

Modelagem matemática do efeito de *quorum sensing* na biossíntese de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Roberta Regina Delboni, Hyun Mo Yang

Lab - Epifisma, IMECC, UNICAMP,
13083-859, Campinas, SP

E-mail: rodelboni@ime.unicamp.br, hyunyang@ime.unicamp.br.

Resumo: Neste trabalho foi desenvolvido um modelo matemático de *quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *lactis* baseado no conhecimento bioquímico do sistema regulatório de biossíntese da nisina, composto por dois componentes (histidina quinase e regulador de resposta), e a própria nisina que, além de agir como peptídeo antimicrobiano, também age como sinal que induz sua própria biossíntese. A transcrição dos genes para biossíntese da nisina depende da concentração de nisina extracelular que por sua vez é dependente da densidade da população da cultura produtora. Através da análise do modelo é possível verificar o funcionamento do mecanismo *quorum sensing* pois, conforme demonstrado, quando a nisina atinge uma certa concentração limiar, o nível do regulador de resposta fosforilado aumenta significativamente, o que representa que o sistema regulatório (sistema *nis*) torna-se ativado.

1 Introdução

As bacteriocinas constituem um grande e heterogêneo grupo de proteínas e peptídeos sintetizados ribossomicamente com propriedades antibacterianas que variam quanto ao espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas [6]. A inclusão de compostos similares, com ação sobre uma diversidade maior de espécies, e cuja estrutura é formada por outros grupos funcionais (carboidratos, lipídeos), possibilitou uma definição mais ampla de bacteriocina [1].

A primeira bacteriocina produzida por bactéria láctica a ser descoberta foi a nisina, a partir da observação do metabolismo de uma linhagem especial de *Lactococcus lactis*, durante experimento realizado na Inglaterra em

1928. A primeira preparação comercial de nisina foi feita em 1953, porém a aprovação pelo FDA ocorreu apenas em 1988. Desde então, tem sido aprovado seu uso para determinados tipos de alimento, em cerca de 50 países, inclusive no Brasil. A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos alimentares do Codex Alimentarius da FAO, como GRAS (Generally Recognised As Safe).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que possui ação inibitória comprovada contra bactérias Gram positivas, incluindo *L. monocytogenes*, *Clostridium* sp. e algumas espécies de *Bacillus*. Esse antimicrobiano age provocando a lise de células vegetativas através da permeabilização da membrana citoplasmática, com a formação de poros que causam efluxo de constituintes intracelulares, levando a um complexo colapso da força próton motriz [8].

Tipicamente, bactérias com atividade bacteriocinogênica possuem genes que codificam a bacteriocina (peptídeo estrutural), proteínas que auxiliam no processamento da forma ativa, proteínas responsáveis pelo transporte da bacteriocina através da membrana, proteínas regulatórias e proteínas que conferem imunidade à célula produtora [2].

As proteínas relacionadas ao sistema regulatório correspondem: histidina quinase, fator de indução e regulador de resposta. O fator de indução é requerido como um sinal para a indução da transcrição dos genes alvo. Algumas vezes, o fator de indução pode ser a própria bacteriocina, como é o caso da nisina.

A figura (1) apresenta modelo de biossíntese da nisina e o sistema regulatório. A biossíntese envolve modificação e transporte do precursor sintetizado ribossomicamente por um complexo ancorado na membrana composto pelos

fatores B, C e T (codificados pelos genes nisBCT). O processamento da pré-nisina modificada é realizado pela protease codificada por NisP (P). Uma das funções da nisina é como peptídeo antimicrobiano (AMP), sendo que a própria célula produtora é protegida pelos fatores I e FEG (codificado pelos genes nisIFEG). Uma segunda função da nisina é como peptídeo feromônio que é sentido pelo domínio de entrada do sensor quinase (KI). Subseqüente, fosfotransferência do domínio transmissor do sensor quinase (KT) para o domínio receptor do regulador de resposta (RR) inicia a sua ativação. O domínio de saída (RO) do regulador de resposta ativado se ligará a caixa específica (nis-box, indicado como lan-box) iniciando a ativação da transcrição e aumentando a produção da nisina [7].

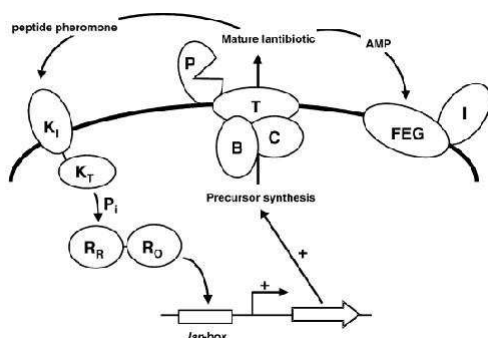


Figura 1: Modelo para biossíntese da nisina e sistema regulatório [7].

Já foi sugerido que a produção de bacteriocinas em algumas bactérias é parte de um mecanismo “quorum-sensing”. A expressão “quorum-sensing” denota um processo que ocorre em microorganismos e que envolve moléculas específicas que agem como sinais para indução do gene de expressão apenas quando uma certa concentração limiar dessas moléculas no ambiente for atingida. Quando o fator de indução atinge uma concentração limiar crítica no ambiente, desencadeia a transcrição da unidade reguladora (auto-ativação) assim como outros genes necessários para a produção da bacteriocina [11]. Além disso, com a produção massiva do peptídeo antimicrobiano em densidades celulares superiores, a célula produtora não permite ao organismo alvo (bactéria sensível) iniciar ou desenvolver uma reação de defesa,

assegurando a efetividade do peptídeo antimicrobiano [7]. Essa é uma maneira de comunicação célula-a-célula entre esses microorganismos e pode ser considerada como uma forma de multicelularidade.

Em bactérias Gram positivas o fenômeno de *quorum sensing* ocorre em processos tais como desenvolvimento de competência genética em *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae* [5], desenvolvimento de virulência em *Staphylococcus aureus* e produção de peptídeos antimicrobianos por várias espécies de bactérias lácticas.

Um dos casos melhor caracterizados de “quorum-sensing” em bactérias lácticas provém do conhecimento da biossíntese da nisina [9]. A transcrição dos genes para biossíntese da nisina depende da concentração de nisina extracelular que por sua vez é dependente da densidade da população da cultura produtora. A acidificação do meio devido ao metabolismo das bactérias lácticas pode ser um sinal indicando uma densa população dessas bactérias produtoras [4]. Além de agir como peptídeo antimicrobiano, a nisina também age como peptídeo feromônio secretado, que induz sua própria biossíntese, desencadeando o processo de transcrição o que corresponde a um mecanismo “quorum-sensing”.

2 Desenvolvimento do modelo

Como hipóteses para simplificação do modelo é assumido que a população bacteriana (*L. lactis subsp. lactis*) tem uma distribuição homogênea no meio, e o nível de mRNA é aproximado em equilíbrio quase estacionário como em [3], pois há evidências de que muitas proteínas são mais estáveis do que o mRNA que as codifica. Os componentes considerados no sistema são ao todo sete: enzima protease P , precursor da nisina B , nisina N , histidina quinase H , histidina quinase complexada H_C , regulador de resposta R e regulador de resposta fosforilado R_F . Essas variáveis denotam a quantidade total de componentes em uma população de η células.

Assume-se que os componentes P , B , H e R são sintetizados a uma taxa basal descrita pelo parâmetro β_i e expressa respectivamente como $\beta_P\eta$, $\beta_B\eta$, $\beta_H\eta$ e $\beta_R\eta$ para cada variável.

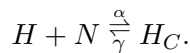
O efeito do regulador de resposta fosfori-

lado R_f na síntese de nisABCTCIPRK é descrito pela conhecida função de saturação de Monod, pois é assumido que as taxas de transcrição seguem a cinética Michaelis-Menten [3]. A síntese induzida de um dos componentes P , B , H e R tem um limite superior determinado por ν_P , ν_B , ν_H e ν_R respectivamente, enquanto que k_P , k_B , k_H e k_R descrevem as concentrações necessárias de cada respectivo componente, para que a biossíntese induzida por R_f seja metade da máxima possível. Assim, a síntese induzida por R_f é

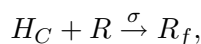
$$\phi_i(R_f) = \nu_i \eta \left(\frac{R_f}{R_f + \eta \nu_{int} k_i} \right).$$

Todos os elementos dos sistema decaem naturalmente a uma taxa μ_i , sendo que, para os componentes intracelulares, essa taxa inclui também o efeito de diluição devido à divisão celular.

O modelo geral para o funcionamento da proteína sensora quinase assume uma interação entre o fator de indução, nesse caso a própria nisina, e o domínio de entrada da proteína quinase ancorada na membrana celular. Assim, a histidina quinase (H) pode formar complexos com moléculas de nisina extracelular (N), via lei de ação das massas a uma taxa α , e que se dissocia à uma taxa γ , ou seja



Posterior à autofosforilação do resíduo histidina da proteína quinase, inicia-se uma cascata de sinais. O grupo fosforil de H_C é transferido a um aspartato em R , descrito pela reação

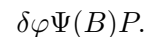


onde a defosforilação do regulador de resposta ocorre espontaneamente a uma taxa ρ .

Os componentes de modificação e secreção da nisina estão reunidos em um complexo de proteínas que interagem com o precursor da nisina. É assumido que a exportação do precursor segue a cinética de Michaelis-Menten. O limite superior da taxa de exportação é definido pelo parâmetro ν_{exp} , enquanto que o parâmetro k_{exp} denota a quantidade necessária de B para que a taxa de exportação atinja a metade da máxima possível. A expressão da exportação do precursor da nisina (B) para o meio extracelular é dado por

$$\Psi(B) = \nu_{exp} \eta \left(\frac{B}{B + \eta \nu_{int} k_{exp}} \right).$$

O grupo de genes codifica também uma enzima protease extracelular P , que está envolvida na remoção do peptídeo líder da pré-nisina, que já foi exportada para o meio extracelular, para finalmente gerar a molécula de nisina madura. Assim, assume-se que a protease interage com a pré-nisina exportada a uma taxa δ para a formação nisina, que é representado por



De acordo com o que foi assumido anteriormente, a dinâmica do modelo é descrita pelo seguinte sistema de equações diferenciais ordinárias não-lineares:

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = \beta_P \eta + \phi_P(R_f) - \mu_P P \\ \frac{dB}{dt} = \beta_B \eta + \phi_B(R_f) - \mu_B B - \Psi(B) \\ \frac{dN}{dt} = \delta \varphi \Psi(B) P - \varphi \alpha N H + \varphi \gamma H_C - \mu_N N \\ \frac{dH}{dt} = \beta_H \eta + \phi_H(R_f) - \mu_H H - \alpha N H + \gamma H_C \\ \frac{dH_C}{dt} = \alpha H N - \gamma H_C - \mu_{H_C} H_C \\ \frac{dR}{dt} = \beta_R \eta + \phi_R(R_f) - \mu_R R - \frac{\sigma}{\eta \nu_{int}} R H_C + \rho R_f \\ \frac{dR_f}{dt} = \frac{\sigma}{\eta \nu_{int}} R H_C - \rho R_f - \mu_{R_f} R_f. \end{cases} \quad (1)$$

3 Análise do modelo

As equações no estado estacionário são obtidas igualando-se a zero todas as derivadas do sistema de equações diferenciais (1).

De $\frac{dP}{dt}$ obtém-se

$$P = \frac{\eta(p\beta_p + \nu_p R_f)}{p\mu_p}, \quad (2)$$

sendo $p = (R_f + \eta \nu_{int} k_p)$, e, a partir de $\frac{dB}{dt}$, obtém-se uma equação de segundo grau para a variável B

$$a_2 B^2 + a_1 B + a_0 = 0,$$

onde os coeficientes a_i 's são dados por

$$a_2 = -b\mu_b,$$

$$a_1 = \eta[b\beta_b - b\mu_b\nu_{int}k_{exp} - b\nu_{exp} + \nu_b R_f],$$

$$a_0 = \eta^2\nu_{int}k_{exp}(b\beta_b + \nu_b R_f), \quad (3)$$

onde $b = (R_f + \eta\nu_{int}k_b)$.

Utilizando a regra de sinal de Descartes [10], observa-se que esta equação tem exatamente uma única solução real positiva B , para cada solução positiva R_f , pois $a_2 < 0$ e $a_0 > 0$.

Da equação para $\frac{dH_c}{dt}$ obtém-se

$$(\gamma + \mu_{H_c})H_c = \alpha H N. \quad (4)$$

Assim, multiplicando a equação para $\frac{dH}{dt}$ por $(\gamma + \mu_{H_c})$ e usando (4) obtém-se

$$hZH = \eta(\gamma + \mu_{H_c})(h\beta_H + \mu_H R_f),$$

sendo que $h = (R_f + \eta\nu_{int}k_H)$ e $Z = \mu_H(\gamma + \mu_{H_c}) + \mu_{H_c}\alpha N$.

Usando essa expressão e multiplicando (4) por hZ chega-se a seguinte equação para H_c

$$hZH_c = \alpha\eta(h\beta_H + \mu_H R_f).$$

Com os resultados apresentados anteriormente obtém-se a equação de segundo grau em N :

$$d_2 N^2 + d_1 N + d_0 = 0,$$

cujos coeficientes são dados por

$$d_2 = -\mu_{H_c}\alpha\mu_P\mu_N(B + \eta\nu_{int}k_{exp})hp,$$

$$d_1 = \delta\varphi\nu_{exp}\eta^2 B(\beta_P p + \nu_P R_f)\mu_{H_c}\alpha h$$

$$- \mu_{PP}(B + \eta\nu_{int}k_{exp})(\mu_H(\gamma + \mu_{H_c})h\mu_N)$$

$$- \mu_{PP}(B + \eta\nu_{int}k_{exp})(\eta\mu_{H_c}\varphi\alpha(\beta_H h + \nu_H R_f)),$$

$$d_0 = \delta\varphi\nu_{exp}\eta^2 B[\beta_P p + \nu_P R_f]\mu_H(\gamma + \mu_{H_c})h.$$

Pela regra de sinal de Descartes, independentemente do sinal do coeficiente d_1 , existe uma única solução real positiva N para a equação, pois $d_2 < 0$ e $d_0 > 0$ para cada valor positivo de R_f .

Multiplicando a equação para $\frac{dR}{dt}$ por hZ e usando a equação para H_c tem-se a seguinte equação para R :

$$\begin{aligned} & \nu_{int}h[\eta r\beta_R + (\nu_R + r\rho)R_f]Z \\ & = r\{\mu_R\nu_{int}hZ + \alpha\sigma N(h\beta_H + \nu_H R_f)\}R, \end{aligned}$$

sendo $r = (R_f + \eta\nu_{int}k_R)$.

Finalmente, a partir das expressões obtidas anteriormente chega-se a uma equação de terceiro grau para R_f

$$l_3 R_f^3 + l_2 R_f^2 + l_1 R_f + l_0 = 0,$$

cujos coeficientes são dados por

$$l_3 = -(\rho + \mu_{R_f})\mu_R\nu_{int}Z - \mu_{R_f}\sigma\alpha N(\beta_H + \nu_H),$$

$$\begin{aligned} l_2 &= \eta\sigma\alpha N(\beta_H + \nu_H)(\beta_R + \nu_R) \\ & - \eta\nu_{int}Z\mu_R\nu_{int}(\rho + \mu_{R_f})(k_H + k_R) \\ & - \eta\nu_{int}\left\{\mu_{R_f}\sigma\alpha N[\beta_H(k_H + k_R) + k_R\nu_H]\right\}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} l_1 &= \eta^2\nu_{int}\sigma\alpha N[(\beta_R + \nu_R)\beta_H k_H + (\beta_H + \nu_H)\beta_R k_R] \\ & - \eta^2\nu_{int}^2 k_H k_R \left\{(\rho + \mu_{R_f})\nu_{int}\mu_R Z + \mu_{R_f}\sigma\alpha\beta_H N\right\}, \end{aligned}$$

$$l_0 = \sigma\alpha\eta^3\nu_{int}^2\beta_H\beta_R k_H k_R N.$$

Esta equação tem certamente uma raiz real positiva, pois $l_3 < 0$, e $l_0 > 0$. Entretanto, se $l_2 > 0$ e $l_1 < 0$, podem existir três raízes reais positivas para a equação.

4 Resultados e Discussões

A variável R_f define a atividade do sistema. Usando a equação obtida anteriormente para a variável R_f e tomando N como um parâmetro de controle, para valores fixos dos parâmetros é produzida a curva resposta no plano NR_f (figura 2).

Verifica-se na figura (2) que concentrações crescentes do peptídeo nisina (N) afeta o nível do regulador de resposta fosforilado (R_f) em equilíbrio estacionário. Em baixas concentrações de N , o nível de R_f em estado estacionário também é baixo. Entretanto, quando N atinge uma certa concentração limiar, indicada na figura (2) por N_2 , o nível de R_f aumenta significativamente, o que representa que o sistema regulatório torna-se ativado.

O sistema somente inativa quando a concentração de N decresce a níveis significativamente menores do que aquele necessário para ativar o sistema (indicado na figura por N_1).

Caminhando para valores crescentes de N , em N_2 há brusco aumento da concentração do regulador de resposta fosforilado R_f . Por outro lado, para valores decrescentes da concentração de nisina (N) observa-se brusca diminuição de R_f em N_2 . Mudando o parâmetro de controle N , o sistema alterna entre os dois ramos estáveis, sendo que o ramo intermediário é instável. Os pontos indicados na figura como N_1 e N_2 correspondem aos pontos de bifurcação. Mostra-se assim o comportamento de histerese.

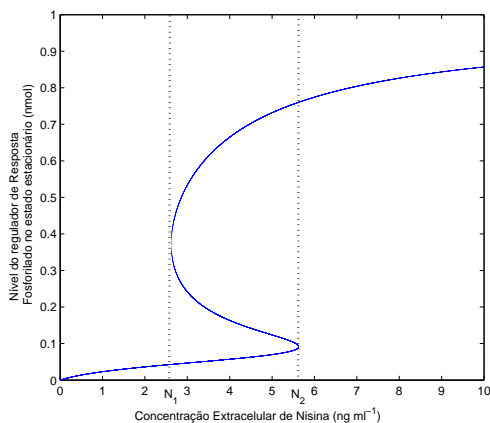


Figura 2: Concentração de Regulador de resposta fosforilado R_f em equilíbrio estacionário como função da concentração extracelular de nisina (N).

Referências

- [1] R. Bromberg, I. Moreno, R. R. Delboni e H. C. Cintra, Características da Bacteriocina Produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu Efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(1): 135-144, 2006.
- [2] A. A. T. Carvalho, Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga, *Dissertação*

(*Mestrado*), Univ. Fed. de Viçosa. Viçosa: UFV, 2006.

- [3] J. D. Dockery, J. P. Keener. A mathematical model for quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Bulletin of Mathematical Biology* **63** (2001), 95-116.
- [4] A. Dufour, T. Hindré, D. Haras, J. P. LePennec, The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age, *FEMS Microbiol. Rev.*, **31** (2007), 134-167.
- [5] D. Karlsson, *et al.*. Modeling the regulation of the competence-evoking quorum sensing network in *Streptococcus pneumoniae*, *BioSystems* 90, (2007), 211-223.
- [6] T. R. Klaenhammer, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the higienic quality of products, *FEMS Microbio. Rev.*, **12** (1993), 39-86.
- [7] M. Kleerebezem, Quorum sensing control of lantibiotic production: nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, *Peptides*, **25** (2004), 1405-1414.
- [8] M. F. Kruger, Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça fresca refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina, *Dissertação (Mestrado)*, SP - 2006.
- [9] O. P. Kuipers, P. G. G. A de Ruyster, M. Kleerebezem, W. M. de Vos, Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria, *Journal of Biotechnology*, **64** (1998), 15-21.
- [10] J. D. Murray, *Mathematical Biology. I: An Introduction*, Springer - 3rd ed., 2002.
- [11] D. Straume, M. Kjos, I. F. Nes, D. B. Diep, Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by n-terminally truncated species of gene activators, *Mol. Genet. Genomics*, **278** (2007), 283-293.