

УДК: 576.538:579.252.5:51-76

# Стохастическая модель внутриклеточной динамики многокопийных бактериальных плазмид с учетом контроля репликации

А.Н. Шуваев\*, А.В. Брильков\*\*

\*Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

\*\* Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, 660041, Россия

**Аннотация.** Исследовалась динамика бактериальных плазмид в случае малых смещений из стационарного состояния. Под смещениями понимали изменение числа копий плазмиды от стационарного значения. При этом использовалось приближение Фоккера-Планка для одношаговых процессов. Было обнаружено, что динамика плазмид происходит в форме процесса Орнштейна-Уленбека. Данные исследования позволяют судить, что гиперболический механизм ингибирования хорошо описывает процесс контроля репликации плазмид.

**Ключевые слова:** плазмиды, контроль репликации, одношаговый процесс, процесс Орнштейна-Уленбека, уравнение Фоккера-Планка

## 1. Введение

Бактериальные плазмиды представляют собой внехромосомные кольцевые молекулы ДНК. Они несут дополнительную информацию, необходимую для существования хозяйской клетки в неблагоприятных условиях. К последним можно отнести, например, присутствие антибиотиков и тяжелых металлов [1]. Также использование экстрахромосомных ДНК широко применяется в биотехнологии для получения активных штаммов-продуцентов. Однако в этом случае, как правило, плазмидсодержащие клетки через некоторое время исчезают из популяции. Это происходит из-за того, что бесплазмидные клетки растут быстрее и со временем замещают бактерии, несущие плазмиды. К настоящему времени показано, что рекомбинантные плазмидсодержащие штаммы микроорганизмов, сконструированные методами генной инженерии, часто оказываются неустойчивыми при интенсивном длительном культивировании [2–5].

В настоящей работе построена стохастическая модель эволюционной динамики плазмид с попыткой определения времени потери клетками своих плазмид. При этом под временем потери мы понимали время релаксации к состоянию с числом копий плазмид, равным 0. Непосредственно после деления бактерии плазмиды реплицируются параллельно с репликацией хромосомы. Чтобы стабильно наследоваться, количество копий плазмиды должно за этот период как минимум удвоиться. После окончания репликации хромосомы клетка делится, и весь генетический материал распределяется между двумя дочерними клетками (сегрегация). При случайном распределении плазмид каждая из дочерних клеток может получить разное их количество. В случае, если одна из этих клеток не получит ни одной

---

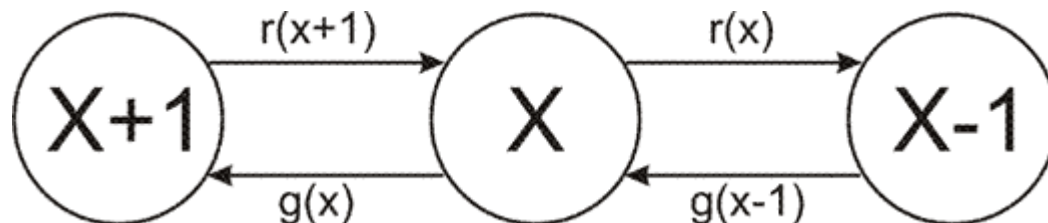
\* andrey-shuvaev@yandex.ru

\*\* abrilkov@lan.krasu.ru

плазмиды, возникает бесплазмидный штамм [1, 6]. Таким образом, поскольку в течение клеточного цикла количество плазмид варьирует, существует распределение клеток в популяции по количеству плазмид.

## 2. Модель динамики бактериальных плазмид

Каждая бактерия может развиваться по одному из трех возможных путей: потеря плазмид, увеличение их количества и случай, когда количество плазмид не изменяется. В первом приближении будем считать, что количество плазмид с каждым шагом увеличивается или уменьшается на одну. Такое приближение справедливо при достаточно большом количестве копий (порядка нескольких десятков). Этот процесс можно изобразить следующим образом (рис. 1).



**Рис. 1** Представление динамики плазмид в виде одношагового процесса:  $X$  – количество плазмид в данном состоянии,  $r(x)$  – вероятность потери одной копии плазмиды,  $g(x)$  – вероятность увеличения количества плазмид на 1. Переход осуществляется через дискретные промежутки времени – время между двумя последовательными делениями.

Здесь окружностями обозначены состояния,  $g(x)$  и  $r(x)$  – плотности вероятностей перехода между ними. Переход осуществляется через определенный интервал времени (время между двумя последовательными делениями). Если отсутствует передача плазмид между бактериями (взаимодействие между ними) в процессе конъюгации, то эта схема соответствует марковскому процессу.

Переходы между состояниями (рис. 1) обусловлены несколькими факторами. В первом приближении всех их можно разделить на две основные группы: 1) те, что увеличивают количество плазмид в бактерии или поддерживают это количество на постоянном уровне (репликация); 2) те, что уменьшают число плазмид. Количество плазмид в клетке может уменьшиться из-за замедленной репликации плазмиды по сравнению со скоростью хромосомной репликации или вследствие неравного распределения копий плазмид между дочерними клетками при делении (сегрегация). Последний механизм может контролироваться самой плазмидой (в случае малого числа копий).

*Репликация.* Вероятность репликации будем описывать, исходя из следующих предположений. При малом числе копий клетке выгодно увеличить их (мы считаем, что иницирующий фактор среды присутствует), поэтому  $P(x, t) \rightarrow 1$  при  $x \rightarrow 0$  и  $P(x, t) \rightarrow 0$  при  $x \rightarrow \infty$ . Исходя из современных представлений по контролю репликации [6], эту зависимость можно аппроксимировать гиперболической функцией. При нормировке следует учитывать ограниченность клеточных ресурсов на поддержание плазмид и интегрировать в пределах  $(0, X_{\max})$ . Тогда, с учетом нормировочного множителя  $C_{norm_{g,r}}$ , имеем:

$$g(x) = \frac{1}{1 + k_g x} C_{norm_{g,r}}, \quad \left( C_{norm_{g,r}} = \frac{k_g}{\ln(1 + k_g X_{\max})} \right). \quad (1)$$

*Сегрегация+Репликация.* Так как клетка не в состоянии нести слишком много плазмид ввиду ограниченности ресурсов, можно записать:  $P(x, t) \rightarrow 0$  при  $x \rightarrow 0$  и  $P(x, t) \rightarrow 1$  при  $x \rightarrow \infty$ . Таким образом, получаем следующую функцию для плотности вероятности потери плазмид:

$$r(x) = \frac{1}{1 + 1/k_r x} C_{norm_r}, \quad \left( C_{norm_r} = \frac{k_r}{X_{max} k_r - \ln(1 + k_r X_{max})} \right). \quad (2)$$

Величины  $k_g$  и  $k_r$  здесь играют роль параметров.

### 3. Моделирование одношагового процесса

Далее запишем управляющее уравнение, соответствующее схеме на рис. 1:

$$\frac{dp(x, t)}{dt} = r(x+1)p(x+1, t) + g(x-1)p(x-1, t) - (r(x) + g(x))p(x, t).$$

Эту зависимость можно представить в виде уравнения Фоккера-Планка (см. приложение):

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} [D_1(x)p(x, t)] + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} [D_2(x)p(x, t)], \quad (3)$$

где  $D_1(x) = g(x) - r(x)$ ,  $D_2 = g(x) + r(x)$ .

В общем виде уравнение (3) не всегда имеет решение. Однако его можно упростить, если рассматривать поведение решения около стационарной точки. Для этого воспользуемся подходом, который был предложен Бюргессом при исследовании флуктуаций электронных плотностей в полупроводниках [7]. Для этого достаточно знать, что  $g(x)$  монотонно убывает с  $x$ , а  $r(x)$  монотонно растет. Область пересечения двух кривых будет решением в стационарной точке системы уравнений (1, 2). В стационарной точке имеем  $r(x^{st}) = g(x^{st})$ . Далее положим

$$x = x^{st} + f, \quad (4)$$

где  $f$  – малое смещение из стационарной точки. Подставляя (4) в (3), разложив коэффициенты по  $f$  и оставив только не исчезающие члены, получаем:

$$\frac{\partial p(f, t)}{\partial t} = (r'(x^{st}) - g'(x^{st})) \frac{\partial}{\partial f} [fp(f, t)] + \frac{r(x^{st}) + g(x^{st})}{2} \frac{\partial^2 p(f, t)}{\partial f^2}. \quad (5)$$

Решение уравнения (5) известно – к положению равновесия система релаксирует в виде процесса Орнштейна-Уленбека [8,9]:

$$p(f, t | f_0, t_0) = \sqrt{\frac{\eta}{2\pi\xi(1 - \exp[-2\eta(t - t_0)])}} \exp\left[-\frac{\eta(f - f_0 \exp[-\eta(t - t_0)])^2}{2\xi(1 - \exp[-2\eta(t - t_0)])}\right]. \quad (6)$$

Здесь  $\eta = (r'(x^{st}) - g'(x^{st}))$ ,  $\xi = (r(x^{st}) + g(x^{st}))/2$ ,  $t_0$  – начальный момент времени,  $f_0$  – величина первоначального смещения из стационарной точки.

### 4. Модель динамики плазмид около стационарного положения

Приравнявая (1) и (2), получаем решение в стационарной точке. Оно имеет два корня. Поскольку отрицательного количества плазмид в клетке быть не может, выбираем  $x^{st} \geq 0$ :

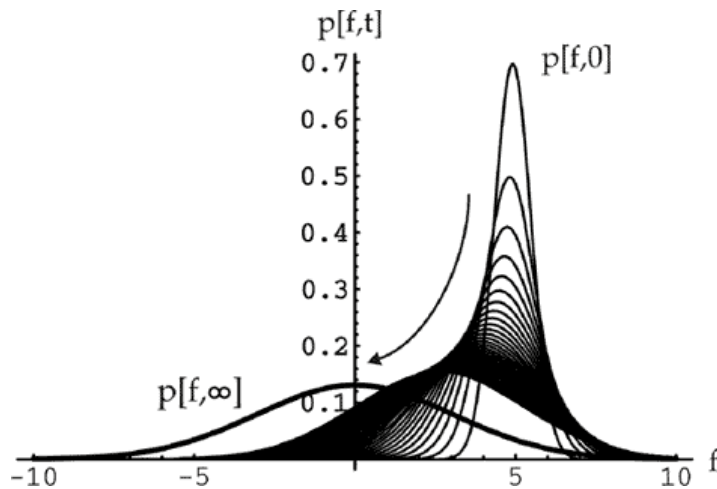
$$x^{st} = \frac{S-1}{2k_g} + \sqrt{\frac{(1-S)^2}{4k_g^2} + \frac{S}{k_r k_g}}. \quad (7)$$

Здесь  $S$  – отношение нормирующих множителей:

$$S = \frac{C_{norm_g}}{C_{norm_r}} = \frac{k_g}{k_r} \frac{X_{max} - \ln(1 + k_r X_{max})}{\ln(1 + k_g X_{max})}.$$

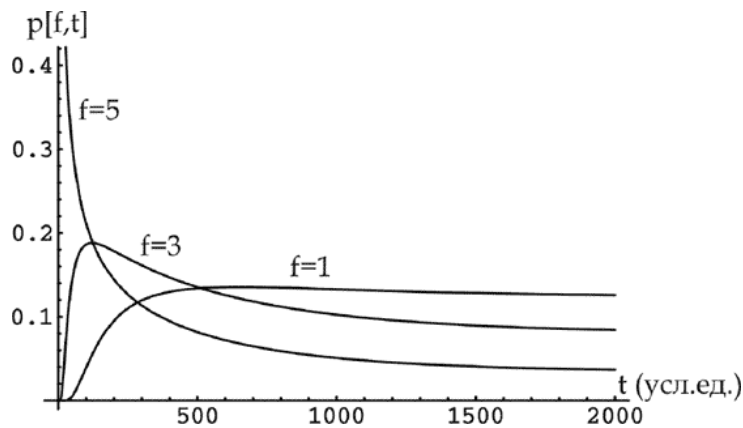
Подставляя (7) сначала в (1) и (2), а затем в (6), получаем искомый нами процесс Орнштейна-Уленбека, релаксирующий к стационарному состоянию (рис. 2). В пределе, при бесконечно большом времени релаксации получаем нормальное распределение со средним смещением, равным  $\langle f \rangle = 0$  и дисперсией  $\sigma^2 = (r(x^{st}) + g(x^{st})) / 2(r'(x^{st}) - g'(x^{st}))$ :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} p(f, t | f_0, t_0) = N \left( 0, \sqrt{\frac{r(x^{st}) + g(x^{st})}{2(r'(x^{st}) - g'(x^{st}))}} \right) \quad (8)$$



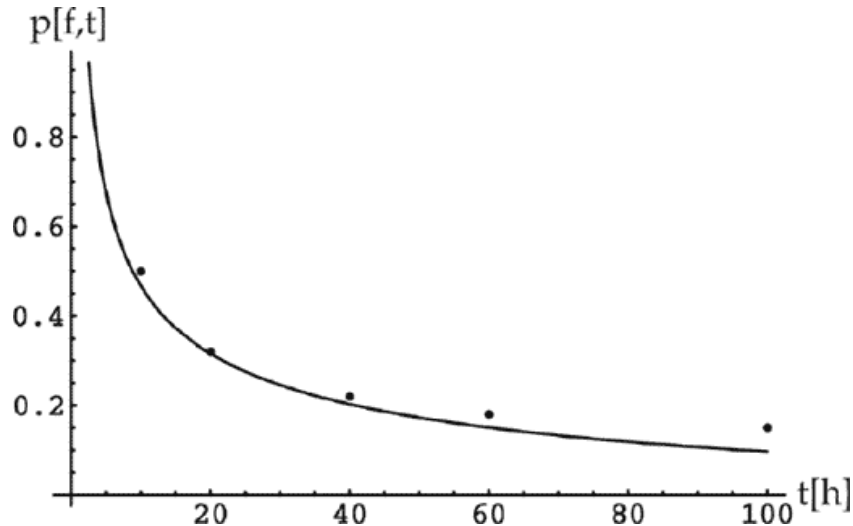
**Рис. 2.** Релаксация плотности вероятности нахождения  $x^{st} + f$  плазмид в клетке (уравнение 6) к стационарному значению (в 0). Первоначальное распределение  $p(f,0) = p(f,t_0=0)$  смещается с течением времени к началу координат. При достаточно большой продолжительности смещения ( $t \rightarrow \infty$ ) оно переходит в нормальное распределение со средним  $\langle f \rangle = 0$  и дисперсией  $\sigma^2 = [r(x^{st}) + g(x^{st})] / 2(r'(x^{st}) - g'(x^{st}))$ .  $X_{max} = 60$ ,  $k_g = k_r = 10$ .

Кроме этого, зная характер динамики распределения, можно определить вероятность наличия смещения  $f$  от времени (рис. 3).



**Рис. 3.** Вероятность наличия в клетке  $x^{st} + f$  плазмид с течением времени (расчеты по (6)). Первоначальное смещение  $f_0 = 5$  плазмид.  $X_{max} = 60$ ,  $k_g = k_r = 10$ .

На рис. 4 приведено сравнение расчетов времени “вымывания” плазмид из популяции с экспериментальными данными. Можно видеть, что доля клеток со средним начальным количеством плазмид после возмущения эволюционирует в согласии с предложенной моделью. В данном случае были выбраны следующие значения параметров:  $k_g = 10$ ,  $k_r = 10$ . Отметим, что хорошее соответствие с экспериментальными данными существенно зависит от варьирования этих параметров.



**Рис. 4.** Изменение доли плазмидосодержащих клеток в популяции бактерий *Escherichia coli* (Rst1) с течением времени. Сравнение расчетных данных (уравнение 6) с экспериментальными [10].  $X_{\max} = 60$ ,  $k_g = k_r = 10$ . Начальное смещение  $f_0 = 5$  плазмид.

## 5. Обсуждение

Стохастический подход с уравнением Фоккера-Планка был использован Rouzine et al. для изучения эволюции вирусов [11]. В области изучения популяционной динамики плазмид стохастическими методами можно отметить работы Ehrenberg [12] и Paulsson and Ehrenberg [6]. В этих работах изучалась динамика плазмид в одиночной клетке.

В настоящей работе стохастическая модель была построена для описания популяционной динамики неконъюгативных плазмид с учетом процессов репликации и сегрегации. Выбранный в качестве гипотезы гиперболический механизм ингибирования хорошо описывает процесс динамики вблизи положения равновесия. Показано, что задача сводится к известным стохастическим уравнениям и, в частности, к уравнению Фоккера-Планка (3), которые, в целом, неплохо описывают процесс релаксации распределения количества плазмид. С помощью подхода Бюргесса удалось свести задачу к исследованию поведения моделируемой системы около стационарного положения. Показано, что поведение распределения для количества копий плазмиды в этом случае может быть представлено в виде процесса Орнштейна-Уленбека (6).

Необходимо отметить, что применение предложенного в работе подхода стохастического моделирования внутриклеточной динамики плазмид имеет некоторые ограничения. Прежде всего, это малость величины смещения из положения равновесия (т.е. изменение числа копий плазмид относительно первоначального уровня). Кроме того, не учитывался конкретный вид плазмид и контроль их сегрегации при делении.

Результаты стохастического моделирования могут быть использованы в медицине при проведении мероприятий по снижению внутрибольничных инфекций, вызванных резистентными к антибиотикам микроорганизмами, и в биотехнологии – для оценки

параметров нестабильности генно-инженерных плазмидсодержащих штаммов-продуцентов [2].

## Приложение

Для решения “одношагового” уравнения

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = r(x+1)p(x+1,t) + g(x-1)p(x-1,t) - (r(x) + g(x))p(x,t)$$

воспользуемся заменой оператора сдвига оператором дифференцирования [13]:

$$f(x+a) = \exp(aD)f(x),$$

где  $D \equiv \frac{\partial}{\partial x}$ .

Получаем:

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = e^D[r(x)p(x,t)] + e^{-D}[g(x)p(x,t)] - (r(x) + g(x))p(x,t).$$

Раскладывая экспоненту в ряд по степеням оператора D, мы приходим к уравнению:

$$\frac{\partial p(x,t)}{\partial t} = \left\{ 1 + \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \dots \right\} [r(x)p(x,t)] + \left\{ 1 - \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} - \dots \right\} [g(x)p(x,t)].$$

Оставляя в разложении только члены до второго порядка включительно, мы приходим к уравнению Фоккера-Планка для одношаговых процессов:

$$\frac{\partial p(x,t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} [D_1(x)p(x,t)] + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} [D_2(x)p(x,t)].$$

Здесь  $D_1(x) = g(x) - r(x)$  – коэффициент дрейфа (сноса),  $D_2(x) = g(x) + r(x)$  – коэффициент диффузии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Summers D.K. *The biology of plasmids*. Cambridge, MA: Blackwell science. 1996.
2. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Богучаров А.А., Письман Т.И., Гительзон И.И. Популяционная устойчивость светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* в непрерывной культуре. *Доклады АН СССР*. 1987. **294** (4). 1012–1016.
3. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. *Популяционные аспекты биотехнологии*. Новосибирск: Наука. 1990. 172 с.
4. Брильков А.В. и др. Исследование выживания и распространения генно-инженерных микроорганизмов в лабораторных водных экосистемах. *Доклады РАН*. 1995. **341** (4). 429–430.
5. Ганусов В.В., Брильков А.В., Печуркин Н.С.. Математическое моделирование динамики популяции нестабильных плазмидсодержащих штаммов бактерий при непрерывном культивировании в хемостате. *Биофизика*. 2000. **45** (5). 908–914.
6. Paulsson J., Ehrenberg M. Trade-of between segregational stability and metabolic burden: a mathematical model of plasmid ColE1 replication control. *J. Mol. Biol.* 1998. **279**. 73–78.
7. Burgess R. The Statistics of Charge Carrier Fluctuations in Semiconductors. *Proc. Phys. Soc. London*. 1956. **B69**. 1020–1027.
8. Risken H. *The Fokker-Planck equation. Methods of solution and applications*. – New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag. 1989. 488 p.
9. van Kampen N.G. *Stochastic processes in physics and chemistry*. – New York: North-Holland; sole distributors for the USA and Canada Elsevier North-Holland, Amsterdam. 1987. 480 p.
10. Terawaki Y., Ishizu K., Horiuchi S., Goto, N., Nakaya R. Control of replication and segregation of R plasmid Rts1. *J. Bacteriol.* 1976. **128** (3). 693–700.

11. Rouzine I. et al. Transition between Stochastic Evolution and Deterministic Evolution in the Presence of Selection: General Theory and Application to Virology. *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews.* 2001. **65** (1). 151–185.
12. Ehrenberg M. Hypothesis: Hypersensitive plasmid copy number control for ColE1. *Biophys. J.* 1996. **70**. 135–145.
13. Маделунг Э. *Математический аппарат физики*. М.: Физматгиз. 1960. 620 с.

Материал поступил в редакцию 29.03.2007, опубликован 24.04.2007