

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСГЕННЫХ БАКТЕРИЙ: «ПЛАЗМИДНЫЙ ПАРАДОКС»

Брильков А.В.<sup>1</sup>, Брилькова Е.В.<sup>1,2</sup>, Жабрун И.В.<sup>1</sup>, Ганусов В.В.<sup>3</sup>, Логинов Ю.Ю.<sup>4</sup>,  
Шуваев А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет  
пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

<sup>2</sup> Институт биофизики ФИЦ СО РАН  
Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

<sup>3</sup> Университет Теннесси  
Knoxville, TN 37996-1937, USA

<sup>4</sup> Сибирский государственный технический университет им. акад. М. Ф. Решетнева  
пр. им. газ. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660014, РФ

Поступила в редакцию 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0638

**Аннотация.** В настоящей работе построена математическая модель распределения клеток трансгенных бактерий, по количеству содержащихся в них плазмид. Это позволяет изучать закономерности выживания трансгенных микроорганизмов в определенных экологических условиях с учетом различных характеристик трансгенных штаммов, например, стабильности плазмид в новых клетках, «популяционной стоимости» поддержания конъюгативных и неконъюгативных плазмид, эффективности экспрессии клонированных на плазмидах генов и других. «Плазмидный парадокс» заключается в том, что хотя обычно присутствие плазмид, содержащих клонированные гены, снижает удельную скорость роста трансгенных бактерий, но при длительном росте бактерий в неселективных условиях («экспериментальная эволюция», 20-30 или более поколений исходной формы без антибиотиков) «стоимость приспособленности», снижается на порядок-два. Анализ экспериментальных приводит к выводу, что это связано с изменением разницы в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток, с изменением вероятности образования бесплазмидных клеток, копийности плазмид и экспрессии клонированных генов в клетках трансгенных бактерий в различных экологических условиях.

**Ключевые слова:** Трансгенные бактерии, экспериментальная эволюция, «плазмидный парадокс», математическое моделирование.

**Введение.** Для прогнозирования сохранения и распространения генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО) в различных природных экосистемах и, в целом, экологических последствий интродукции, необходимым этапом является математическое моделирование. Это позволяет изучать закономерности выживания трансгенных микроорганизмов в определенных экологических условиях с учетом различных характеристик трансгенных штаммов, например, стабильности плазмид в новых клетках, «популяционной стоимости» поддержания конъюгативных и неконъюгативных плазмид, эффективности экспрессии клонированных на плазмидах генов и других.

«Плазмидный парадокс» заключается в том, что хотя обычно присутствие плазмид, содержащих клонированные гены, снижает удельную скорость роста трансгенных бактерий, но при длительном росте бактерий в неселективных условиях (т. н. «экспериментальная эволюция», 20-30 или более поколений исходной формы) стоимость приспособленности, снижается на порядок-два. Это, например, хорошо показано на плазмидах резистентности к антибиотикам у клинических изолятов, причем трансгенные штаммы содержали как конъюгативные, так и неконъюгативные плазмиды, с необходимыми делециями обозначенных оперонов, при разных температурах, в новых штаммах бактерий, при разной копийности и экспрессии клонированных на плазмидах генов и т.д. [1].

Причины такого значительного изменения в стабильности плазмид пока не были определены в каждом случае достаточно точно. В данной работе показано, что «компенсаторные мутации», в принципе, снижают стоимость плазмид для популяции на порядок-два. Интеграция клонированных генов из плазмид в хромосомы, новые штаммы бактерий-хозяев при горизонтальном переносе клонированных генов, новое сообщество организмов, куда встраивается трансгенный штамм бактерий, тоже играют большую роль в распространении плазмид трансгенных бактерий. Это связано с изменением разницы в скоростях роста плазмидных и бесплазмидных клеток (селективный коэффициент), с изменением вероятности образования бесплазмидных клеток, копийности плазмид и экспрессии клонированных генов в разных экологических условиях.

**Математическая модель.** Математическая модель сегрегационной потери многокопийных плазмид позволяет связать феноменологические параметры популяционной динамики трансгенных микроорганизмов с параметрами, описывающими кинетику репликации плазмид в индивидуальной клетке бактерий. Модель описывает динамику плазмид в популяции в предположении непрерывного их изменения от варианта с числом копий  $x$  к варианту с копийностью  $x + dx$ . Это свойство вполне может выполняться для высококопийных плазмид (плазмид, у которых средняя копийность достигает 50-100 копий на клетку), однако очевидно является неприменимым для плазмид с промежуточной или малой средней копийностью (порядка 5-30 копий на клетку).

Для описания популяционной динамики мало – и среднекопийных плазмид трансгенных микроорганизмов нами разработана математическая модель, где переменной является фактическое число копий плазмиды на клетку  $i$ , и которая описывает изменение распределения клеток с различным числом копий в популяции микроорганизмов.

Рассмотрим изменение численности популяции трансгенных бактерий, в которой каждая клетка содержит точно  $i$  копий плазмиды. Обозначим значение плотности этой популяции в момент времени  $t$  как  $X_i(t)$ . В следующий бесконечно близкий момент времени  $t + dt$  три основных события может произойти с клетками этой популяции. Во-первых, благодаря негативному контролю копийности, число копий в клетке может возрасти до  $i+1$ , что определяется скоростью репликации плазмид  $\lambda_i$ , очевидно зависящей от числа копий плазмиды в популяции. Если копийность  $i$  является достаточно большой, то  $\lambda_i \approx 0$ , и соответственно, вероятность увеличения числа копий бесконечно мала. Во-вторых, так как все клетки имеют определенную вероятность деления, определяемую скоростью роста  $\mu_i$  (которая равна  $1 - \exp(-\mu_i t)$ ), клетки могут поделиться в момент времени  $t + dt$  и, таким образом, случайная сегрегация плазмид по дочерним клеткам может привести к образованию бесплазмидной клетки с вероятностью  $\tau_0(i)$ . Более того, случайное распределение плазмид по дочерним клеткам также приводит к снижению (в среднем) копийности от  $i$  до  $i - 1$  со скоростью  $\tau_i \mu_i X_i$ .

Популяционная динамика плазмид клеток трансгенных бактерий (схема) приведена на рисунке 1. Обозначения:  $\lambda_i$  – скорость репликации плазмид (с учетом негативного контроля копийности),  $\tau_i$  – параметр, характеризующий скорость “разбавления” плазмид при делении (с учетом случайного распределения плазмид между дочерними клетками),  $\tau_0(i)$  – вероятность образования бесплазмидной клетки при делении клетки с  $i$  копиями плазмиды.

Необходимо подчеркнуть, что рассматриваемая модель (см. рис. 1) не описывает подробно механизмы сегрегации и репликации плазмид, а снижение (в среднем) копийности плазмид при случайном их распределении между клетками при делении можно интерпретировать как “разбавление” плазмид пропорционально их количеству.

Суммируя все вышесказанное, математическая модель, описывающая динамику плазмид трансгенных микроорганизмов, может быть записана в общем виде следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dX_0}{dt} = (\mu_0(S) - D)X_0 + \tau\mu_1(S)X_1 + \sum_{i=1}^N \tau_0(i)\mu_i(S)X_i, \\ \dots\dots\dots \\ \frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S) - D)X_i - \tau i \mu_i(S)X_i + \tau(i+1)\mu_{i+1}(S)X_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \\ \frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \sum_{i=0}^N \frac{\mu_i(S)X_i}{Y_i}, \end{cases} \quad (1)$$

Анализ этой математической модели будет проведен ниже в несколько этапов. Сначала мы рассмотрим, как модель (1) отражает зависимость среднего числа копий плазмиды от условий культивирования, а также проанализируем динамику среднего числа копий плазмиды в популяции трансгенных микроорганизмов. На основе динамики средних и некоторых экспериментальных наблюдений мы рассмотрим популяционную динамику плазмидсодержащих бактерий в хемостате. После этого будет рассмотрен простой способ вычисления стационарных распределений клеток популяции трансгенных бактерий по числу копий плазмид и как эти распределения зависят от механизма контроля копийности плазмид. Далее будет описан метод оценки параметров математической модели, основанный на известном виде стационарного распределения клеток с различной копийностью в популяции микроорганизмов. Наконец, будут проанализированы причины сегрегационной нестабильности рекомбинантных плазмид, а также показано, как вариация продолжительности клеточного цикла клеток микроорганизмов может повлиять на стабильность поддержания плазмид в популяции трансгенных бактерий.

Обозначения: Препраймерная RNAII (0-555 п.о.) и ингибиторная RNAI (2-110 п. о.) производятся с постоянными скоростями  $k_{II}$  и  $k_I$ . RNAI и RNAII способны образовывать комплементарный комплекс, который при его образовании в окне ингибирования (110-360 п. о.) приводит к ингибированию образования праймера.  $M$  обозначает число плазмид в клетке, а  $Q_0$  – вероятность формирования полноценного праймера для ДНК полимеразы,  $\rho$  – вероятность репликации плазмиды, при условии, что праймер для ДНК полимеразы успешно образовался.

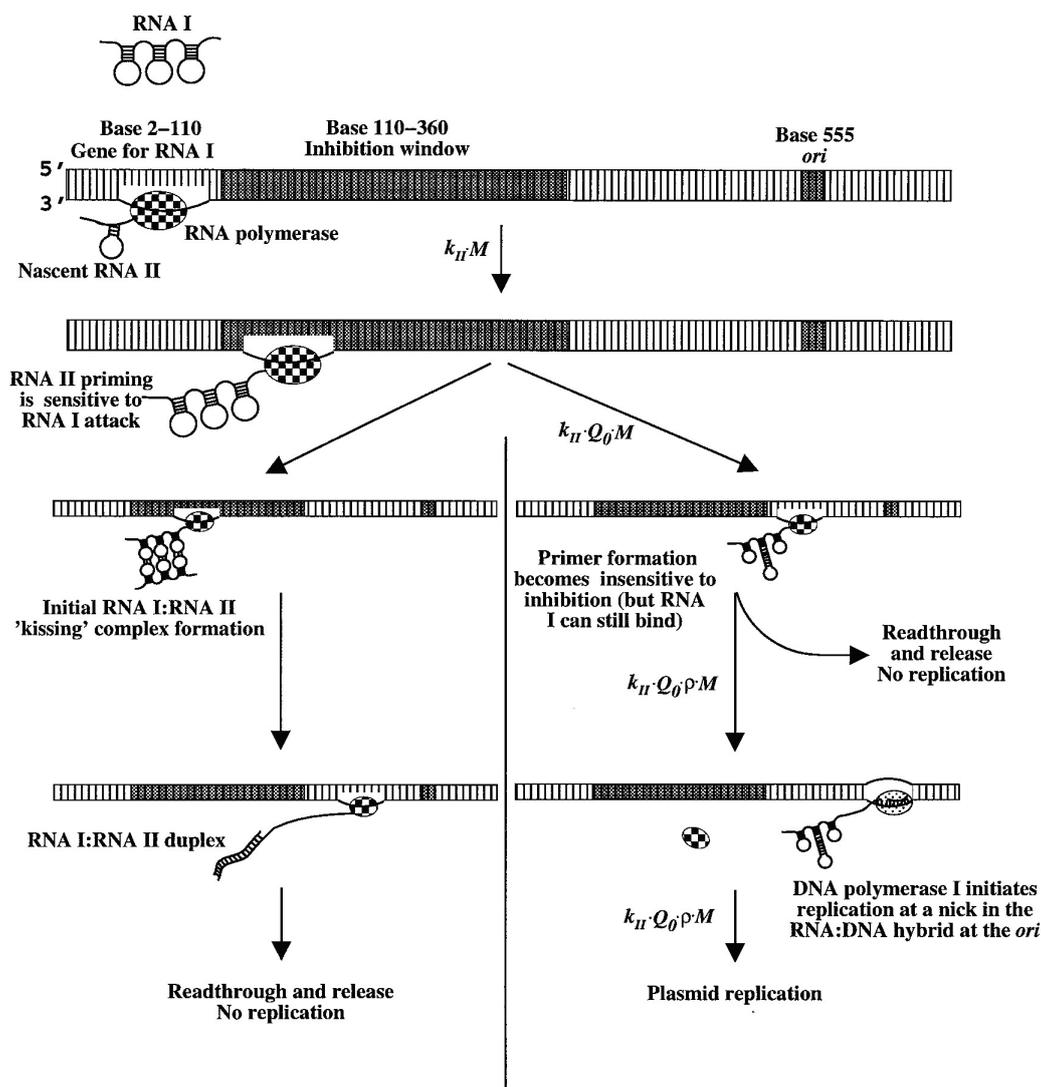


Рисунок 1. Общая схема процесса репликации плазмиды ColE1

Плаزمида ColE1 является небольшой плазмидой, широко распространенной в природных популяциях. Её молекулярный вес составляет  $4,2 \cdot 10^3$  килодальтон, и длина – 6646 пар нуклеотидных оснований. ColE1 не обладает способностью к конъюгационному переносу, хотя и содержит гены, обеспечивающие ее мобилизацию в клетки–реципиенты со многими конъюгативными плазмидами, например с фактором *F*. Обычная бактериальная клетка содержит 10–50 копий плазмиды, и согласно, условной классификации, ColE1 относится к классу высококопийных плазмид.

Многокопийные плазмиды обычно не обладают системами активного распределения плазмид между дочерними клетками при делении материнской, а, следовательно, копии плазмиды сегрегируют независимо, и, таким образом, случайно. Случайное распределение плазмид при делении ведет к значительной вариации числа копий плазмиды в клетках микроорганизмов в начале клеточного цикла. В этом случае основной задачей эффективного контроля копиюности плазмид является выравнивание среднего числа копий на клетку в популяции (или другими словами, уменьшение вариации изначально высокодисперсного распределения клеток с различной копиюностью) к началу митотического деления [2].

Репликация плазмид типа ColE1 изучалась достаточно подробно (как теоретически, так и экспериментально) как модельная система для исследования стабильного поддержания плазмидных репликонов в растущих культурах микроорганизмов. Контроль копиюности плазмиды ColE1 зависит от ингибирования *cis*-действующей препраймерной РНК (названной RNAII) *trans*-действующей антисенсной РНК (названной RNAI) [2].

Транскрипция молекулы RNAII инициируется 555 п.о. выше (upstream) участка начала репликации *ori* (рис. 1), тогда как RNAI (обычно длиной от 108 до 110 п.о.) считается с цепи ДНК, комплементарной участку, кодирующему RNAII, начиная с сайта, расположенного выше на 455 п.о. от начала репликации. Образование пре-праймера чувствительно к атаке молекулой RNAI, когда транскрипция происходит в так называемом “окне ингибирования” (inhibition window), которое простирается примерно от 100 нуклеотидной пары до 360 пары последовательности, кодирующей молекулу RNAII. Если RNAI и RNAII образуют изначально нестабильный комплементарный (“kissing”) комплекс, который впоследствии преобразуется в стабильный дуплекс во время

транскрипции RNAII, конформационные изменения молекулы RNAII приведут к формированию неполноценного пре-прайма, и, следовательно, к нарушению репликации плазмиды (рис. 1).

Небольшой, кодируемый генами плазмиды полипептид, Rom (RNA One Modulator), стабилизирует взаимодействие между RNAI и RNAII, увеличивая вероятность образования стабильного комплекса RNAI–RNAII после изначально нестабильного связывания. Если же комплекс между RNAI и RNAII не образуется к окончанию окна ингибирования (временная длительность этого процесса всего ~5 секунд), RNAII формирует стабильный гибрид с участком плазмидной ДНК, расположенным рядом с *ori*.

**Динамика средней копийности плазмид.** Для описания динамики среднего числа копий плазмиды в клетках популяции трансгенных бактерий уточним вид общей математической модели (1). Прежде всего, для простоты анализа, положим  $\mu = const$ . Также предположим, что динамика концентрации субстрата, лимитирующего рост бактерий, является быстрой, по сравнению с динамикой клеток с различной копийностью плазмид в клетках бактерий (это достаточно легко показать в приближении малых  $\tau$  и  $\lambda$ ). Тогда справедливо равенство  $\mu = D$ . Система (1) переписывается следующим образом:

$$\frac{dX_i}{dt} = -\tau iDX_i + \tau(i+1)DX_{i+1} - \lambda_i X_i + \lambda_{i-1} X_{i-1}, \quad (2)$$

где не учитывается динамика популяции бесплазмидных клеток, так как они не дают никакого вклада в среднюю копийность плазмид (как минимум в селективных условиях). Средняя копийность плазмид определяется как

$$x = \sum_{i=1}^{\infty} iX_i / X = \sum_{i=1}^{\infty} ip_i, \text{ где } X = \sum_i X_i. \text{ Для нахождения уравнения для относительной средней копийности, рассмотрим две суммы:}$$

$$\sum_{i=1} \lambda_{i-1} ip_{i-1} = \sum_{k=0} \lambda_k (k+1)p_k = \sum_{k=0} \lambda_k kp_k + \sum_{k=0} \lambda_k p_k = \sum_{i=0} \lambda_i ip_i + \sum_{i=0} \lambda_i p_i, \quad (3)$$

$$\sum_{i=0} i(i+1)p_{i+1} = \sum_{k=1} k(k-1)p_k = \sum_{k=1} k^2 p_k - \sum_{k=1} kp_k = \sum_{i=0} i^2 p_i - n \quad (4)$$

С учетом выражений (3) и (4) мы находим уравнение на среднее число копий плазмиды в популяции  $n$ :

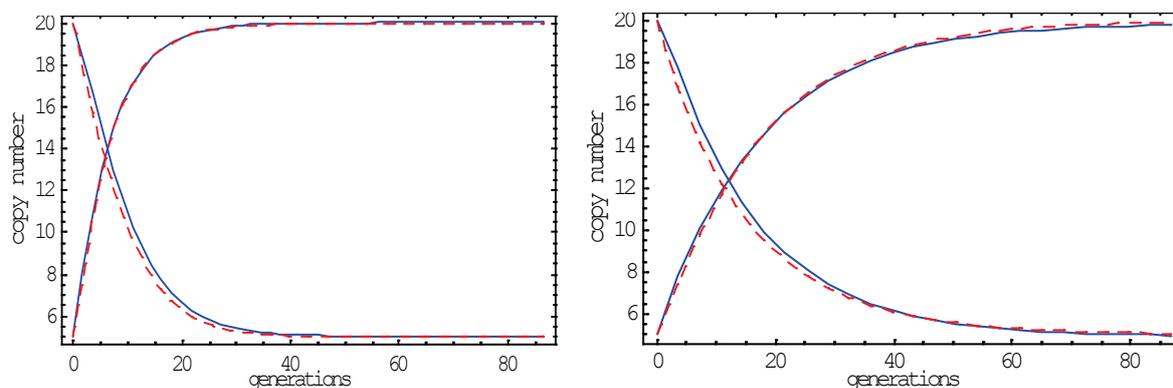
$$\dot{x} = -\tau Dx + \sum_{i=0} \lambda_i p_i \quad (5)$$

Таким образом, в упрощенном виде уравнение (5) предсказывает динамику средней копийности плазмид в клетках трансгенных бактерий. Например, при  $\lambda = 0$  (при отсутствии контроля копийности, либо при резкой смене условий), среднее число копий на клетку снижается экспоненциально, как и предсказывается решением общей модели. Заметим, что в случае, когда  $\lambda_i$  нелинейно зависит от числа копий (например, при экспоненциальном механизме ингибирования), система (2) и следовательно, уравнение (5) не имеют аналитического решения. Когда же  $\lambda = const$ , решение уравнения (5) находится простым интегрированием:

$$x(t) = \frac{\lambda}{\tau D} + \left[ x(0) - \frac{\lambda}{\tau D} \right] \exp(-\tau Dt) \quad (6)$$

где  $x(0)$  – начальная относительная копийность (обычно она принимается равной 1). Решение (6) также предсказывает экспоненциальное снижение (точнее, изменение) средней копийности плазмид со скоростью  $\sim \tau D$  (средняя копийность в стационарном состоянии обозначается как  $n = \tilde{x}$ ), хотя и с последующим замедлением (до скорости  $\sim \lambda$ ) при подходе к стационарному значению  $\lambda/\tau D$ .

При  $\lambda = const$  средняя копийность плазмид в популяции трансгенных микроорганизмов обратно пропорциональна удельной скорости разбавления среды в хемостате  $D$  (или, в стационарном состоянии, скорости роста популяции). Это означает, что при культивировании при низких скоростях протока среды в хемостате или в стационарной фазе роста при периодическом культивировании, клетки бактерий должны преимущественно обладать высоким числом копий плазмид, по сравнению с большими скоростями роста в хемостате или, например, в логарифмической фазе роста. Этот вывод подтверждается многочисленными экспериментальными данными.



**Рисунок 2.** Динамика средней копийности при изменении условий культивирования при экспоненциальном (левый график) и гиперболическом (правый график) механизме ингибирования. Расчеты выполнены по формулам (6,7). Непрерывные линии – численное решение модели (1), штрихованные – выражение (7). Параметры, использованные в расчетах:  $\mu(S) = 1/(0.01 + S)$ ,  $\theta=10$ ,  $\lambda = \tau\theta DK$  (гиперболический механизм ингибирования) и  $\lambda = \tau D\theta \exp(-x/K)$  (экспоненциальный),  $\tau=0.1$ ,  $D=0.1$ ,  $S_0=10$ ,  $x(0) = 20$  (или 5),  $x(\infty) = 5$  (или 20)

Отметим, что эти экспериментальные данные относятся к случаю, когда копийность плазмиды измеряется по отношению к числу хромосом на клетку, а, следовательно, исключают влияние всех остальных факторов, которые могут привести к снижению копийности при малых скоростях роста. В дополнение к сказанному, решение (6) не учитывает вариабельность параметров модели от условий культивирования, что также может привести к другим предсказаниям (см. ниже). Уравнение (5) переписывается при  $\lambda = const$  в виде  $\dot{x} = \lambda - \tau Dx$ , который также описывает скорость перехода плазмид между клетками с близкой копийностью ( $x \rightarrow x + dx$ ). Такое совпадение неудивительно, так как динамика средних следует из более общей модели популяционной динамики плазмид трансгенных микроорганизмов (рис. 1). Основываясь на этом, можно предположить, что и в нашей модели динамика среднего числа копий плазмид в популяции трансгенных бактерий может быть описана уравнением:

$$\dot{x} = \lambda(x) - \tau\mu(x, S)x. \quad (7)$$

Численные решения демонстрируют (рис. 2), что уравнение (7) достаточно хорошо описывает динамику изменения средней копийности в популяции микроорганизмов и практически точно предсказывает значение квазистационарного числа копий плазмиды на клетку. Заметим, что, как и ожидалось в полной модели (1), изменение копийности происходит наиболее быстро в случае экспоненциального ингибирования, по сравнению с гиперболическим, что связано с чувствительностью многократного процесса соединения-распада молекул RNAII и RNAI (рис. 1, 2).

Решение уравнения (7) может быть проведено как при помощи численных, так и с использованием графических методов. Графический способ также позволяет оценить, как среднее число копий в популяции зависит от условий культивирования (удельной скорости роста популяции, селективности условий для поддержания плазмид с клонированными генами). Один из простейших примеров был ранее изучен Атлунгом с соавт. [3]. Эти авторы оценивали изменение среднего числа копий плазмиды на клетку при различной скорости роста популяции микроорганизмов. Было показано, что при увеличении скорости роста плазмидосодержащих клеток, средняя копийность должна снижаться (при всех равных прочих условиях). Таким образом, уравнение (7) может быть использовано для предсказания как стационарных содержания плазмидной ДНК в клетках трансгенных микроорганизмов, так и для анализа его изменения. Стационарная концентрация плазмид вычисляется по уравнению (7) при  $\dot{x} = 0$ , или, что то же самое, в нелинейном выражении:

$$\lambda(x) = \tau\mu(x, S)x. \quad (8)$$

Хотя динамика средней копийности плазмид, описываемая решением уравнения (7), практически не отличается от численного решения системы (1), выражение (8) может не описывать снижение копийности, наблюдаемое в реальных экспериментах. Используем разработанную Паулсоном с соавт. математическую модель, которая описывает изменение средней копийности  $x$  и концентрации ингибиторной молекулы  $R$  в популяции микроорганизмов, содержащих плазмиду ColE1 [2].

Авторы предположили, основываясь на известном механизме контроля копийности плазмиды ColE1, что изменение концентраций плазмидной ДНК и RNAI (ингибитора) подчиняется следующей системе дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \rho k_{II} x Q(R) - Dx, \\ \dot{R} &= (k_I - k_{II})x - (D + \varepsilon_I)R \end{aligned} \quad (9)$$

где параметры имеют следующий биологический смысл – описание функции дорепликации плазмид  $\lambda(i \rightarrow j)$ :  $k_I$  – скорость образования полноценных (т.е. способных к ингибированию) RNAI молекул,  $k_{II}$  – скорость образования молекулы RNA II (которая ведет к репликации плазмиды),  $Q(R)$  – вероятность образования полноценного праймера RNAII для ДНК полимеразы (без связывания с комплиментарной RNAI),  $\rho$  – вероятность того, что полноценный праймер для ДНК-полимеразы приведет к репликации плазмиды,  $\varepsilon_I$  – время полураспада свободной RNA I и  $D$  – скорость роста популяции. Как было упомянуто выше, вероятность транскрипции RNAII без связывания с ингибиторной молекулой RNAI (при любой конечной концентрации  $R$  это, очевидно, возможно) зависит от точного механизма взаимодействия RNAI и RNAII (и последовательное образование (диссоциация) комплекса RNAII:RNAI), а точнее, от числа сайтов в “окне ингибирования”, необходимых для полного ингибирования транскрипции молекулы RNAII. Две основные зависимости были предложены в [2]:

$$Q(R) = \frac{1}{1 + R/k}, \text{ гиперболическим, и } Q(R) = \exp(-R/k), \text{ экспоненциальным}$$

Причем, разные механизмы ингибирования соответствуют различной чувствительности скорости репликации плазмид  $\rho k_{II} Q(R)$  к изменению концентрации  $R$  антисенсной молекулы. В случае экспоненциального ингибирования число репликаций на плазмиду в течение одного клеточного деления находится гораздо ближе к единице, чем при гиперболическом ингибировании, что, впрочем, компенсируется высокой скоростью производства и распада молекулы RNAI при экспоненциальном ингибировании.

Ряд экспериментальных наблюдений действительно подтверждают, что в широком диапазоне условий культивирования скорость транскрипции молекулы RNAI является очень высокой, а период полураспада RNAI составляет несколько минут [4]. Более того, как показывает анализ, высокая скорость оборота ингибиторной молекулы необходима для стабильной репликации плазмид. Основываясь на этих результатах, можно предположить, что  $k_I \gg k_{II}$  и  $\varepsilon_I \gg D$ . Тогда второе уравнение в (9) является быстрым по сравнению с первым, и значение концентрации RNAI тогда выражается:

$$R(t) \approx \frac{k_I}{\varepsilon_I} x(t). \tag{10}$$

Тогда система (9) сводится к уравнению:

$$\dot{x} = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right) - Dx \tag{11}$$

Сравнивая (11) с (7), мы замечаем, что они совпадают при  $\tau = 1$  и параметрах  $\mu(x, S) = D$  и  $\lambda(x) = \rho k_{II} x Q\left(\frac{k_I}{\varepsilon_I} x\right)$ . В случае гиперболического и экспоненциального механизмов ингибирования функция перерепликации плазмид  $\lambda(x)$  принимает вид:

$$\lambda(x) = \frac{\rho k_{II} x}{1 + \frac{k_I}{\varepsilon_I} \frac{x}{k}} = D \frac{\theta x}{1 + \frac{x}{K}} \approx D \theta K = \text{const (гиперболический)} \tag{12}$$

$$\lambda(x) = \rho k_{II} x \exp\left(-\frac{k_I}{\varepsilon_I} \frac{x}{k}\right) = D \theta x \exp\left(-\frac{x}{K}\right) \text{ (экспоненциальный)} \tag{12a}$$

где  $\theta = \rho k_{II} / D$ ,  $K = \varepsilon_I k / k_I$  и  $\tau = 1$ .

Таким образом, показана связь между феноменологическими параметрами популяционной динамики плазмидсодержащих микроорганизмов  $\lambda(x)$  и  $\tau$  и параметрами, описывающими кинетику репликации плазмид в индивидуальной клетке  $K$  и  $\theta$ . Приближение  $\lambda = \text{const}$ , использованное в целом ряде исследований, относится к ColE1-типа плазмидам с предположительно гиперболическим механизмом ингибирования репликации плазмид, тогда как начальное увеличение и последовательное снижение копияности плазмид описывается экспоненциальным механизмом ингибирования.

**Сравнение с экспериментальными данными распределения клеток с различным числом копий плазмиды при разных механизмах ингибирования.** Математическая модель (1) достаточно точно описывает как динамику среднего числа копий плазмиды в популяции, так и изменение численности плазмидсодержащих и бесплазмидных клеток при длительном культивировании. Можно провести сопоставление расчетов по математической модели и стационарных распределений клеток популяций трансгенных бактерий по количеству копий плазмид, которые к настоящему времени экспериментально определены для целого ряда плазмид [4].

Изменение среднего числа копий плазмиды  $x(t)$  в популяции трансгенных микроорганизмов описывается уравнением (5) и в стационарном состоянии находится из уравнения (8), что в явном виде выражается как:

$$n = K \ln(\theta), \quad (13)$$

$$n = K(\theta - 1), \quad (14)$$

для экспоненциального (13) или гиперболического (14) механизмов ингибирования с  $\theta = \rho k_{II}/D$ . Используя модель (2) и метод нахождения динамики средних (3)-(4), продемонстрированный на вычислении динамики среднего числа копий в распределенной модели (1), находится уравнение на второй момент  $\mu = \sum_i i^2 p_i$  распределения плазмид в микробной популяции:

$$\dot{\mu}(t) = \sum_i \lambda_i p_i(t) + x(t) + 2 \left[ \sum_i i \lambda_i p_i(t) - \mu(t) \right], \quad (15)$$

где  $x(t)$  описывает изменение средней копийности. Тогда вариационный коэффициент  $CV$  стационарного распределения  $\tilde{p}_i$ , который определяет относительную ширину распределения, находится из выражения:

$$CV = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{n} = \frac{\sqrt{\mu - n^2}}{n} = \sqrt{\sum_i i \lambda_i \frac{\tilde{p}_i}{n^2} + \frac{1}{n} - 1} \quad (16)$$

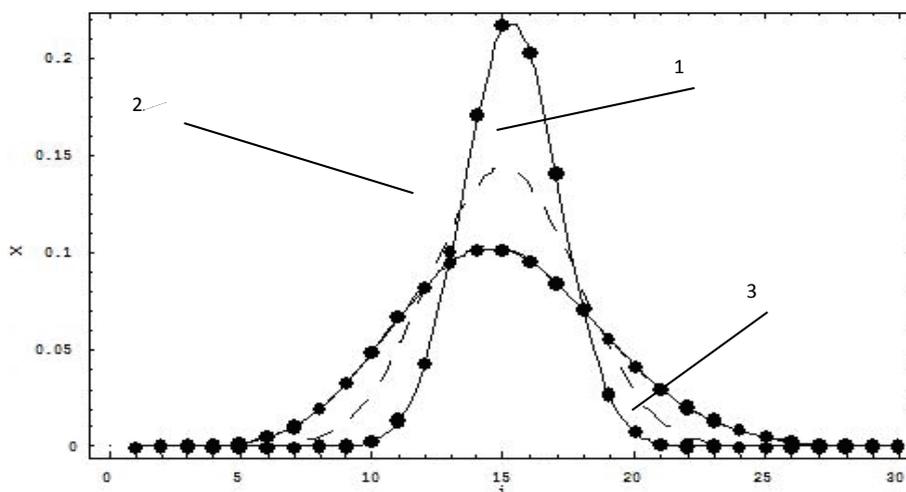
Стационарное распределение клеток в популяции с различным числом копий плазмиды получается из уравнения (2) при  $\dot{X} = 0$ , или:

$$\left( i + \frac{\lambda_i}{\tau D} \right) \tilde{p}_i = (i+1) \tilde{p}_{i+1} + \frac{\lambda_{i-1}}{\tau D} \tilde{p}_{i-1} \quad (17)$$

Вспомним, что  $p_i = X_i/X$  (см. модель (2)). То, что  $\lambda_i = \tau \rho k_{II} Q(i/K)$ , означает, что функция  $\lambda_i/(\tau D)$  зависит только от двух составных параметров  $\theta = \rho k_{II}/D$  и  $K = \varepsilon_1 k/k_I$  (см. выражения (12), (13)).

Следовательно, определяя среднее число копий  $n$  и дисперсию числа копий плазмиды  $\sigma^2$  (вариационный коэффициент  $CV$ ) в экспериментальной популяции плазмидсодержащих микроорганизмов, мы можем определить два важных параметра:  $\theta$ , характеризующий эффективность процесса репликации плазмиды по сравнению с удельной скоростью роста популяции микроорганизмов (точнее, число успешных транскрипций молекулы RNAII с одной плазмиды за клеточный цикл) и  $K$ , связанный с эффективностью ингибирования препрайма RNA II ингибиторной молекулой RNA I.

Из приведенных выражений видно, что дисперсия стационарного распределения при экспоненциальном ингибировании гораздо меньше, чем при гиперболическом (4). Этот результат, таким образом, подтверждает



**Рисунок 3.** Стационарные распределения клеток с различным числом копий плазмиды при разных механизмах ингибирования репликации плазмид в соответствии с решением (18) математической модели (1). Обозначения: 1 – экспоненциальный механизм ингибирования, 2 – то же в точной модели (3), 3 – гиперболический механизм ингибирования. Параметры:  $n = 15$ ,  $\theta = 100$ ,  $K$  находится из уравнений (13), (14) совпадает с теоретически

предсказываемым распределением Пуассона  $p_i = \frac{n^i}{i!} \exp(-n)$  (см. выражение (10)) а, следовательно, не зависит от  $\theta$ .

увеличенную стабильность плазмид с экспоненциальным механизмом ингибирования, которая в основном связана с малой дисперсией стационарного распределения [4]. Отметим, что при достаточно большой средней копияности (рис. 3,  $n = 15$ ) стационарное распределение (3) при гиперболическом механизме ингибирования с другой стороны, распределение (1) на рисунке 3, вычисляемое в математической модели (1) при экспоненциальном механизме ингибирования репликации плазмид, немного отличается от предсказания точной модели, изображенного на рис. 3 (кривая (2)), которое при  $\theta \gg 1$  дается биномиальным распределением (4). Очевидно, это связано с тем, что точная модель не учитывает скорости репликации плазмид в клетке, которая возрастает многократно при больших  $\theta$ . Если скорость репликации плазмид велика ( $\theta \gg 1$ ), то в стационарном состоянии будет много клеток с копияностью плазмид, близкой к средней или с копияностью больше (меньше) средней, что видно на рис. 3. Таким образом, математическая модель (1) описывает наблюдаемое распределение клеток с различным числом копий плазмид, а, следовательно, стационарное распределение (18), может быть применено для оценки параметров плазмидсодержащих штаммов микроорганизмов *in vivo* с помощью выражений (13)-(18).

Количественную оценку популяционной стоимости клонированных генов трансгенных бактерий можно провести также на основе зависимости продолжительности клеточного цикла от времени накопления белка, инициирующего репликацию хромосомы – DnaA. Для этого необходимо построить вероятностную модель синтеза этого белка с учетом конкуренции за рибосомы мРНК, кодирующих DnaA, с остальными мРНК (в том числе и плазмидными). Время накопления инициирующего количества DnaA (а, значит, и время генерации) зависит от количества плазмидных мРНК, которое в свою очередь определяется размером и числом копий плазмид, а также эффективностью экспрессии клонированных генов [5]. Эти важнейшие характеристики трансгенных бактерий, содержащих клонированные гены биолюминесценции, необходимы для использования их при распространении трансгенных микроорганизмов (ГМО) в окружающей среде.

Таким образом, «популяционная стоимость» клонированных на плаزمидах генов трансгенных микроорганизмов должна определяться, прежде всего, копияностью плазмид, эффективностью экспрессии клонированных генов, их токсичностью для метаболизма клеток, затратами на поддержание активно функционирующих клонированных генов [6-9]. Действительные механизмы экспериментальной эволюции в последнее время интенсивно изучаются [10-11]. Среди них наибольшее значение имеют компенсаторные мутации в хромосоме или плазмиде, интерференция транскрипции клонированных генов и репликации ДНК.

#### Список литературы / References:

1. Brockhurst M.A., Harrison E. Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox. *Trends Microbiol.*, 2022, vol. 30, no. 6, pp. 534-543.
2. Paulsson J., Nordstrom K., Ehrenberg M. Requirements for rapid plasmid ColE1 copy number adjustments: a mathematical model of inhibition modes and RNA turnover rates. *Plasmid.*, 1998, vol. 39, pp. 215–234.
3. Atlung T., Christensen B.B., Hansen F.G. Role of the *rom* protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid.*, 1999, vol. 41, pp. 110-119.
4. Standley M.S., Million-Weaver S., Alexander D.L., Hu S., Camps M. Genetic control of ColE1 plasmid stability that is independent of plasmid copy number regulation. *Curr. Genet.*, 2019, vol. 65, no. 1.
5. Shuvaev A. DnaA dynamics could be linked with fitness cost in bacteria. *Cell Biochem. Biophys.*, 2014, vol. 70, no. 1, pp. 295-299.
6. Rajer F., Sandegren L. The Role of Antibiotic Resistance Genes in the Fitness Cost of Multiresistance Plasmids. *mBio*, 2022, vol. 13, no. 1.
7. Dimitriu T., Matthews A.C., Buckling A. Increased copy number couples the evolution of plasmid horizontal transmission and plasmid-encoded antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, vol. 118, no. 31.
8. San Millan A., Santos-Lopez A., Ortega-Huedo R., Bernabe-Balas C., Kennedy S.P., Gonzalez-Zorn B. Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, pp. 3335-3341.
9. Брильков А.В., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Жабрун И.В., Логинов Ю.Ю. Экологическая биофизика: опыт математического моделирования динамики трансгенных микробных популяций. *Акту. вопр. биол. физ. и хим.*, 2019, т. 4, № 3, с. 378-382 [Brilkov A.V., Brilkova E.V., Ganusov V.V., Zhabrun I.V., Loginov Yu.Yu. Ecological biophysics: experience of mathematical modeling of dynamics of transgenic microbial populations. *Act. vopr. biol. phys. and chem.*, 2019, vol. 4, no. 3, pp. 378-382 (In Russ.)].
10. Vanacker M., Lenuzza N., Rasigade J. P. The fitness cost of horizontally transferred and mutational antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.*, 2023, vol. 14, p. 1186920.
11. Hall J.P.J., Wright R.C.T., Harrison E., Muddiman K.J., Wood A.J., Paterson S. et al. Plasmid fitness costs are caused by specific genetic conflicts enabling resolution by compensatory mutation. *PLoS Biol.*, 2021, vol. 19, e3001225.

MATHEMATICAL MODELING OF THE EXPERIMENTAL EVOLUTION OF TRANSGENIC BACTERIA:  
“PLASMID PARADOX”Brilkov A.V.<sup>1</sup>, Brilkova H.V.<sup>1,2</sup>, Jabrun I.V.<sup>1</sup>, Ganusov V.V.<sup>3</sup>, Loginov Yu.Yu.<sup>4</sup>, Shuvaev A.V.<sup>1</sup><sup>1</sup> Siberian Federal University

Svobodny Ave., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

<sup>2</sup> Institute of Biophysics FIC SB RAS

Akademgorodok, pp. 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru.

<sup>3</sup> University of Tennessee

Knoxville, TN 37996-1937, USA

<sup>4</sup> Siberian State Technical University named after Acad. M. F. Reshetnev

Gaz. ave. Krasnoyarsk Worker, 31, Krasnoyarsk, 660014, Russia

Received 01.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0638

**Abstract.** In the present work, a mathematical model for the distribution of transgenic bacteria cells by the number of plasmids contained in them is constructed. This makes it possible to study the patterns of survival of transgenic microorganisms under certain environmental conditions, taking into account various characteristics of transgenic strains, for example, the stability of plasmids in new cells, the “population cost” of maintaining conjugative and non-conjugative plasmids, the efficiency of expression of genes cloned on plasmids, and others. The “plasmid paradox” lies in the fact that although the presence of plasmids containing cloned genes usually reduces the specific growth rate of transgenic bacteria, but with prolonged growth of bacteria under non-selective conditions (“experimental evolution”, 20-30 or more generations of the original form without antibiotics) “cost of fitness” is reduced by an order of magnitude or two. An analysis of the experimental results leads to the conclusion that this is due to a change in the difference in the growth rates of plasmid and plasmid-free cells, with a change in the probability of formation of plasmid-free cells, the copy number of plasmids, and the expression of cloned genes in cells of transgenic bacteria under various environmental conditions.

**Key words:** *transgenic bacteria, experimental evolution, “plasmid paradox”, mathematic modeling.*