

Αναλυτική έκθεση υπολογιστικών μοντέλων για την προσομοίωση της συμπεριφοράς μικροβιακών κοινοτήτων που σχηματίζουν βιοϋμένια (Π23-Δ5.1 και Δ5.2)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	Εισαγωγή.....	2
2	Υπάρχουσες προσεγγίσεις (State of the art).....	4
2.1	Υπάρχοντα λογισμικά επεξεργασίας κυτταρικών ταινιών.....	4
2.2	Μοντελοποίηση.....	5
3	Μεθοδολογία Μοντελοποίησης.....	7
4	Τεχνική Προσέγγιση.....	9
4.1	Ανάλυση κυτταρικών ταινιών.....	9
4.2	Μελέτη μεμονωμένων κυττάρων.....	9
4.2.1	Βάση δεδομένων για τα κυτταρικά χαρακτηριστικά.....	10
4.2.2	Οπτικοποίηση και μελέτη χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων.....	11
4.3	Υπολογιστική μοντελοποίηση.....	13
4.3.1	Σενάρια μοντελοποίησης.....	14
4.3.2	Αποτελέσματα Μοντελοποίησης.....	20
5	Σύνοψη.....	22
	Βιβλιογραφία.....	23

1 Εισαγωγή

Η μικροσκοπία είναι ένα πολύ σημαντικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για να αποτυπώσει την συμπεριφορά μικροβιακών συστημάτων σε πολλαπλά επίπεδα, από τα μόρια μέχρι και τους βακτηριακούς πληθυσμούς [1]. Η μικροσκοπία χρονοσειράς εικόνων που απεικονίζουν αναπτυσσόμενες μικροβιακές αποικίες (time-lapse “cell movies” microscopy) επιτρέπει την παρακολούθηση δυναμικών διεργασιών στο χρόνο [2] και είναι πολύ σημαντική για τη συστηματική μικροβιολογία [2]. Η ακριβής επεξεργασία εικόνας καθιστά την εξαγωγή πληροφορίας από κυτταρικές ταινίες ιδιαίτερα αξιόπιστη.[3][4]. Ωστόσο, παρά την σύγχρονη πρόοδο, η αυτόματη παρακολούθηση μεμονωμένων κυττάρων κατά την ανάπτυξη και τη διαίρεση τους σε συνωστισμένες μικροβιακές κοινότητες, κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες, δεν έχει ακόμα επιτευχθεί [3][4]. Οι διάφορες μελέτες που αφορούν στη μεταβλητότητα των κυτταρικών ιδιοτήτων, θα μπορούσαν να βασίζονται στην μικροσκοπία κυτταρικών ταινιών, μόνο όταν η ανάλυση τέτοιων ταινιών σε υψηλή ρυθμαπόδοση θα είναι μια τετριμμένη διαδικασία [2][3].

Η παρακολούθηση και η ποσοτικοποίηση των χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων (π.χ. κυτταρικό μέγεθος, χρόνος διαίρεσης, ρυθμός επιμήκυνσης κ.α.) σε συνδυασμό με διάφορα πρότυπα (patterns), κατά την έκφραση μαρκαρισμένων μοριακών δεικτών (π.χ. φθορίζουσες πρωτεΐνες) σε αναπτυσσόμενες μικροβιακές αποικίες, οι οποίες είναι συνωστισμένες και είναι πιθανό να περιέχουν περισσότερα από ένα είδη βακτηρίων, παραμένει μεγάλη πρόκληση [4][5]. Προηγμένοι αλγόριθμοι επεξεργασίας βιολογικών εικόνων και λογισμικά είναι σε θέση να παρέχουν καινούριες προοπτικές στην προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology) , αν επικεντρωθούν στην παρακολούθηση μικροβιακών κινητικών (kinetics) σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων (single-cell level) [6]. Οι εν λόγω αλγόριθμοι επιτρέπουν την εξαγωγή πληθώρας χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία αν οργανωθούν σωστά, εξορυχθούν και συσχετιστούν μεταξύ τους μέσω ενός πληροφοριακού συστήματος ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων (single-cell analytics system) θα μπορούσαν να υποστηρίξουν και επιταχύνουν μελέτες στοχαστικής μοντελοποίησης (stochastic modelling) [6-9] και αξιολόγησης μικροβιακού κινδύνου (microbial risk assessment) [10][11].

Η ανάλυση εικόνας και η ανάλυση πληροφορίας που μπορεί να προκύψει σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων είναι πολλά υποσχόμενες μέθοδοι/τεχνικές [6] για τον έλεγχο σεναρίων μόλυνσης τροφής από ραγδαίως αναπτυσσόμενα βακτήρια κάτω από διαφορετικές αλλά και ελεγχόμενες περιβαλλοντολογικές συνθήκες [10][11]. Ίσως το πιο σημαντικό εύρημα για το μέλλον του κλάδου της μικροβιολογίας είναι η αντίληψη ότι γενετικά πανομοιότυπα βακτήρια σε ένα καλά αναμειγμένο περιβάλλον μπορούν να παρουσιάσουν πολύ διαφορετικούς φαινότυπους [7][9]. Το εύρημα αυτό αναιρεί τη θεώρηση, ότι τα πειράματα που διεξάγονται σε επίπεδο πληθυσμού, όσο και τα πολυάριθμα μοντέλα που υποθέτουν ότι όλα τα μεμονωμένα βακτήρια είναι ίδια είναι ικανά να περιγράψουν τη στοχαστικότητα την ανάπτυξης στις μικροβιακές κοινότητες. Μπορεί όμως αυτή η μοναδικότητα των βακτηρίων να διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο; Και αν ναι, σε ποιο βαθμό;

Για να απαντηθούν αυτά τα θεμελιώδη ερωτήματα, ο καλύτερος τρόπος είναι αδιαμφισβήτητα οι προσεγγίσεις υπολογιστικής μοντελοποίησης [10-13], σε συνδυασμό με τη διεξαγωγή καλά σχεδιασμένων εργαστηριακών πειραμάτων. Αποτυπώνοντας τη δυναμική των σχετικών

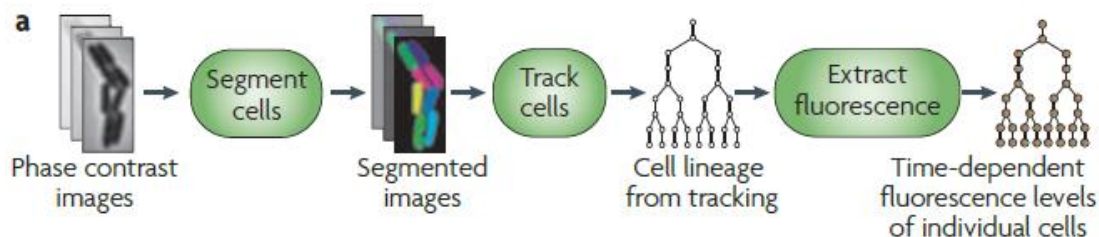
χαρακτηριστικών και των δραστηριοτήτων μεμονωμένων κυττάρων, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, κατανομές με βάση τη γενιά του κυττάρου που μπορούν να εξαχθούν από την εξόρυξη δεδομένων των εικόνων μεμονωμένων κυττάρων, μπορούμε να αναπτύξουμε και να παραμετροποιήσουμε στοχαστικά μοντέλα. Αυτά τα μοντέλα αν συνδυαστούν με στοχαστική προσομοίωση, θα είναι τελικά σε θέση να προβλέπουν τι μπορεί να συμβεί σε επίπεδο πληθυσμού, με βάση την παρατηρούμενη συμπεριφορά από το επίπεδο μικροβιακών κοινοτήτων.

2 Υπάρχουσες προσεγγίσεις (State of the art)

2.1 Υπάρχοντα λογισμικά επεξεργασίας κυτταρικών ταινιών

Η επεξεργασία μικροβιολογικών δεδομένων εικόνας έχει ήδη εξελιχθεί σε ζωτικό κλάδο της βιοπληροφορικής (bioinformatics) και της υπολογιστικής όρασης (computer vision) [4]. Η ανάλυση ακόμα και των πιο ευκρινών κυτταρικών ταινιών είναι μια κουραστική και χρονοβόρα διαδικασία [2][3]. Σε πολλά συστήματα το πρώτο στάδιο της ανάλυσης είναι η κατάτμηση (segmentation) των αντικειμένων της εικόνας, η οποία εντοπίζει το σύνολο των εικονοστοιχείων (pixels) που αντιστοιχούν σε ένα μεμονωμένο κύτταρο σε ένα στιγμιότυπο εικόνας μιας κυτταρικής ταινίας, βλ. Σχήμα 2. Η κατάτμηση εικόνας πραγματοποιείται σε εικόνες που προέρχονται και από το κανάλι αντίθεσης φάσης (phase contrast) αλλά και από το κανάλι φθορισμού (fluorescence), χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, όπως: ανίχνευση ακμών (edge detection), κατωφλίωση (thresholding) και σύγκριση προτύπων (template matching), όπως είναι ο μετασχηματισμός του Hough (Hough transform). Εφόσον τα βακτήρια μιας κυτταρικής ταινίας έχουν ταυτοποιηθεί, αλγόριθμοι για την αντιστοίχιση των κυττάρων (cell tracking) μεταξύ διαδοχικών στιγμιότυπων εικόνας (frames) είναι απαραίτητοι ώστε να εξαχθούν τα δέντρα κυτταρικής γενεαλογίας (cell lineage trees). Όσον αφορά στην επεξεργασία εικόνας κυτταρικών ταινιών και στην αντιστοίχιση κυττάρων σε διαδοχικά στιγμιότυπα εικόνας (frames), υπάρχουν ήδη πολλά διαθέσιμα λογισμικά. Τα πιο σημαντικά πακέτα είναι το TLM-Tracker [16], το CellTracer [17], το MicrobeTracker [18] και το Schnitzcells [19].

Όλα τα προαναφερθέντα πακέτα λογισμικού παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς. Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι η έλλειψη καθολικότητας (lack of generality). Τα λογισμικά αυτά δεν είναι ικανά να επεξεργαστούν εικόνες που έχουν παραχθεί από διαφορετικά μικροσκόπια, όπως οπτικά (optical microscopes) και συνεστιακά σάρωσης με ακτίνες (confocal scanning laser microscopes) και διαφορετικές τεχνικές μικροσκοπίας, όπως αντίθεσης φάσης (phase contrast), φωτεινού πεδίου (bright field) και φθορισμού (fluorescence). Έτσι, προϋποθέτουν την εκτενή ανάμειξη του ανθρώπινου παράγοντα, προκειμένου να αναλύσουν τις αντίστοιχες κυτταρικές ταινίες. Επιπλέον, για να μπορούν να λειτουργούν αποδοτικά, απαιτούν εκτενή παραμετροποίηση και έτσι καθίστανται μη φιλικά προς το χρήστη, αφού θέτουν ως προϋπόθεση ο τελευταίος να είναι εξοικειωμένος με έννοιες επεξεργασίας εικόνας. Έτσι, η επεξεργασία εικόνας βακτηρίων αποτελεί επίσης τροχοπέδη για την υψηλή ρυθμαπόδοση που είναι αναγκαία για την έρευνα συστημικής μικροβιολογίας που αφορά στο σχηματισμό και στη συμπεριφορά μικροβιακών κοινοτήτων.



Σχήμα 2. Μοντέλο ανάλυσης κυτταρικών ταινιών (σχήμα προσαρμοσμένο από το [3]).

2.2 Μοντελοποίηση

Τα ατομοστραφή μοντέλα (individual-based models ή IbM) μπορούν να αναπαράγουν ταυτοχρόνως πρότυπα που παρατηρούνται τόσο σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, όσο και σε επίπεδο πληθυσμού. Αυτό, τα καθιστά δομικά ρεαλιστικά και έτσι μπορούν να πραγματοποιήσουν ανεξάρτητες προβλέψεις, οι οποίες μπορούν να ελεγχθούν [12][13]. Η μοντελοποίηση που βασίζεται σε ατομοστραφή μοντέλα μικροβίων και έχει υιοθετηθεί από την ευρύτερα διαδεδομένη ατομοστραφή μοντελοποίηση μεγαλύτερων οργανισμών, έχει ωριμάσει με την ανάπτυξη εργαλείων που δίνουν τη δυνατότητα στους επιστήμονες να εκτελέσουν υπολογιστικές προσομοιώσεις, οι οποίες θα φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες στην έρευνά τους [20].

Ο συνηγορούμενος συνδυασμός της ατομοστραφούς μοντελοποίησης και της διεξαγωγής πειραμάτων, στην οποία μπορούμε να αναφερόμαστε ως μικροβιακή ατομοστραφή οικολογία (microbial individual-based ecology ή μΙΒΕ) [20], μπορεί αρχικά να είναι απλώς μια ζύμωση χάριν ευκολίας καθώς τα μοντέλα χρειάζονται ατομοστραφή δεδομένα. Είναι σαφές το ότι τα ατομοστραφή μοντέλα πρέπει να εκμεταλλεύονται με το βέλτιστο τρόπο τα εν λόγω δεδομένα. Όμως, μια βαθύτερη σχέση με πολλά κοινά οφέλη δύναται να αναπτυχθεί. Ο στόχος της μΙΒΕ δεν είναι άλλος από το να μιμηθεί την επιτυχία της ανάπτυξης νέων μοντέλων συστημικής βιολογίας, που βασίζονται στη ανάπτυξη των *omics* δεδομένων. Τα ατομοστραφή μοντέλα μπορούν να ολοκληρώσουν την πρότερη γνώση με νέα δεδομένα, από το επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων αλλά και από το επίπεδο πληθυσμού. Καθώς αυτά τα μοντέλα επιτρέπουν την εισαγωγή των μηχανιστικών λεπτομερειών, έχουν τη δυναμική να προβλέπουν παρατηρήσεις σε συνθήκες που αλλάζουν ή ακόμα και σε καινούρια περιβάλλοντα. Επιπλέον, τα μοντέλα αυτά έχουν τη δυνατότητα να προβλέπουν τις παραγώγους συγκέντρωσης δύσκολα ανιχνεύσιμων μεταβολιτών, τοξίνων, ή χημικών σημάτων, δεδομένης της χωρικής θέσης των παραγωγών και των καταναλωτών, όπως και τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης αυτών.

Ένα χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της μΙΒΕ, η προοπτική της οποίας είμαστε πεπεισμένοι ότι είναι πολύ μεγάλη, είναι η ικανότητά της να συμπεριλαμβάνει χαμηλότερα αλλά και υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης των μικροβιακών κοινοτήτων, ακολουθώντας το πλαίσιο της ατομοστραφούς μοντελοποίησης. Πρώτον, όσον αφορά στο χαμηλότερο επίπεδο, δηλαδή το μοριακό (molecular), τα ατομοστραφή μοντέλα υποστηρίζουν σε μεγάλο βαθμό προσεγγίσεις συστημικής και συνθετικής βιολογίας, όπως η προσέγγιση στο [21]. Με τον τρόπο που τα ατομοστραφή μοντέλα περιγράφουν τη δράση κάθε μεμονωμένου κυττάρου, είναι προφανές ότι μπορούν να ενσωματώσουν μοντέλα ενδοκυτταρικής δυναμικής (intracellular dynamics), είτε φυσικών είτε συνθετικών βακτηρίων. Τα εν λόγω ενσωματωμένα ενδοκυτταρικά μοντέλα, μπορούν εν συνεχεία, να καθορίσουν τη συμπεριφορά των μεμονωμένων κυττάρων περισσότερο μηχανιστικά, παρά βασιζόμενα σε φαινοτυπικές περιγραφές της συμπεριφοράς του κυττάρου.

Δεύτερον, όσον αφορά στο υψηλότερο επίπεδο των μικροβιακών κοινοτήτων και των οικοσυστημάτων, η μοντελοποίηση κοινοτήτων που μπορεί να περιέχουν πολλά διαφορετικά είδη, είναι επίσης εφικτή [12][13][22], εφόσον και αυτές οι κοινότητες σχηματίζονται από μεμονωμένους οργανισμούς (ατομοστραφές μοντέλο). Όπου είναι απαραίτητο, τα διαφορετικά είδη μπορούν να οργανωθούν σε λειτουργικές ομάδες ώστε να επιτευχθεί η μείωση της υπολογιστικής πολυπλοκότητας της προσομοίωσης. Η χωρική ετερογένεια λαμβάνεται υπόψιν, καθώς τα μεμονωμένα κύτταρα βρίσκονται σε συγκεκριμένα σημεία και αλληλεπιδρούν τοπικά. Επίσης,

αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεμονωμένων κυττάρων που προέρχονται από διαφορετικό είδος (π.χ. περιβαλλόμενα από μόρια που διαχέονται, όπως θρεπτικά υλικά, τοξίνες ή χημικά σήματα) προκύπτουν έμμεσα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, επομένως δεν είναι απαραίτητο να παραμετροποιηθούν ή να διερευνηθούν περαιτέρω.

3 Μεθοδολογία Μοντελοποίησης

Οι κυτταρικές ταινίες περιέχουν μεγάλο όγκο δεδομένων που εξελίσσονται στο χρόνο (time-course data), εξαιρετικά πολύτιμο για την παραμετροποίηση και την επαλήθευση των μαθηματικών μοντέλων. Ωστόσο, η ακριβής αυτοματοποιημένη κατάτμηση και αντιστοίχιση μεμονωμένων κυττάρων μεταξύ συνεχόμενων στιγμιότυπων εικόνας, όσο αυτά μεγαλώνουν, κινούνται και διαιρούνται σε αναπτυσσόμενες μικροβιακές κοινότητες, παραμένουν μεγάλες προκλήσεις για την υπολογιστική όραση. Η καταμέτρηση και η παρακολούθηση βακτηρίων σε στιγμιότυπα εικόνας από έναν χρήστη είναι ιδιαίτερος πολύπλοκη, χρονοβόρα και αρκετά εκτεθειμένη στον κίνδυνο του λάθους. Ως βασικός στόχος της ομάδας μας είχε τεθεί η ανάπτυξη μιας πλήρως αυτοματοποιημένης μεθοδολογίας αλγορίθμων ανάλυσης κυτταρικών ταινιών, η οποία ξεπερνάει τις παραπάνω δυσκολίες, συνδυάζοντας τις τεχνικές επεξεργασίας εικόνας (image analysis) και τις μεθόδους μηχανικής μάθησης (machine learning). Αυτή η μεθοδολογία είναι αρκετά ακριβής και επιτρέπει την εκτίμηση των χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων σε υψηλή ρυθμιζόμενη σε μεγάλες αναπτυσσόμενες μικροβιακές κοινότητες, με σκοπό τη δημιουργία βάσης για την ανάλυση και τη μελέτη μεμονωμένων κυττάρων σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα για τη συστηματική μικροβιολογία. Οι αλγόριθμοι αυτοί, εκτός από την ευρωστία, ακόμα και σε μικρό-αποικίες που παρουσιάζουν συνωστισμό, προσφέρουν συγκεκριμένες δυνατότητες όπως: την παρακολούθηση πολλαπλών μικρό-αποικιών στο οπτικό πεδίο (field of view), τη δημιουργία δέντρων γενεαλογίας για κάθε μικρό-αποικία, την αντιστοίχιση στους κόμβους του δέντρου χαρακτηριστικών των μεμονωμένων κυττάρων καθώς αυτά εξελίσσονται στο χρόνο και από γενιά σε γενιά, π.χ. κυτταρικό μήκος, μέγεθος, απόσταση του κυττάρου από το κεντροειδές της αποικίας, ένταση φθορίζουσας πρωτεΐνης (fluorescent protein intensity).

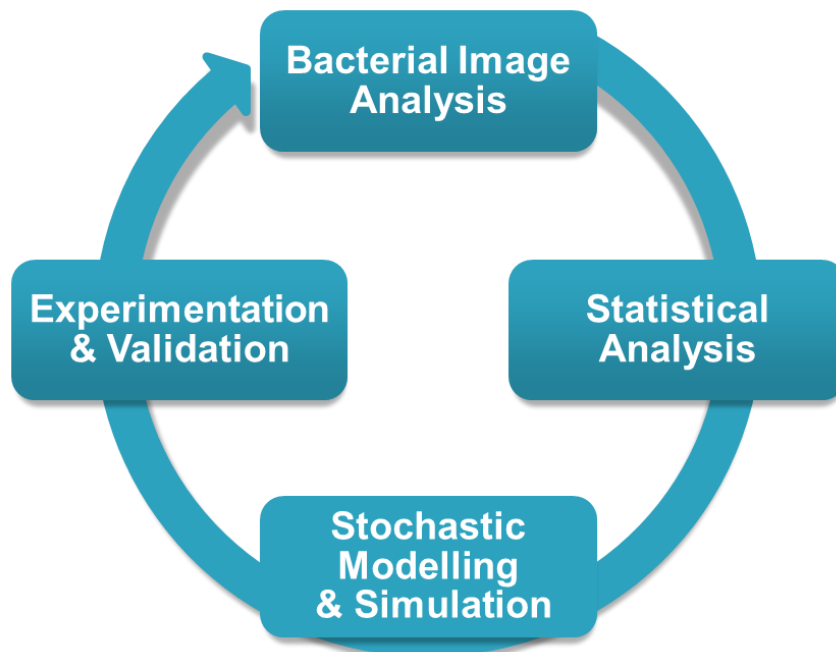
Κατά τη διάρκεια της κατάτμησης των βακτηρίων και τη δημιουργία των δέντρων κυτταρικής γενεαλογίας, η προτεινόμενη μεθοδολογία ανάλυσης κυτταρικών ταινιών παράγει μια πληθώρα από «μεγάλα δεδομένα» (“big data”), που χαρακτηρίζουν κάθε μεμονωμένο κύτταρο κάθε χρονική στιγμή (στιγμιότυπο εικόνας) της κυτταρικής ταινίας. Σε κάθε στιγμιότυπο, ο προτεινόμενος αλγόριθμος εξάγει διάφορα χαρακτηριστικά (attributes) για κάθε κύτταρο, π.χ. κυτταρικό μήκος, απόσταση του κυττάρου από το κεντροειδές της αποικίας, κλπ. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν τη διάρκεια της ζωής κάθε βακτηρίου, υπολογίζονται ακόμα διάφορα χαρακτηριστικά που αφορούν στη διάρκεια της ζωής κάθε κυττάρου (life span attributes), π.χ. χρόνος διαίρεσης, επιμήκυνση, κλπ. Έτσι, η πληροφορία που μπορεί να εξαχθεί, οργανώνεται σε σχεσιακή βάση βιοδεδομένων (relation bio-database), η οποία επιτρέπει την εξόρυξη δεδομένων και τη παροχή λειτουργιών, οι οποίες με τη σειρά τους επιτρέπουν την ανάλυση πληροφορίας η οποία προέρχεται από μεμονωμένα κύτταρα. Άλλο ένα καινοτόμο χαρακτηριστικό, το οποίο εισάγεται από την προσέγγισή μας αυτή, είναι η δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών «όψεων» στα δεδομένα που έχουν ήδη παραχθεί, με στόχο την οπτικοποίηση της πληροφορίας. Μέσω αυτής της προσέγγισης, τέλος, είμαστε σε θέση να διεξάγουμε στατιστικές αναλύσεις και εκτίμηση κατανομών, όπως για παράδειγμα την κατανομή του μήκους διαίρεσης των βακτηρίων για κάθε γενιά.

Με στόχο την απόδειξη της χρησιμότητας της παραπάνω προσέγγισης, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση δύο διαφορετικών σεναρίων προσομοίωσης: ενός που αφορά στη προσομοίωση σε χαμηλότερο και ενός που αφορά στην προσομοίωση σε υψηλότερο επίπεδο, πάντα ακολουθώντας το πλαίσιο μΙΒΕ.

Πρώτον, προσομοιώθηκε το φαινόμενο της ανάπτυξης βιοϋμενίων (biofilms), ξεκινώντας από μεμονωμένα κύτταρα ή από συστάδες κυττάρων και καταλήγοντας σε τρισδιάστατες μικροβιακές κοινότητες. Για την επίτευξη αυτού, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση ενός λογισμικού, το οποίο έχει την δυνατότητα να υποστηρίζει την ατομοστραφή μοντελοποίηση, για να αντιπροσωπεύει τα μεμονωμένα κύτταρα και την κινητική εξίσωση του Monod [23], η οποία εισάγει την ανάπτυξη, υπό τον περιορισμό θρεπτικού υποστρώματος (substrate-constraint growth) και παράλληλα επιτρέπει εναλλαγές του μικρο-περιβάλλοντος. Μέσω μιας τέτοιας προσέγγισης, γίνεται δυνατή η πρόβλεψη της δομής και της σύνθεσης ενός βιοϋμενίου, αλλά και της αντίδρασης του μικροβιακού πληθυσμού στο μικρό-περιβάλλον όπου εκτίθεται.

Δεύτερον, προσομοιώθηκε το φαινόμενο της ανάπτυξης μικρό-αποικιών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, χρειάστηκε ένα λογισμικό, το οποίο να υποστηρίζει τη δυσδιάστατη μοντελοποίηση, από το επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων σε επίπεδο μικρό-αποικίας (περίπου μέχρι 10.000 κύτταρα), την ατομοστραφή μοντελοποίηση, την ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων υπό περιορισμό, την ενδοκυτταρική δυναμική και διάχυση σημάτων, π.χ. μηχανισμός διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (quorum sensing). Η κυτταρική ανάπτυξη μοντελοποιήθηκε από κινητικές εξισώσεις πρώτης τάξης (εκθετική ανάπτυξη) και η ενδοκυτταρική δυναμική (γονιδιακά ρυθμιστικά δίκτυα, gene regulatory networks) με συνήθεις διαφορικές εξισώσεις. Μέσω αυτής της προσέγγισης τελικά, μοντελοποιείται η δομή και η σύνθεση μιας μικρό-αποικίας, καθώς και η απόκριση των μεμονωμένων κυττάρων σε ένα επαγόμενο σήμα (induced signal).

Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται το πρόβλημα και το κίνητρο για την ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας που οδηγεί στη μοντελοποίηση μικροβιακών κοινοτήτων, όπως αυτή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Στρατηγική για την κατασκευή και την επαλήθευση υπολογιστικών μοντέλων για την ανάπτυξη μικροβιακών κοινοτήτων.

4 Τεχνική Προσέγγιση

4.1 Ανάλυση κυτταρικών ταινιών

Ύστερα από τη μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας, καταλήξαμε στα δομικά στάδια της υπολογιστικής προσέγγισης (computational pipeline), που παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Τα δύο πρώτα στάδια, η προεπεξεργασία της εικόνας (image preprocessing) και η κατάτμηση σε επίπεδο αποικίας και εν συνεχεία σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, (colony to cell segmentation) είχαν αναπτυχθεί σε αρχική μορφή κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του παραδοτέου 21 (Π21), κατά το Έργο 5.1. Έτσι, αποφασίστηκε να προστεθεί ένα τρίτο στάδιο για την αντιστοίχιση βακτηρίων στα διαδοχικά στιγμιότυπα εικόνας (frames) των κυτταρικών ταινιών και την ανακατασκευή του δέντρου γενεαλογίας των αρχικών βακτηρίων που εξελίσσονται σε αποικίες (cell tracking and lineage tree construction). Αυτό το στάδιο συνεισέφερε και στη βελτίωση των αποτελεσμάτων της κατάτμησης εικόνας.



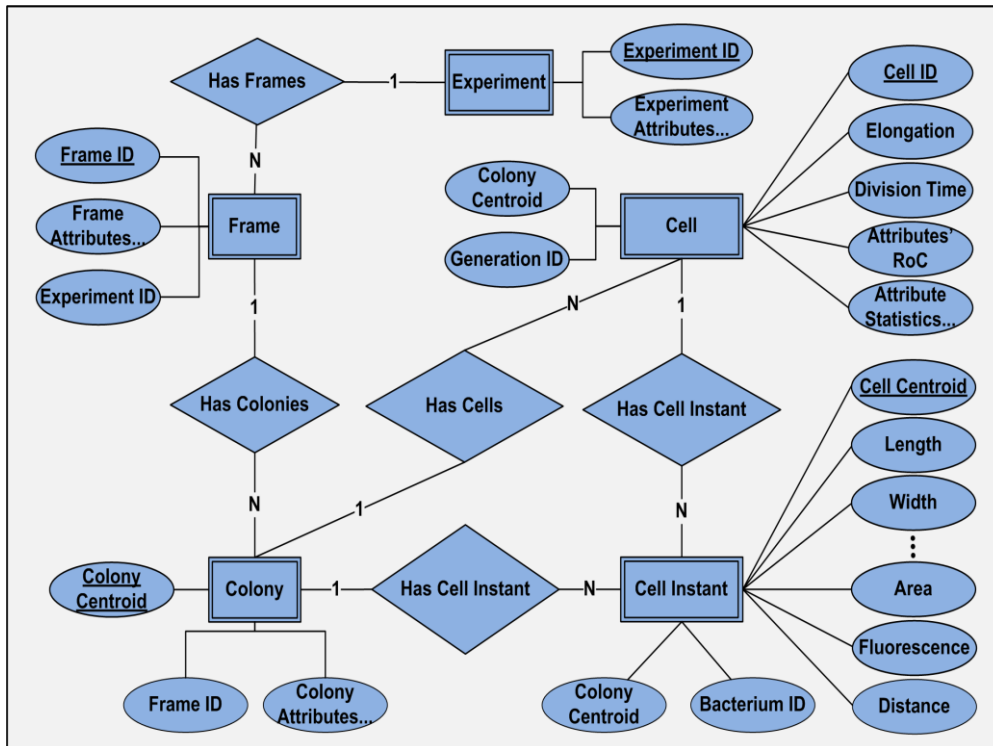
Σχήμα 2. Στάδια υπολογιστικής προσέγγισης για την ανάλυση κυτταρικών ταινιών, την μελέτη μεμονωμένων κυττάρων και την οπτικοποίηση κυτταρικών χαρακτηριστικών.

Για την ολοκλήρωση του παραδοτέου 24 (Π24), αναπτύξαμε μία πρωτότυπη μέθοδο [24] με την οποία επετεύχθη η αντιστοίχιση κυττάρων (tracking cells) μεταξύ συνεχόμενων στιγμιότυπων εικόνας (frames) κυτταρικών ταινιών και η δημιουργία δέντρων κυτταρικής γενεαλογίας (cell lineage tree construction) ώστε να καταστεί δυνατή η παρακολούθηση και ποσοτικοποίηση των ιδιοτήτων των κυττάρων ανά γενιά (π.χ. κυτταρική επιφάνεια, μήκος, πλάτος κ.α.). Η προσέγγιση που προτείνεται είναι εμπνευσμένη από αλγορίθμους εκτίμησης κίνησης (motion estimation) για συμπίεση βίντεο [25] και αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η μόνη που βασίζεται σε επί τούτου (ad hoc) δυναμικό σχηματισμό γειτονιάς κυττάρων όπως και βέλτιστης αντιστοίχισης (optimal matching), ακολουθώντας τη στρατηγική του «διαίρει και βασίλευε» (divide and conquer).

4.2 Μελέτη μεμονωμένων κυττάρων

Ο συνδυασμός των τριών σταδίων (βλ. Σχήμα 2) οδήγησε στη δημιουργία μίας πρωτότυπης και αυτοματοποιημένης πλατφόρμας, για τη συλλογή των πληροφοριών που εξάγονται από την ανάλυση των εικόνων των κυτταρικών ταινιών, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρέμβαση του ανθρώπου-χρήστη. Τέτοιου είδους συστήματα ανάλυσης, υψηλής ακρίβειας και ρυθμοαπόδοσης, δεν υπάρχουν σήμερα παρόλο που είναι απολύτως απαραίτητα για την πρόοδο της συστημικής μικροβιολογίας και την ανάλυση δεδομένων μεγάλης κλίμακας, όπως οι ταινίες ανάπτυξης βακτηριακών κοινοτήτων πολλαπλών στιγμιότυπων. Επιπλέον, το η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, προτείνει την καινοτομία της παροχής στο χρήστη της δυνατότητας να μελετήσει στατιστικά και να οπτικοποιήσει με διαφορετικούς τρόπους τις πληροφορίες που εξάγονται από τις κυτταρικές ταινίες σχετικά με το μορφολογία αλλά και την έκφραση των κυττάρων, αλλά και

πληθώρα άλλων δυνατοτήτων όπως να επιχειρεί συσχετίσεις, κλπ. Επομένως, η οργάνωση και η μελέτη της πληροφορίας κατά αυτόν τον τρόπο κατέστησε δυνατή την πραγματοποίηση της μοντελοποίησης στα πλαίσια του Έργου 5.2



Σχήμα 4. Σχεσιακό μοντέλο της μεθοδολογίας ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων

4.2.1 Βάση δεδομένων για τα κυτταρικά χαρακτηριστικά

Για τις αποικίες, η μεθοδολογία μας υπολογίζει τις καμπύλες ανάπτυξης τους είτε βάσει του εμβαδού (σε μικρόμετρα ή σε συνολικό αριθμό εικονοστοιχείων) είτε βάσει του κυτταρικού πληθυσμού (μέσω της αυτόματης καταμέτρησης κυττάρων). Μετά τα πρώτα τρία στάδια της μεθοδολογίας ανάλυσης κυτταρικών ταινιών, είναι δυνατή η εξαγωγή διαφόρων χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων. Στο σύστημα αυτό, οι μορφολογικές ιδιότητες των μεμονωμένων κυττάρων χωρίζονται σε *χαρακτηριστικά* (attributes) και *χαρακτηριστικά διάρκειας ζωής* (life span attributes).

Τα *χαρακτηριστικά* είναι ιδιότητες μεμονωμένων κυττάρων που εξάγονται σε κάθε στιγμιότυπο εικόνας της κυτταρικής ταινίας. τα κυτταρικά χαρακτηριστικά που εξάγονται είναι: 1) η επιφάνεια, 2) η ποσότητα της φθορίζουσας πρωτεΐνης (αν υπάρχει), 3) μήκος, 4) πλάτος, 5) σχετική θέση στην αποικία (δηλαδή η απόσταση από το κεντροειδές της αποικίας), κλπ. Τα *χαρακτηριστικά διάρκειας ζωής* είναι στατιστικά (ελάχιστη, μέγιστη, μέση, ενδιάμεση τιμή και τυπική απόκλιση) των κυτταρικών χαρακτηριστικών που εξάγονται από το ιστορικό της παρακολούθησης των μεμονωμένων κυττάρων κατά τη διάρκεια της ζωής τους, δηλαδή τα στιγμιότυπα από τη γέννηση τους μέχρι τη διαίρεσή τους. Επιπλέον, ορίζεται η επιμήκυνση, δηλαδή το τελικό μήκος κυττάρου μείον το αρχικό μήκος του και ο χρόνος διαίρεσης, δηλαδή η χρονική στιγμή διαίρεσης μείον τη χρονική στιγμή γέννησης του κυττάρου, ως *χαρακτηριστικά διάρκειας ζωής*. Επίσης, δεδομένης της καταγραφής της εξέλιξης ενός κυτταρικού *χαρακτηριστικού* υπολογίζεται ο ρυθμός μεταβολής (rate of change, RoC) του, π.χ. ο ρυθμός επιμήκυνσης ενός βακτηρίου. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά υπολογίζονται και αποθηκεύονται για κάθε βακτήριο ατομικά.

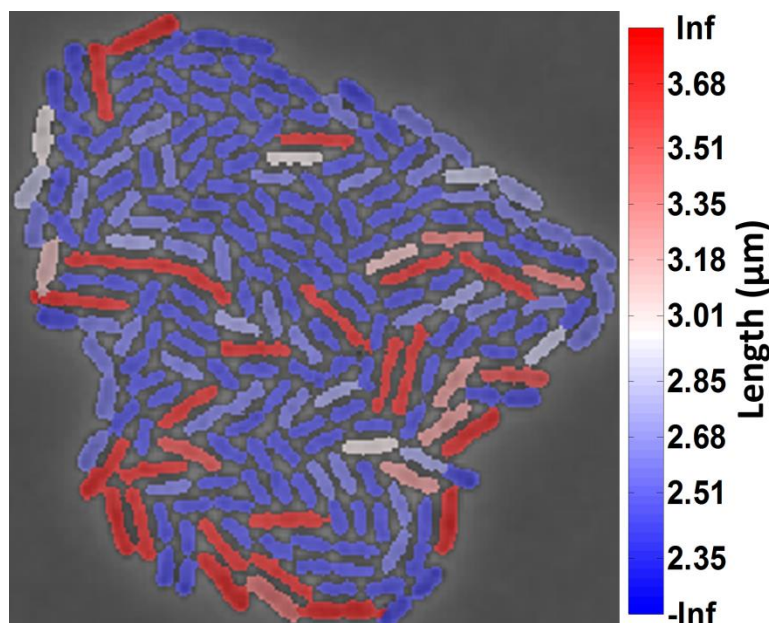
Τα δεδομένα που αφορούν μεμονωμένα κύτταρα και αποικίες (ή γενικότερα μια κυτταρική ταινία) οργανώνονται σε μια βάση βιολογικών δεδομένων, βλ. Σχήμα 4. Ένα τέτοιο σύστημα εφαρμόζεται εν συνεχεία για να επιτρέψει την ατομοστραφή μοντελοποίηση και διεξαγωγή πειραμάτων in silico.

4.2.2 Οπτικοποίηση και μελέτη χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων

Η μεθοδολογία μας δίνει τη δυνατότητα μελέτης της αποθηκευμένης πληροφορίας με ποικίλους τρόπους, όπως οπτικοποίηση και στατιστική ανάλυση των κυτταρικών χαρακτηριστικών, από το χρήστη. Βασικός στόχος μας ήταν η ενσωμάτωση αυτών των δυνατοτήτων σε ένα ενιαίο πληροφοριακό σύστημα που να επιτρέπει την ανάλυση «μεγάλων δεδομένων», η οποία αδιαμφισβήτητα, θα ευνοήσει σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη της συστημικής μικροβιολογίας.

Αρχικά, αναπτύχθηκαν οι δυνατότητες της οπτικοποίησης και ανάλυσης των δεδομένων. Χρησιμοποιώντας το Matlab για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και την οπτικοποίηση σε στιγμιότυπα κυτταρικών ταινιών, έχουν δημιουργηθεί ορισμένα αποτελέσματα. Επίσης, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα ήδη υπάρχοντα λογισμικά για την οπτικοποίηση δενδρικών δομών, όπως το Tulip [26], αποκτήσαμε τη δυνατότητα να οπτικοποιούμε τα κυτταρικά χαρακτηριστικά πάνω στα δέντρα γενεαλογίας και να δημιουργούμε συμπυκνμένα δέντρα διαιρέσεων.

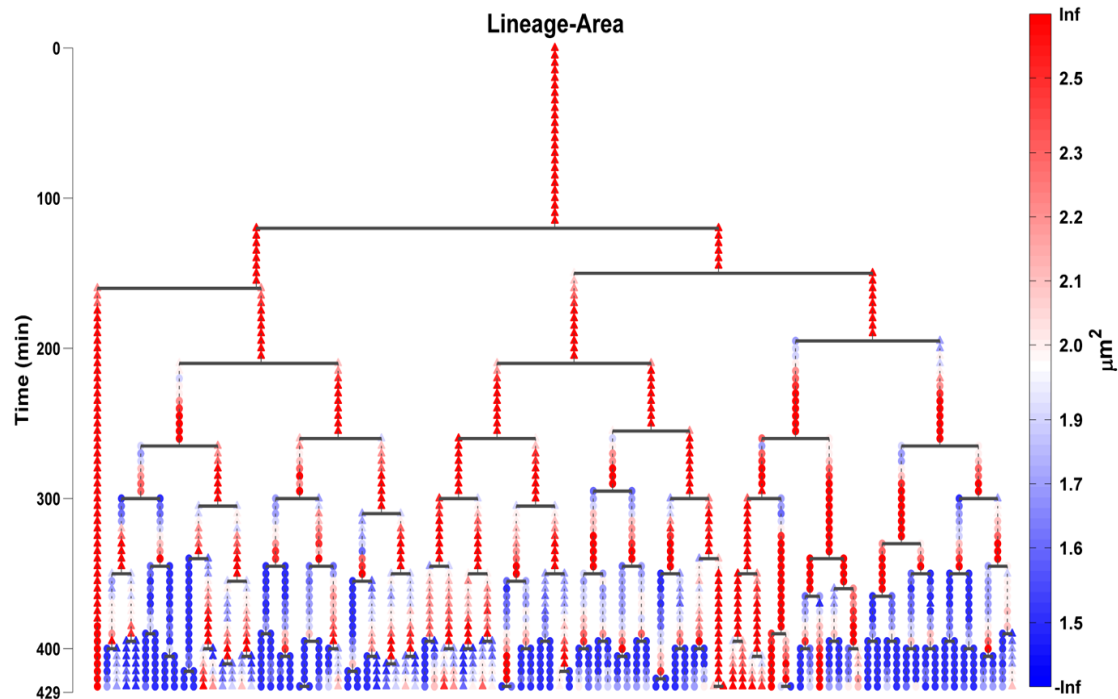
Οπτικοποίηση: Η πληροφορία μπορεί να οπτικοποιηθεί είτε απευθείας πάνω στις εικόνες που έχουν εισαχθεί στο σύστημα είτε πάνω στα δέντρα γενεαλογίας που έχουν δημιουργηθεί από τη μεθοδολογία ανάλυσης κυτταρικών ταινιών (βλ. Σχήμα 2). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται το κυτταρικό μήκος με ενδεικτικό το χρώμα στις επιφάνειές τους, πάνω σε ένα στιγμιότυπο εικόνας, σύμφωνα με το πόσο μακρύ (κόκκινο) ή πόσο κοντό (μπλε) είναι ένα βακτήριο. Με αυτό τον τρόπο οπτικοποίησης, ο χρήστης μπορεί να μελετήσει κάθε βακτήριο ξεχωριστά και να επικεντρωθεί σε όποιο τον ενδιαφέρει περισσότερο.



Σχήμα 5. Δυνατότητα οπτικοποίησης κυτταρικών χαρακτηριστικών (μήκος κυττάρου) σε στιγμιότυπα εικόνας.

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η κυτταρική επιφάνεια (μέγεθος), ενώ έχουν χρωματιστεί οι κόμβοι του δέντρου κυτταρικής γενεαλογίας σύμφωνα με το πόσο μεγάλο (κόκκινο) ή πόσο μικρό (μπλε)

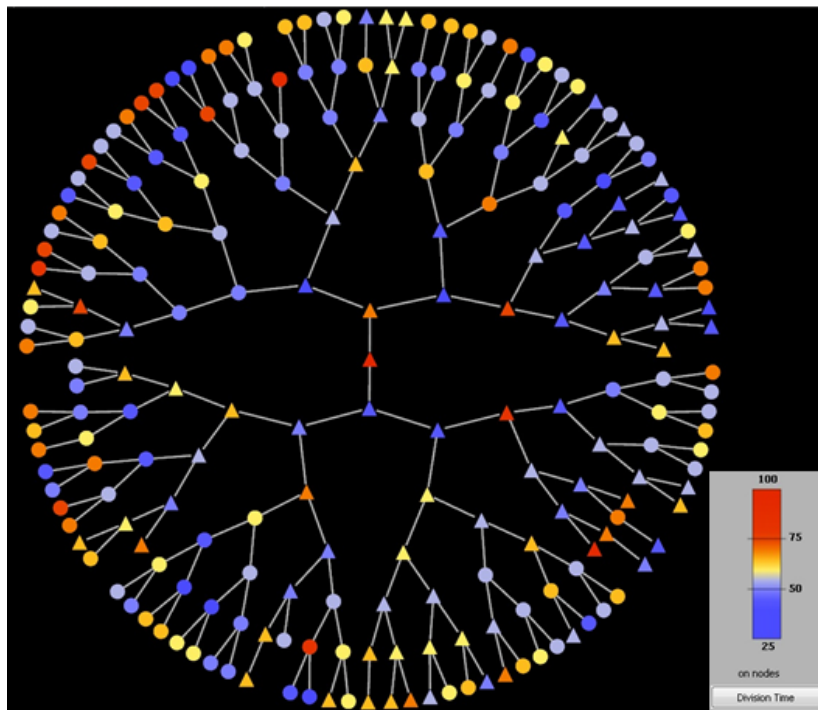
είναι ένα βακτήριο. Με αυτό τον τρόπο οπτικοποίησης, ο χρήστης μπορεί να μελετήσει την εξέλιξη ενός κυτταρικού χαρακτηριστικού κατά τη διάρκεια της ζωής ενός κυττάρου, αλλά και κατά τη διάρκεια του πειράματος εν γένει. Επίσης δύναται να ξεχωρίσει κάποια βακτήρια που έχουν αποκλίνουσες συμπεριφορές, π.χ. νηματοειδή βακτήρια (filamentous cells).



Σχήμα 6. Δυνατότητα οπτικοποίησης κυτταρικών χαρακτηριστικών στιγμιότυπου (επιφάνεια κυττάρου) στο δέντρο της κυτταρικής γενεαλογίας.

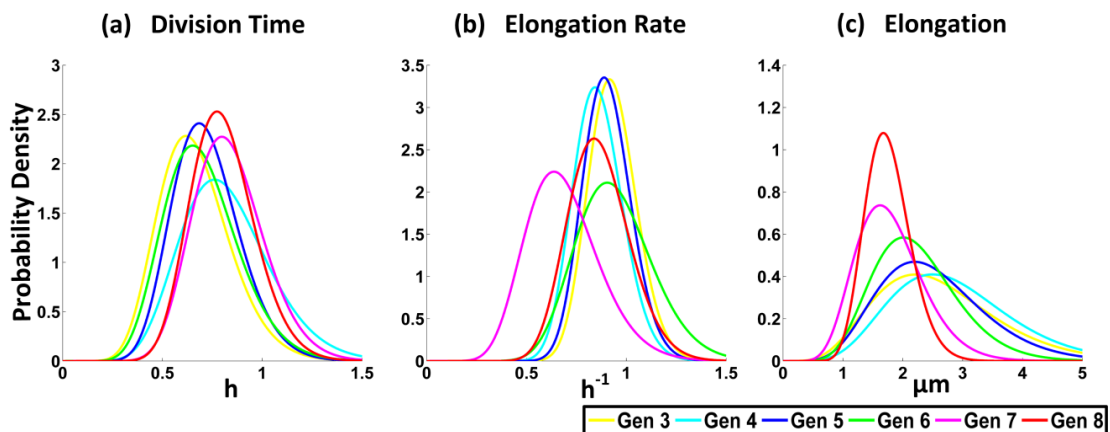
Στο Σχήμα 7 παρουσιάζεται ο χρόνος διαίρεσης με χρωματισμένους τους κόμβους του δέντρου κυτταρικών διαιρέσεων, ανάλογα με το πόσο μεγάλο (κόκκινο) ή πόσο μικρό (μπλε) χρόνο διαίρεσης έχει ένα βακτήριο. Με αυτό τον τρόπο οπτικοποίησης, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να μελετήσει την εξέλιξη ενός χαρακτηριστικού διάρκειας ζωής ενός κυττάρου αλλά και κατά τις γενιές του πειράματος. Και σε αυτή τη δυνατότητα οπτικοποίησης ο χρήστης μπορεί να ξεχωρίσει όποια βακτήρια έχουν αποκλίνουσες συμπεριφορές, π.χ. αυτά που δε διαιρούνται ή βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση.

Division Tree-Division Time



Σχήμα 7. Δυνατότητα οπτικοποίησης κυτταρικών χαρακτηριστικών. Εδώ: διάρκεια ζωής (χρόνος διαίρεσης κυττάρου) στο δέντρο των κυτταρικών διαιρέσεων.

Στατιστική Ανάλυση: Στο Σχήμα 8 παρουσιάζονται οι κατανομές του χρόνου διαίρεσης, της επιμήκυνσης και του ρυθμού επιμήκυνσης ανά γενιά για όλες τις γενιές που εμφανίζονται σε μια κυτταρική ταινία. Με αυτό τον τρόπο στατιστικής ανάλυσης, ο χρήστης μπορεί να μελετήσει την εξέλιξη ενός χαρακτηριστικού διάρκειας ζωής των κυττάρων ανά γενιά. Μέσω αυτής της δυνατότητας ο χρήστης είναι σε θέση να παρατηρήσει συσχετίσεις που ενδέχεται να υπάρχουν στα διάφορα χαρακτηριστικά, π.χ. μείωση του μέσου όρου επιμήκυνσης όσο αυξάνονται οι γενιές.



Σχήμα 8. Δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης (κατανομές) κυτταρικών χαρακτηριστικών.

4.3 Υπολογιστική μοντελοποίηση

Στα πλαίσια του Έργου 5.2, αποφασίστηκε λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει η συμπεριφορά των βιοϋμενίων, ο σχεδιασμός δύο διαφορετικών προσεγγίσεων προσομοίωσης του

φαινομένου, συνδυάζοντας τεχνικές μηχανικής μάθησης και υπολογιστικής μοντελοποίησης με σκοπό την ανάδειξη της χρησιμότητας του πληροφοριακού συστήματος ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων.

Στην πρώτη προσέγγιση (προσέγγιση Α) επιδιώχθηκε να δοθεί η δυνατότητα στο χρήστη της in silico μελέτης της ανάπτυξης των βιοϋμενίων σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ στη δεύτερη (προσέγγιση Β) της in silico μελέτης της ανάπτυξης μικρο-αποικιών (στις δύο διαστάσεις) και της γονιδιακής έκφρασης των επιμέρους βακτηρίων όσον αφορά στο μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας της *S. Typhimurium*. Μέσω και των δύο προσεγγίσεων μπορούν να εφαρμοσθούν διάφορες αρχικές συνθήκες στο σύστημα και να γίνουν προβλέψεις κατάλληλες για σύγκριση με πειραματικά δεδομένα.

4.3.1 Σενάρια μοντελοποίησης

Για την προσέγγιση Α αναπτύχθηκε αρχικά ένα μαθηματικό και στη συνέχεια υπολογιστικό μοντέλο με στόχο να προσομοιώνει στοχαστικά την ανάπτυξη βιοϋμενίων από το στάδιο των μεμονωμένων κυττάρων στο στάδιο τρισδιάστατων αποικιών λαμβάνοντας υπόψη το μικρο-περιβάλλον και περιορισμό θρεπτικών υποστρωμάτων. Αφού μελετήθηκε η υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθορίστηκαν οι προδιαγραφές της μεθόδου ώστε να είναι χρηστική και λειτουργική για τις ανάγκες της προσέγγισης. Συγκεκριμένα, τροποποιήθηκε το λογισμικό *iDynoMiCs* [22] για να επιτευχθεί η στοχαστική ανάπτυξη των βακτηρίων με βάση την ατομοστραφή μοντελοποίηση. Το ίδιο μοντέλο παραμετροποιήθηκε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (όσον αφορά το περιβάλλον προσομοίωσης) και από τα δεδομένα που εξήχθησαν από ανάλυση κυτταρικών ταινιών με τη προτεινόμενη μεθοδολογία του Σχήματος 2 (όσον αφορά στο ατομοστραφές μοντέλο ανάπτυξης των βακτηρίων).

Πίνακας 1. Στοιχειομετρικός πίνακας των αντιδράσεων της προσέγγισης Α.

Process	Biomass			Solutes		Kinetic expression
	Heterotrophs	EPS	Inert	CODS*	O ₂	
Growth	$1-Y_{EPS}$	Y_{EPS}	-	$-\frac{1}{Y}$	$-\frac{1-Y}{Y}$	$\mu_{max} \frac{S_{CODS}}{K_{CODS}+S_{CODS}} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2}+S_{O_2}} X$
Maintenance (Respiration)	-1	-	-	-	-1	$b_m \frac{S_{O_2}}{K_{O_2}+S_{O_2}} X$
Inactivation (Decay)	-1	-	1	-	-	$b_r X$

*COD stands for Chemical Oxygen Demand, organic substrate is expressed as soluble COD, or subscript CODS

Πίνακας 2. Μεταβλητές της προσέγγισης Α.

Variables	Symbol	Units
Concentration of biomass (CODX*)	X	$gCODX/L$
Concentration of organic substrate (CODS)	S_{COD}	$gCODS/L$
Concentration of oxygen (O ₂)	S_{O_2}	gO_2/L

*Biomass is expressed as solid COD, or subscript CODX

Πίνακας 3. Παραμετροποίηση των αντιδράσεων της προσέγγισης Α.

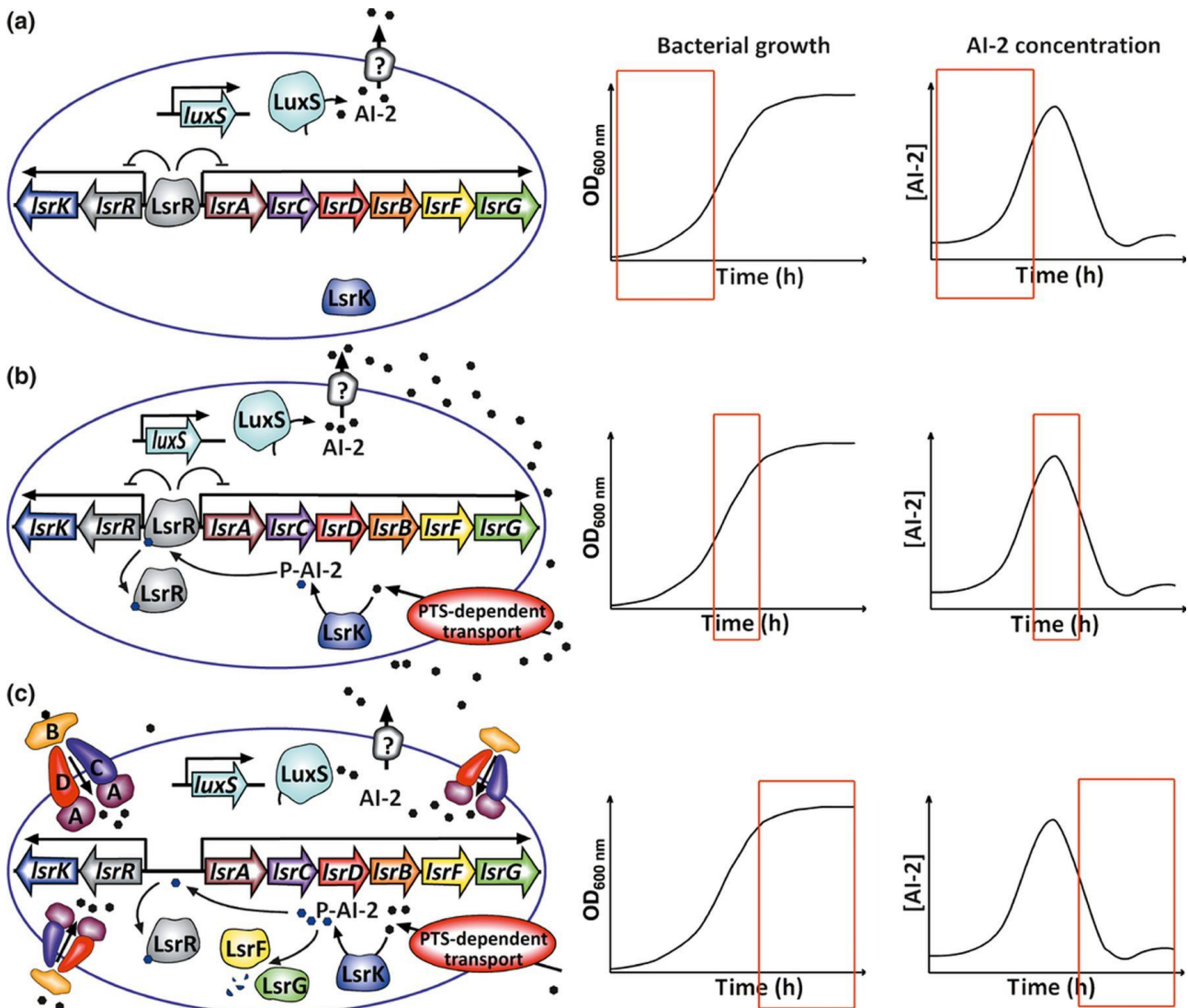
Parameter	Symbol	Units	Source
Maximum growth rate	μ_{max}	h^{-1}	Our data

Biomass yield	Y	$gCODX/gCODS$	[22]
EPS yield	Y_{EPS}	$gCODX/gCODX$	Assumed
Saturation constant for CODS	K_{CODS}	$gCODS/L$	[22]
Saturation constant for O_2	K_{O_2}	gO_2/L	[22]
Maintenance rate	b_m	h^{-1}	[22]
Inactivation rate	b_i	h^{-1}	[22]
Biomass and inert density	ρ_x	$gCODX/L$	Assumed
EPS density	ρ_{EPS}	$gCODX/L$	Assumed

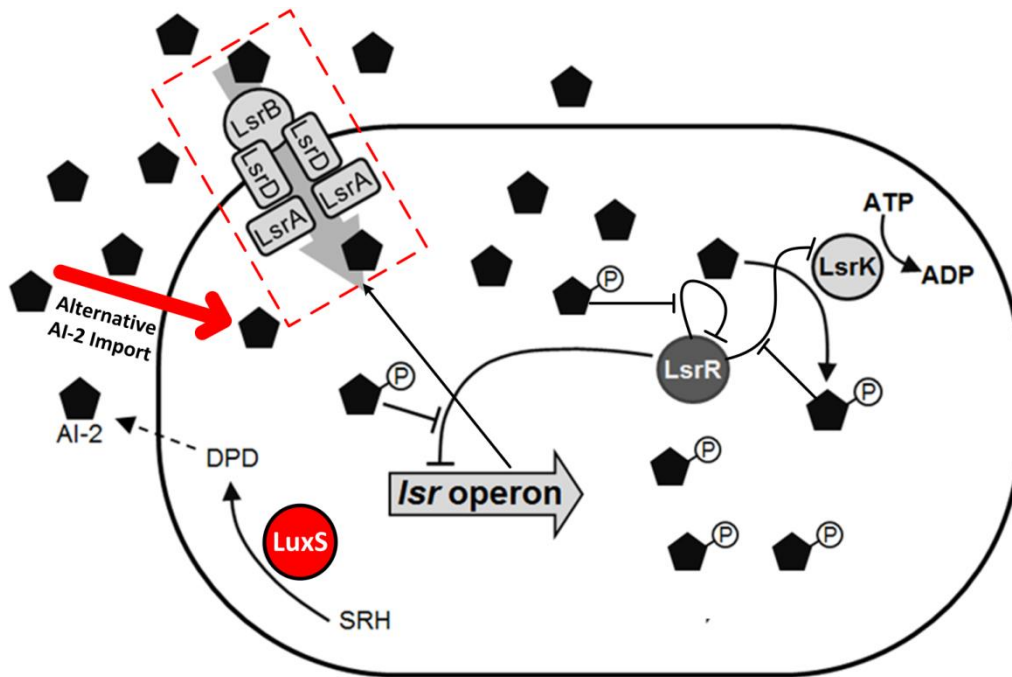
Πίνακας 4. Παραμετροποίηση του μικροπεριβάλλοντος της προσέγγισης Α.

Parameter	Symbol	Value	Units	Source
Influent CODS	COD_{in}	10^{-3}	$gCODS/L$	[22]
Influent O_2	O_2	10^{-3}	gO_2/L	[22]
Specific area	σ_R	80	m^2/m^3	[22]
Erosion strength	k_{Det}	$16 \cdot 10^{-6}$	$1/(\mu m \cdot h)$	[22]
O_2 diffusion coefficient in pure water	D_{O_2}	$2 \cdot 10^{-4}$	m^2/d	[22]
COD diffusion coefficient in pure water	D_{CODS}	$1 \cdot 10^{-4}$	m^2/d	[22]

Η παράμετρος διαχυτότητας βιοϋμενίου είναι ένας παράγοντας που χρησιμοποιείται για να μειωθεί η διαχυτότητα του διαλύματος μέσα στο βιοϋμένιο. Είναι ένας πολλαπλασιαστικός παράγοντας που εφαρμόζεται στη διαχυτότητα του νερού. Οι τιμές γύρω στο 0.8 είναι συνηθισμένες ενώ οι τιμές χαμηλότερες από 0.5 είναι σπανιότερες.

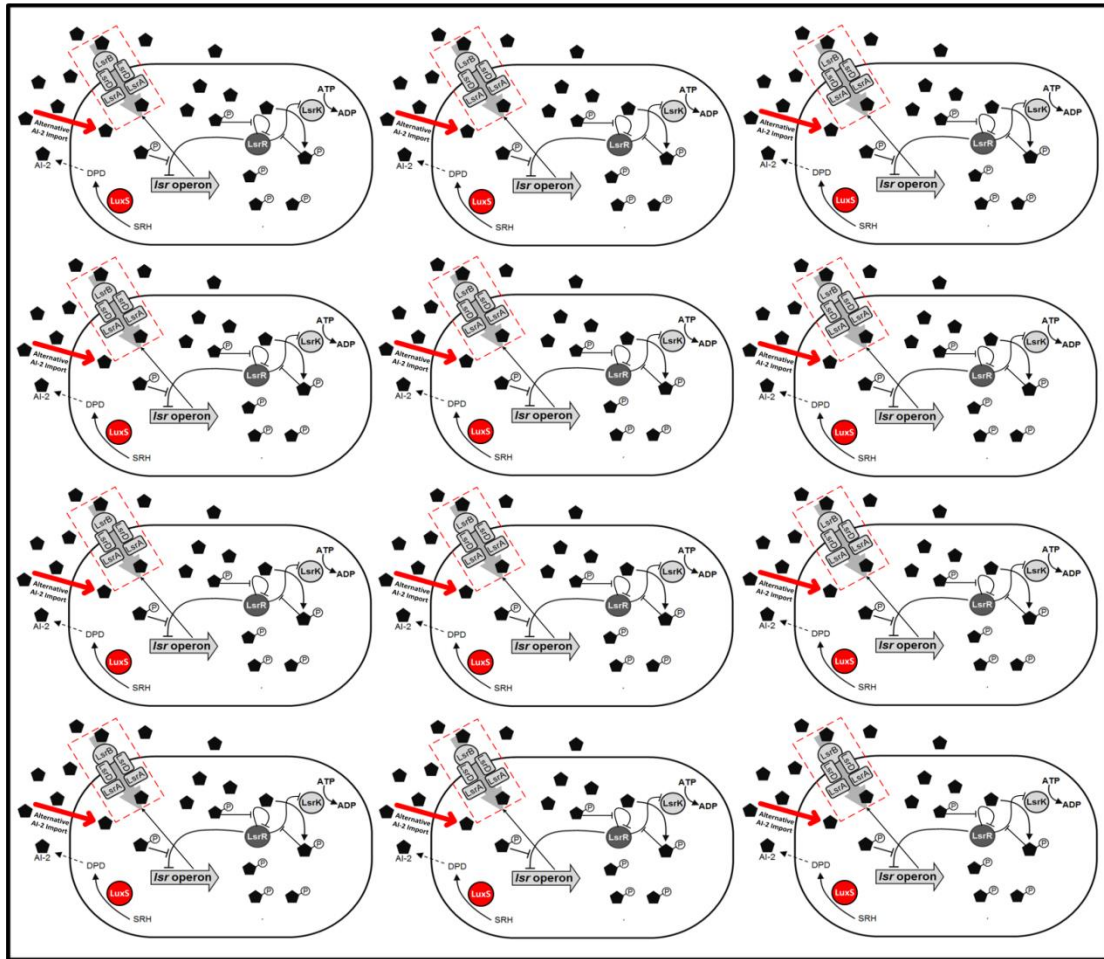


Σχήμα 9. Τρέχον μοντέλο για την ανίχνευση, την απορρόφηση και τη σηματοδότηση του AI-2 μέσω του συστήματος Lsr (σχήμα προσαρμοσμένο από το [27]). a) Κατά τη διάρκεια της πρώιμης βακτηριακής ανάπτυξης, μόνο λίγα μόρια AI-2 βρίσκονται εξωκυτταρικά. Η καταστολή της LsrR είναι ενεργή και η έκφραση του συστήματος Lsr βρίσκεται σε αναστολή. b) Καθώς επακολουθεί η φάση ανάπτυξης και το AI-2 συγκεντρώνεται εξωκυτταρικά, το AI-2 απορροφάται και φωσφορυλιώνεται από την LsrK. Το φωσφορυλιωμένο AI-2 (Phosphorylated-AI-2, P-AI-2) δένεται στην LsrR, και οδηγεί στην επαγωγή του οπερονίου *lsr*, και των γονιδίων *lsrR* και *lsrK*. (c) Η μεταφορά AI-2 που εξαρτάται από την Lsr ξεκινάει. Το AI-2 δένεται στην περιπλασμική δεσμευτική πρωτεΐνη, LsrB, και εισάγεται από τον μεταφορέα Lsr, ο οποίος σχηματίζεται από δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, την LsrC και την LsrD, και την πρωτεΐνη δέσμευσης ATP LsrA. Περισσότερο P-AI-2 παράγεται και έτσι σε υψηλούς κυτταρικούς πληθυσμούς ο μεταφορέας επάγεται περισσότερο. Η εισαγωγή AI-2 αυξάνεται και η εξωκυτταρική ποσότητα του AI-2 εξαντλείται ραγδαία, ως αποτέλεσμα του μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης (positive feedback loop). Η LsrG και η LsrF αποσυνθέτουν το P-AI-2. Πρόσφατα προτάθηκε ότι η αρχική απορρόφηση AI-2 συμβαίνει μέσω ενός μηχανισμού μεταφοράς που βασίζεται στο phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (PTS) (PTS-dependent transport), αλλά οι περμεάσες που αναμειγνύονται σε αυτή τη διεργασία είναι ακόμα άγνωστες.



Σχήμα 10. Ρυθμιστικό γονιδιακό δίκτυο του απλοποιημένου μηχανισμού διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας LsrR/AI-2 της *S. Typhimurium*. Έχουμε αφαιρέσει το μηχανισμό της αποσύνθεσης του P-AI-2 και θεωρούμε το μηχανισμό εισαγωγής AI-2 ως ένα ενιαίο σύμπλεγμα πρωτεϊνών.

Για την προσέγγιση B αναπτύχθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο με στόχο την προσομοίωση της ανάπτυξης μεμονωμένων κυττάρων σε μικρό-αποικίες λαμβάνοντας υπόψη το μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας των βακτηρίων της *S. Typhimurium* (σύστημα LsrR/AI2 [27], βλ. Σχήμα 10). Αφού μελετήθηκε η υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθορίστηκαν οι προδιαγραφές της μεθόδου ώστε να είναι χρηστική και λειτουργική για τις ανάγκες της προσέγγισης. Συγκεκριμένα, τροποποιήθηκε το λογισμικό *CellModeller* [21] με στόχο να επιτευχθεί η προσομοίωση αυτή. Αφού απλοποιήσαμε το μηχανισμό διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (βλ. Σχήμα 10), προέκυψε το αντίστοιχο ρυθμιστικό γονιδιακό δίκτυο του μηχανισμού. Το μοντέλο αυτό παραμετροποιήθηκε από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (όσον αφορά το γονιδιακό ρυθμιστικό δίκτυο) [27][28] και από τα δεδομένα που εξήχθησαν από ανάλυση κυτταρικών ταινιών με τη προτεινόμενη μεθοδολογία του Σχήματος 2 (όσον αφορά στο ατομοστραφές μοντέλο ανάπτυξης των βακτηρίων). Οι συνήθεις διαφορικές εξισώσεις που προέκυψαν από το γονιδιακό ρυθμιστικό δίκτυο και παραμετροποίησή τους παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6. Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται το θεωρητικό μοντέλο τη προσομοίωσης των μικροβιακών αποικιών που ακολουθεί το ατομοστραφές μοντέλο.



Σχήμα 11. Μοντέλο προσομοίωση αλληλεπίδρασης των βακτηρίων σε μικροβιακές κοινότητες μέσω της χημικής διακυτταρικής επικοινωνίας.

Πίνακας 5. Οι συνήθεις διαφορικές εξισώσεις που προκύπτουν από το ρυθμιστικό γονιδιακό δίκτυο του μηχανισμού διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας LsrR/AI-2 της *S. Typhimurium*.

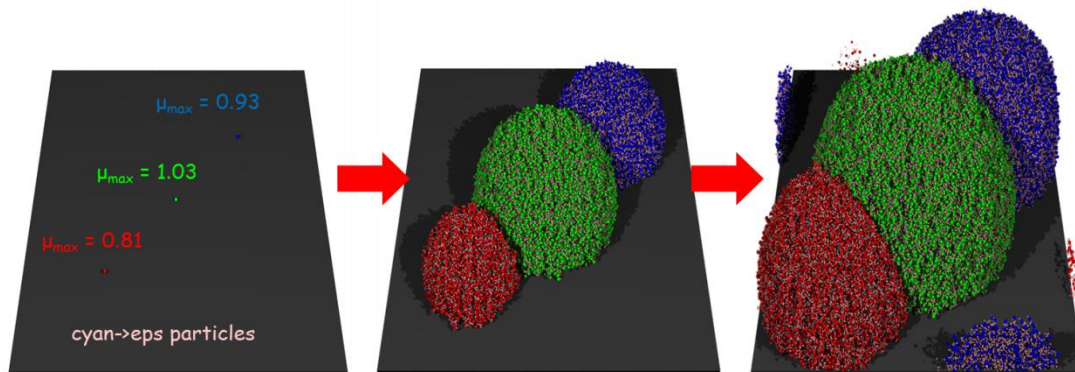
Reaction	Differential equation
Lsr-operon synthesis	$\frac{d[OP]}{dt} = \frac{k_{OP}}{1 + \left(\frac{[R]}{K_{OP}}\right)^{n_{OP}}} - \delta[OP]$
LsrR synthesis	$\frac{d[R]}{dt} = \frac{k_R}{1 + \left(\frac{[R]}{K_R}\right)^{n_R}} - \delta[R] - k_{ApR}[Ap][R]$
LsrK synthesis	$\frac{d[K]}{dt} = \frac{k_K}{1 + \left(\frac{[R]}{K_K}\right)^{n_K}} - \delta[K]$
LuxS synthesis	$\frac{d[S]}{dt} = b_S - \delta[S]$
AI-2 inside cell	$\frac{d[A]}{dt} = k_S[S] - k_{phos}[K][A] + \left(k_f[A_{out}] + k_{imp}[OP][A_{out}] - k_{out}[A]\right) \frac{S}{V_{cell}}$
P-AI-2 inside cell	$\frac{d[Ap]}{dt} = k_{phos}[K][A] - k_{ApR}[Ap][R]$
AI-2 outside cell	$\frac{d[A_{out}]}{dt} = \sum_{cells} \left(k_{out}[A] - k_f[A_{out}] - k_{imp}[OP][A_{out}]\right) \frac{S}{V_{cell}} + D\nabla^2[A_{out}]$
P-AI-2/LsrR interaction	$\frac{d[ApR]}{dt} = k_{ApR}[Ap][R] - \delta[ApR]$

Πίνακας 6. Η παραμετροποίηση των διαφορικών εξισώσεων του μηχανισμού διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας LsrR/AI-2 της *S. Typhimurium*.

Parameter	Description	Value
k_{OP}	Lsr-operon synthesis rate	2.3 $\mu\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
k_R	LsrR synthesis rate	2 min^{-1}
k_S	LuxS synthesis rate	2 min^{-1}
k_K	LsrK synthesis rate	2 min^{-1}
k_{phos}	AI-2 phosphorylation	2 min^{-1}
b_S	LuxS basal rate	2 min^{-1}
K_{OP}	Repression Coefficient Lsr-operon	0.2 μMol
K_R	Repression Coefficient LsrR	0.1 μMol
K_k	Repression Coefficient LsrK	0.1 μMol
k_f	AI-2 flux for the alternative pathway	0.0001 $\mu\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
k_{imp}	AI-2 import rate by Lsr-operon	0.0005 $\mu\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
k_{out}	AI-2 export rate by unknown mechanism	0.0005 $\mu\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
n_{OP}	Cooperativity coefficient Lsr-operon	4
n_R	Cooperativity coefficient LsrR	4
n_K	Cooperativity coefficient LsrK	4
δ	Protein degradation/dilution	0.02 min^{-1}
a_{ApR}	P-AI-2/LsrR binding rate	0.05 $\mu\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$

4.3.2 Αποτελέσματα Μοντελοποίησης

Στο Σχήμα 12, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από προσομοίωση κατά την προσέγγιση Α. Στην προσομοίωση αυτή παρουσιάζονται τρία είδη βακτηρίων με διαφορετικούς μέγιστους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης (maximum specific growth rates, μ_{max}). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κατανομές γάμμα (gamma distributions) για κάθε γενιά βακτηρίου, οι οποίες εκτιμήθηκαν από τα δεδομένα που εξήχθησαν από την ανάλυση κυτταρικών ταινιών, ώστε να δίνεται στα κύτταρα μέσω τυχαίας δειγματοληψίας (random sampling) το μήκος διαίρεσης τους κατά το διπλασιασμό τους. Μέσω της προσομοίωσης, παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη της βιομάζας είναι ανάλογη με το μ_{max} , όπως αναμενόταν, όμως το κυτταρικό μέγεθος ποικίλει, επειδή τα κύτταρα διαιρούνται στοχαστικά.



Σχήμα 12. Προσομοίωση του σχηματισμού και της σύνθεσης τρισδιάστατου βιοϋμενίου χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο λογισμικό iDynaMiCs [22] και τις κατανομές μήκους διαίρεσης που έχουν εξαχθεί από την προτεινόμενη μεθοδολογία ανάλυσης κυτταρικών ταινιών (Π21-Π24).

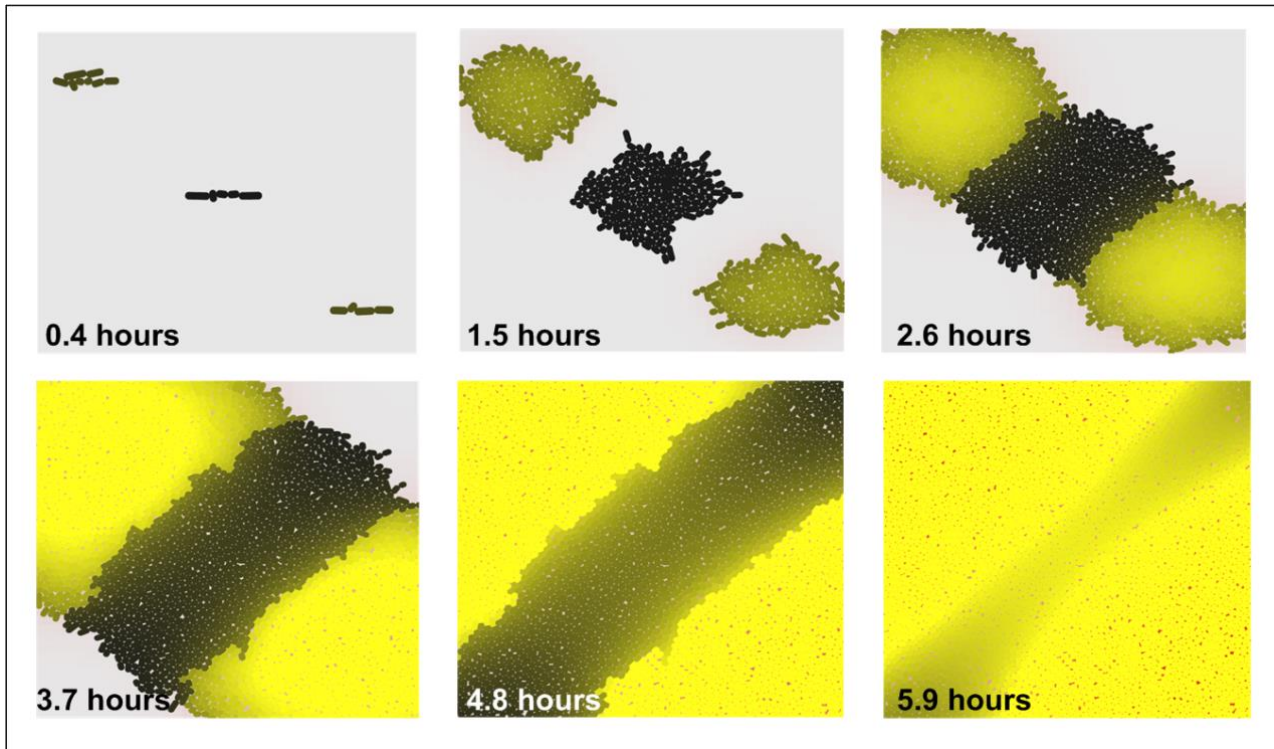
Στο Σχήμα 13, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από προσομοιώσεις της προσέγγισης Β. Στην προσομοίωση χρησιμοποιήθηκαν κατανομές γάμμα (gamma distributions) για κάθε γενιά βακτηρίου, οι οποίες εκτιμήθηκαν από τα δεδομένα που εξήχθησαν από την ανάλυση κυτταρικών ταινιών, με στόχο να δοθεί στο κάθε κύτταρο μέσω τυχαίας δειγματοληψίας (random sampling) ο χρόνος διαίρεσης και ο ρυθμός ανάπτυξής τους όταν γεννιούνται. Για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε το μήκος διαίρεσης ενός βακτηρίου υποθέτουμε ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου ακολουθεί το γραμμικό μοντέλο. Έτσι, εφόσον έχουμε πραγματοποιήσει τυχαία δειγματοληψία από τις κατανομές του χρόνου διαίρεσης και του ρυθμού ανάπτυξης μεμονωμένου κυττάρου σύμφωνα με τη γενιά στην οποία ανήκει κάθε βακτήριο, υπολογίζουμε το μήκος διαίρεσης ως εξής:

$$\Delta L = k \cdot \Delta T \Rightarrow L_{div} - L_{init} = k \cdot \Delta T \Rightarrow L_{div} = k \cdot \Delta T + L_{init}$$

όπου ΔL η επιμήκυνση του βακτηρίου, L_{div} το μήκος διαίρεσης του βακτηρίου, L_{init} το αρχικό μήκος του βακτηρίου (το οποίο προκύπτει από την προσομοίωση), k ο ρυθμός ανάπτυξης του βακτηρίου (από τη δειγματοληψία), και ΔT ο χρόνος διαίρεσης του βακτηρίου (από τη δειγματοληψία).

Σε αυτό το σενάριο προσομοίωσης, υπήρξαν δυο κυτταρικοί πληθυσμούς, ένας κίτρινος, που εκφράζει την πρωτεΐνη LuxS (η οποία συνθέτει τον επαγωγέα AI-2) και ένας μαύρος, στον οποίο έχουμε απενεργοποιήσει επιλεκτικά (knocked down) το γονίδιο της LuxS. Η ικανότητα του κάθε κυττάρου να εισάγει ή να εξάγει AI-2 εξαρτάται από την αναλογία του εμβαδού της επιφάνειας του

προς τον όγκο του (surface area to volume ratio, sa/vol). Έτσι, τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των μεμονωμένων κυττάρων συνδέονται με τη ρύθμιση της χημικής διακυτταρικής επικοινωνίας σε αυτό το σενάριο μοντελοποίησης. Το κίτρινο χρώμα αντιπροσωπεύει το επίπεδο έκφρασης του AI-2 σε κάθε κύτταρο. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι ο μαύρος πληθυσμός, με το απενεργοποιημένο γονίδιο, ο οποίος μπορεί μόνο να ανιχνεύσει και όχι να παράγει AI-2, γίνεται κίτρινος αργά και μετά από αρκετές ώρες, όταν το AI-2 είναι διάχυτο σε μεγάλο βαθμό στο περιβάλλον.



Σχήμα 13. Προσομοίωση αλληλεπίδρασης των βακτηρίων σε μικροβιακές κοινότητες μέσω της χημικής διακυτταρικής επικοινωνίας με το τροποποιημένο λογισμικό *CellModeller* [21] και τις κατανομές μήκους διαίρεσης και ρυθμού ανάπτυξης που έχουν εξαχθεί από την προτεινόμενη μεθοδολογία ανάλυσης κυτταρικών ταινιών.

Παράλληλα είχε επιτευχθεί επικοινωνία με την ερευνητική ομάδα από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης και συμφωνήθηκε η παροχή προς εμάς, κυτταρικών ταινιών από διαφορετικά είδη μικροσκοπίας με σκοπό να αναλυθούν με βάση τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε (Π21 και Π24). Με βάση τα αποτελέσματα που παράχθηκαν, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα για την κατανόηση της δυναμικής της ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων κάτω από διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες (π.χ. αλλαγή θερμοκρασίας κτλ.). Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν υπολογιστικές μέθοδοι που λαμβάνουν υπόψη την εγγενή στοχαστικότητα που επηρεάζει την ανάπτυξη μικροβιακών κοινοτήτων.

5 Σύνοψη

Η ανάλυση δεδομένων των κυτταρικών ταινιών μας επιτρέπει να «μεγεθύνουμε» και να παρατηρήσουμε δυναμικές βιολογικές διεργασίες σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων. Συνδυάζοντας τη στοχαστική μοντελοποίηση που βασίζεται στην εξαγωγή δεδομένων από την ανάλυση εικόνας σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, με τη μαθηματική μοντελοποίηση, είμαστε πια σε θέση να προβλέπουμε *in silico* πώς ο βιολογικός «θόρυβος» συντονίζει την συμπεριφορά σε επίπεδο κοινοτήτων σε διαφορετικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες, αλλά και να μελετούμε τη στοχαστικότητα σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων που επηρεάζει τις δυναμικές συνεργασίες, όπως τη δημιουργία βιοϋμενίων, την αλληλεπίδραση βακτηρίων που προέρχονται από διαφορετικά είδη κλπ. που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη συστημική μικροβιολογία.

Βιβλιογραφία

- [1] B. F. Brehm-Stecher and E. A. Johnson, “Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies and Applications,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 3, pp. 538-559, Sept. 2004.
- [2] J. C. W. Locke and M. B. Elowitz, “Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 383-392, May 2009.
- [3] Elfwing, Y. LeMarc, J. Baranyi, and A. Ballagi, “Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by Image Analysis,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 675-678, Feb. 2004.
- [4] H. Peng, “Bioimage informatics: a new area of engineering biology,” *Bioinformatics*, vol. 24, no. 17, pp. 1827-1836, Jul. 2008.
- [5] A. Bridier, F. Hammes, A. Canette, T. Bouchez, and R. Briandet, “Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology,” *Int. J. Food Microbiol.*, 2015.
- [6] C. Pin and J. Baranyi, “Kinetics of single cells: Observation and modeling of a stochastic process,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 2163-2169, Mar. 2006.
- [7] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. 2002. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 297:1183–1186.
- [8] Smits WK, Kuipers OP, Veening JW. 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:259-271.
- [9] K. P. Koutsoumanis and A. Lianou, “Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 7, pp. 2294-2301, Apr. 2013.
- [10] P. D. G. Wilson, T. F. Brocklehurst, S. Arino, D. Thuault, M. Jakobsen, M. Lange, J. Farkas, J. W. T. Wimpenny, and J. F. Van Impe, “Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 73, no. 2-3, pp. 275-289, 2002.
- [11] T. Ross and T. A. McMeekin, “Modeling microbial growth within food safety risk assessments,” *Risk Anal.*, vol. 23, no. 1, pp. 179-197, Feb. 2003.
- [12] L. M. M. Tack, F. Logist, E. Noriega Fernández, and J. F. M. Van Impe, “An individual-based modeling approach to simulate the effects of cellular nutrient competition on *Escherichia coli* K-12 MG1655 colony behavior and interactions in aerobic structured food systems,” *Food Microbiol.*, vol. 45, pp. 179–188, 2015.
- [13] C. Prats, A. Giró, J. Ferrer, D. López, and J. Vives-Rego, “Analysis and IBM simulation of the stages in bacterial lag phase: Basis for an updated definition,” *J. Theor. Biol.*, vol. 252, no. 1, pp. 56-68, 2008.
- [14] Yilmaz, O. Javed, and M. Shah, “Object tracking: A Survey,” *ACM Comput. Surv.*, vol. 38, no. 4, Jul. 2006.

- [15] Xie Liyin; Su Xiuqin; Zhang Shun, "A review of motion estimation algorithms for video compression," *Computer Application and System Modeling (ICCSM)*, 2010 International Conference on , vol.2, no., pp.V2-446,V2-450, 22-24 Oct. 2010
- [16] Klein, S. Leupold, I. Biegler, R. Biedendieck, R. Münch, and D. Jahn, "TLM-Tracker: software for cell segmentation, tracking and lineage analysis in time-lapse microscopy movies," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 17, pp. 2276-2277, Sep. 2012.
- [17] Q. Wang, J. Niemi, C. M. Tan, L. You, and M. West, "Image segmentation and dynamic lineage analysis in single-cell fluorescence microscopy," *Cytometry A.*, vol. 77, no. 1, pp. 101-110, Jan. 2010.
- [18] O. Sliusarenko, J. Heinritz, T. Emonet, and C. Jacobs-Wagner, "High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics," *Mol. Microbiol.*, vol. 80, no. 3, pp. 612-627, May 2011.
- [19] W. Young, J. C. W. Locke, A. Altinok, N. Rosenfeld, T. Bacarian, P. S. Swain, E. Mjolsness, and M. B. Elowitz, "Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy," *Nature Protocols*, vol. 7, no. 1, pp. 80-88, Dec. 2011.
- [20] J.-U. Kreft, C. M. Plugge, V. Grimm, C. Prats, J. H. J. Leveau, T. Banitz, S. Baines, J. Clark, A. Ros, I. Klapper, C. J. Topping, A. J. Field, A. Schuler, E. Litchman, and F. L. Hellweger, "Mighty small: Observing and modeling individual microbes becomes big science.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 45, pp. 18027-8, 2013.
- [21] 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, Jul 2012.
- [22] 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.
- [23] Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3: 371-394.
- [24] A. D. Balomenos, P. Tsakanikas, and E. S. Manolakos, "Tracking Single-Cells in Overcrowded Bacterial Colonies," In *Proceedings of IEEE Int'l Conference on Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC 2015)*, Milan, Aug. 2015, in press.
- [25] A. Barjatya, "Block Matching Algorithms For Motion Estimation," *IEEE Trans. Evol. Comput.*, vol. 8, pp. 225-229, 2004.
- [26] D. Auber, D. Archambault, R. Bourqui, A. Lambert, M. Mathiaut, et al.. "The Tulip 3 Framework: A Scalable Software Library for Information Visualization Applications Based on Relational Data," *Research Report RR-7860*, 2012, pp.31.
- [27] C. S. Pereira, J. a. Thompson, and K. B. Xavier, "AI-2-mediated signalling in bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 37, pp. 156-181, 2013.
- [28] S. Hooshangi and W. E. Bentley, "LsrR quorum sensing 'switch' is revealed by a bottom-up approach," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 9, 2011.

- [29] P. Melke, P. Sahlin, A. Levchenko, and H. Jönsson, “A cell-based model for quorum sensing in heterogeneous bacterial colonies,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 1-13, 2010.