paramétereit (konfigurációs fájl)

Simulation parameters:						
Maximum number of simulation steps	5000					
Snapshot time	1					
Graphical output	yes					
Medium parameters:						
Max number of bacterium in cells	10					
Medium size (x)	250					
Medium size (y)	2000					
Lattice size (x)	50					
Lattice size (y)	400					
Produced materials:						
Initial concentration of materials in cells	0	0	0	0	0	0
Initial food concentration in cells	500					
Population:						
Number of species	2					
Number of states	4	(8 for AB)				
Initial number of bacteria (of species)	5	5				
Energy after division	0.2					
Mutation rate	-1					
Mutant number	1					
Border advancement:						
Border advancement threshold	1					
Diffusion parameters:						
Diffusion coefficients of food	0.03					
Diffusion coefficients of materials	0.02	0.05				
Decay constants of materials	0.001	0.0001				
Time step	40					
Simulation type:	single					

F.2. táblázat: QS küszöb mintázat: 2 faj azonos QS rendszerrel (5.1., 5.2.,5.3. alfejezetek) (konfigurációs fájl)

Produced materials (binary)						Index (decimal + 1)	State identifiers of species			
P6	P5	P4	P3	P2	P1		S1	S2	S3	S4
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	0
0	0	0	0	1	0	3	3	3	0	0
0	0	0	0	1	1	4	4	4	0	0

F.3. táblázat: Az 5.1., 5.2., 5.4. alfejezetek WT ágensek paraméterei (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10	10	10000	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.34	0.07	0	0	0	0	0.017	0.105	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.34	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.34	0.07	0	0	0	0	0.017	0.105	0	0	0	0

F.4. táblázat: Csak alapszintű jeltermelésű ágensek paraméterei (5.3.A. ábra) (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10	10	10000	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0

F.5. táblázat: Csökkent jel és faktor termelésű ágensek paramétereit (5.3.D. ábra species2) (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
38	10	10000	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.25	0.025	0	0	0	0	0.0125	0.0375	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.25	0	0	0	0	0	0.0125	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.25	0.025	0	0	0	0	0.0125	0.0375	0	0	0	0

F.6. táblázat: 5.9. ábra WT ágenseinek paramétereit (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10	10	10000	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.4	0.1	0	0	0	0	0.02	0.15	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.4	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.4	0.1	0	0	0	0	0.02	0.15	0	0	0	0

F.7. táblázat: WT-65%-al csökkent jel és faktor termelésű ágensek paraméterei (5.9. ábra PM) (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
40	10	10000	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.27	0.035	0	0	0	0	0.0135	0.0525	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.27	0	0	0	0	0	0.0135	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.27	0.035	0	0	0	0	0.0135	0.0525	0	0	0	0

F.8. táblázat: QS küszöb mintázat: 2 faj azonos faktorról, különböző jellel és S2 AB termeléssel az S1jelenyaga ellen (5.4. alfejezet) (konfigurációs fájl)

Produced materials (binary)						Index (decimal + 1)	State identifiers of species			
P6	P5	P4	P3	P2	P1		S1	S2	S3	S4
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0
0	0	0	0	1	0	3	3	3	0	0
0	0	0	0	1	1	4	0	4	0	0
0	0	0	1	0	0	5	2	5	0	0
0	0	0	1	0	1	6	0	6	0	0
0	0	0	1	1	0	7	4	7	0	0
0	0	0	1	1	1	8	0	8	0	0
0	0	1	0	0	0	9	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	10	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	11	0	0	0	0
0	0	1	0	1	1	12	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	13	0	0	0	0
0	0	1	1	0	1	14	0	0	0	0
0	0	1	1	1	0	15	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	16	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	17	5	0	0	0
0	1	0	0	0	1	18	0	0	0	0
0	1	0	0	1	0	19	7	0	0	0
0	1	0	0	1	1	20	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	21	6	0	0	0
0	1	0	1	0	1	22	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0	23	8	0	0	0

F.9. táblázat: Az 5.4. alfejezet AB termelő ágenseinek paraméterei (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10	10	30	10000	10000	10000

Division threshold	12
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
2	1.5	0.3	0.34	0.07	0	0	0	0	0.017	0.105	0	0	0	0
3	1.5	0.3	0.34	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0	0	0
4	5	0.5	0.34	0.07	0	0	0	0	0.017	0.105	0	0	0	0
5	1.5	0.3	0.2	0	0	0	0.34	0	0.1	0	0	0	0.017	0
6	1.5	0.3	0.34	0.07	0	0	0.34	0	0.017	0.105	0	0	0.017	0
7	1.5	0.3	0.34	0	0	0	0.34	0	0.017	0	0	0	0.017	0
8	5	0.5	0.34	0.07	0	0	0.34	0	0.017	0.105	0	0	0.017	0

F.10. táblázat: Az 5.4. alfejezet baktericid AB érzékeny ágenseinek paraméterei (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10000	10	10	10000	10	10000

Division threshold	11
Metabolic energy	0.1

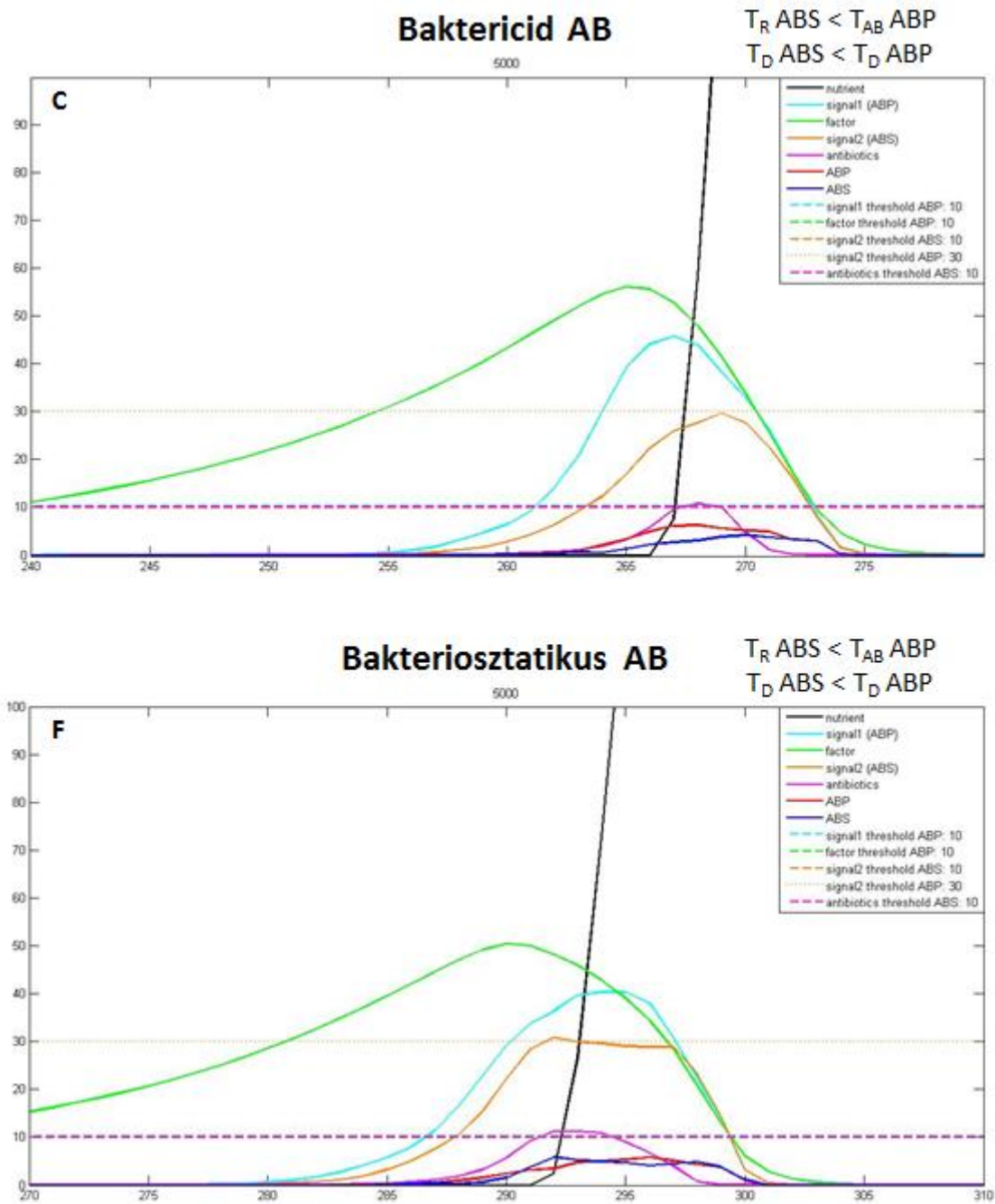
State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
2	1.5	0.3	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0	0
3	1.5	0.3	0	0	0.34	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0
4	5	0.5	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0	0
5	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0.4	0
6	1.5	0.3	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0.4	0
7	1.5	0.3	0	0	0.34	0	0	0	0	0	0.017	0	0.4	0
8	5	0.5	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0.4	0

F.11. táblázat: Az 5.4. alfejezet bakterisztikus AB érzékeny ágenseinek paramétereit (konfigurációs fájl)

Threshold concentration of materials:					
P1	P2	P3	P4	P5	P6
10000	10	10	10000	10	10000

Division threshold	11
Metabolic energy	0.1

State	Speed	Food	Amount of produced materials						Energy spent on producing materials					
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
2	1.5	0.3	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0	0
3	1.5	0.3	0	0	0.34	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0
4	5	0.5	0	0.07	0.34	0	0	0	0	0.105	0.017	0	0	0
5	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
6	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
7	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
8	1.5	0.3	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0



F.6. ábra: Jellemző koncentráció viszonyok 5000 lépés után az 5.13.C és F ábrákon összegzett stabil együttélést eredményező szimulációk során. C: baktericid AB hatás; F: bakteriosztatikus hatás. A folytonos vonalak jelzik a tápanyag (fekete), a két jel (ABP: ciánkék, ABS: narancssárga), a faktor (zöld) és az antibiotikum (rózsaszín) koncentrációjának átlagos eloszlását a szimulációs rác soraiban, a szaggatott és pontozott vonalak pedig a küszöbértékeket. Kék vonal az ABS, piros vonal az ABP sejtek mennyiségének átlagos eloszlása a szimulációs rácson. C: kevés AB termelés, a signal2 koncentráció nem lépi túl az ABP érzékelési küszöbét; F: több AB termelés. A térbeli szeparáció a sorok szerinti átlagolások miatt kevésbé látványos, mint az 5.7. ábrán.