

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ТРАНСГЕННЫХ БАКТЕРИЙ (ГМО) В МОДЕЛЬНЫХ И ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Брильков А.В.¹, Логинов Ю.Ю.^{1,2}, Брилькова Е.В.^{1,3}, Ганусов В.В.^{2*}, Жабрун И.В.⁴, Шуваев А.Н.⁵

¹ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

² Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф. Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ; e-mail: loginov@sibsau.ru

^{2*} Present address: University of Tennessee

Knoxville, TN 37996-1937, USA; e-mail: vitality.ganusov@gmail.com

³ Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ; e-mail: evmorbril@mail.ru

⁴ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: ijabrun@sfu-kras.ru

⁵ Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ; e-mail: ashuvaev@sfu-kras.ru

Поступила в редакцию: 20.07.2021

Аннотация. В работе проанализирована экспериментальная эволюция трансгенных микроорганизмов (ГМО) в условиях ограничения их роста по энергетическим субстратам. Эти условия характерны для развития ГМО в природе. Наиболее адекватной экологической моделью природных условий является непрерывное культивирование в хемостате. Показано, что стоимость поддержания ГМО резко возрастает при низких скоростях размножения трансгенных бактерий. Это связано с повышением эффективности экспрессии клонированных генов при ограничении роста ГМО. В экспериментах обнаружено возрастание эффективности экспрессии генов биолюминесценции морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi*, клонированных в *Escherichia coli* Z905, при низких скоростях размножения при непрерывном культивировании.

Ключевые слова: трансгенные микроорганизмы, экспериментальная эволюция, стоимость приспособленности, математическое моделирование, непрерывное культивирование.

ВВЕДЕНИЕ

Причины широкого распространения трансгенных микроорганизмов в природных экосистемах не совсем понятны [1-3]. Экспериментальные исследования указывают на то, что трансгенные плазмидосодержащие микроорганизмы имеют, как правило, меньшую удельную скорость роста, чем их бесплазмидные варианты [3,4]. Это может быть прямым влиянием экспрессии плазмидных генов на жизнеспособность плазмидосодержащих клеток или же расходование клеточных ресурсов на поддержание плазмид. Почему трансгенные микроорганизмы теряют плазмиды при культивировании и не теряют их в природе, остается загадкой (плазмидный парадокс) [1-4]. В настоящей работе предложена математическая модель влияния различной эффективности экспрессии клонированных генов на селективное преимущество трансгенных бактерий. Анализ математической модели позволяет оценить популяционную «стоимость» поддержания плазмид трансгенных микроорганизмов при периодическом культивировании и при лимитировании роста в хемостате. Стоимость плазмид, содержащих активно функционирующие клонированные гены, определяет вероятность распространения генетически модифицированных организмов в природных экосистемах.

Математическая модель. Эффективность экспрессии клонированных генов в клетке, как и сама удельная скорость роста популяции бактерий, определяется уровнем активности метаболических систем [3]. Ответ на этот вопрос непосредственно связан с локализацией “узкого места” метаболизма клеток, которое для клеток различных микроорганизмов в природных условиях известно далеко не всегда. Для трансгенных бактерий *E. coli* при лимитировании роста источником углерода и энергии в хемостате, можно полагать, что “узкое место” метаболизма определяется потребностью клеток в энергии [5,6].

Пусть в клетках трансгенных плазмидосодержащих бактерий *E. coli* находится i копий плазмиды и, следовательно, i копий клонированного гена. Вероятность присоединения *RNA*-полимеразы к промотору клонированного гена на определенной плазмиде пропорциональна внутриклеточной концентрации регулятора A (комплекс *cAMP-CAP*), связанного с промотором, или $p \sim A/i$. Полагая, что после присоединения *RNA*-полимеразы к промотору происходит образование полноценного транскрипта клонированного гена, находим, что эффективность экспрессии пропорциональна вероятности считывания p , что в общем случае описывается зависимостью Михаэлиса-Ментен:

$$\varepsilon_i = \frac{\varepsilon_m \left(\frac{A}{i} \right)}{K_A + \left(\frac{A}{i} \right)} \quad (1)$$

Тогда уровень экспрессии клетки с i копиями плазмиды находится из выражения:

$$\varepsilon = i\varepsilon_i = \frac{\varepsilon_m A}{i \cdot K_A + A} \cdot i \quad (2)$$

Концентрация регулятора A (комплекс *cAMP-CAP*) зависит от концентрации ATP в клетках бактерий. Поскольку концентрации *cAMP* и ATP в клетках бактерий связаны:



концентрация *cAMP* зависит от концентрации энергетического субстрата в клетках следующим образом:

$$[cAMP] \approx \frac{A_m}{S^n}, \quad (4)$$

где A_m – константа, связанная со стехиометрией процесса (3), и n – число связывающих центров аденилатциклазы.

Отсюда следует, что эффективность экспрессии генов, клонированных под контролем *lac*-промотора, является функцией концентрации энергетического субстрата и количества плазмид в клетках бактерий:

$$\varepsilon(i, S) = i\varepsilon_i \approx \frac{\varepsilon_m \cdot i}{1 + i \cdot S^n / K_1} = \frac{\varepsilon_{\max}}{1 + \alpha \sigma^n}, \quad (5)$$

где $\alpha = \frac{K_S^n}{A_m} K_A \cdot i$, $\sigma = S / K_S$ – безразмерная концентрация субстрата, $\varepsilon_{\max} = \varepsilon_m i$ – уровень экспрессии клонированных генов.

Влияние экспрессии клонированных генов увеличивает траты на поддержание, трансгенных бактерий [6]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - \varepsilon(i, S). \quad (6)$$

Подставляя явный вид экспрессии клонированных генов (5) в выражение (6) получаем зависимость удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий от количества копий плазмиды i и концентрации субстрата в среде σ (рис. 1):

$$\mu(\sigma) = \mu_{\max} \frac{\alpha \sigma^{n+1} + (1 - \beta)\sigma - \beta}{(1 + \sigma)(1 + \alpha \sigma^n)}, \quad (7)$$

где $\beta = \varepsilon_{\max} / \mu_{\max}$, $\sigma = S / K_S$, – концентрация субстрата в среде в единицах K_S .

Таким образом, для трансгенных бактерий, содержащих клонированные гены в составе плазмид, существуют критические концентрации субстрата $\sigma_{кр}$, отличные от нуля, при которых рост бактерий прекращается и селективное преимущество бесплазмидных клеток σ_0 максимально. Для простейшего случая $n = 1$ эта концентрация субстрата находится из выражения:

$$\sigma_0 = \frac{1 - \beta}{2\alpha} \left(\sqrt{1 + \frac{4\alpha\beta}{(1 - \beta)^2}} - 1 \right). \quad (8)$$

Расчеты по формуле (7) показывают, что даже при постоянных тратах на поддержание клонированных генов селективное преимущество бесплазмидных клеток возрастает при низких скоростях размножения трансгенных бактерий (рис. 1).

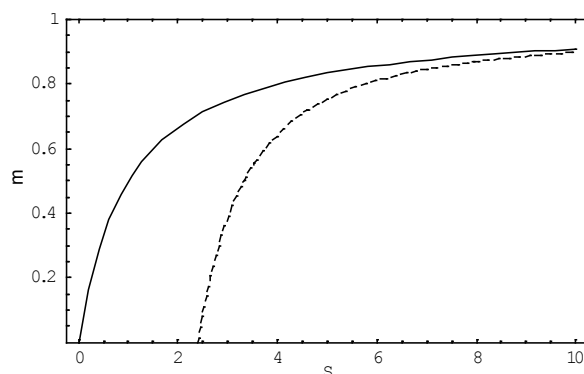


Рисунок 1. Теоретическая зависимость удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r Lux^+) μ от концентрации энергетического субстрата (рассчитано по формуле (7)). $n = 3$, $\mu_{\max} = 1$. Непрерывная кривая - $\alpha = 10$ и $\beta = 0$ (бесплазмидный вариант бактерий), штрихованная - $\alpha = 2$ и $\beta = 20$ (плазмидсодержащие трансгенные бактерии)

ЭКСПЕРИМЕНТЫ В НЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЕ

В наших экспериментах проводилось изучение экспериментальной эволюции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z905, содержащих клонированные гены биолюминесценции морских фотобактерий *Photobacterium leiognathi*, при длительном непрерывном культивировании бактерий в хемостате (рис. 2). Скорость размножения клеток популяции бактерий зависит от типа источника углерода и энергии (глюкоза, глицерин) и температуры среды. Удельная скорость разбавления среды в хемостате поддерживалась постоянной $D=0,22 \text{ час}^{-1}$, температура среды $T=30^\circ \text{C}$. Плотность популяции трансгенных бактерий на протяжении всего эксперимента составляла $X=0,33 \pm 0,03 \text{ г/л}$ по сухому весу. Гены биолюминесценции были клонированы на плазмиде pPHL-7 (Ap^r , Lux^+) с помощью вектора pUC-18 под контролем *lac*-промотора [10]. Интенсивность биолюминесценции трансгенных бактерий прямо пропорциональна концентрации люциферазы в клетках [10-12] и, таким образом, непосредственно характеризует уровень экспрессии клонированных генов.

Результаты экспериментов при непрерывном культивировании *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux^+) при различных температурах среды представлены на рис. 3. При снижении температуры культивирования с 37°C до 15°C уменьшается удельная скорость роста популяции, но при этом уровень удельного свечения клеток возрастает и достигает максимального значения при 15°C . Известно, что оптимальная температура роста для клеток бактерий *E. coli* составляет 37°C [5-8], в то же время, для морских фотобактерий *P. leiognathi*, из которых получены клонированные гены биолюминесценции, оптимальные температуры роста и свечения совпадают 26°C [10-12]. Возрастание экспрессии клонированных генов биолюминесценции при низких скоростях размножения у трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux^+) при низких температурах среды приводит к повышению популяционной стоимости плазмид («cost of plasmid», рис. 1, 3, 4).

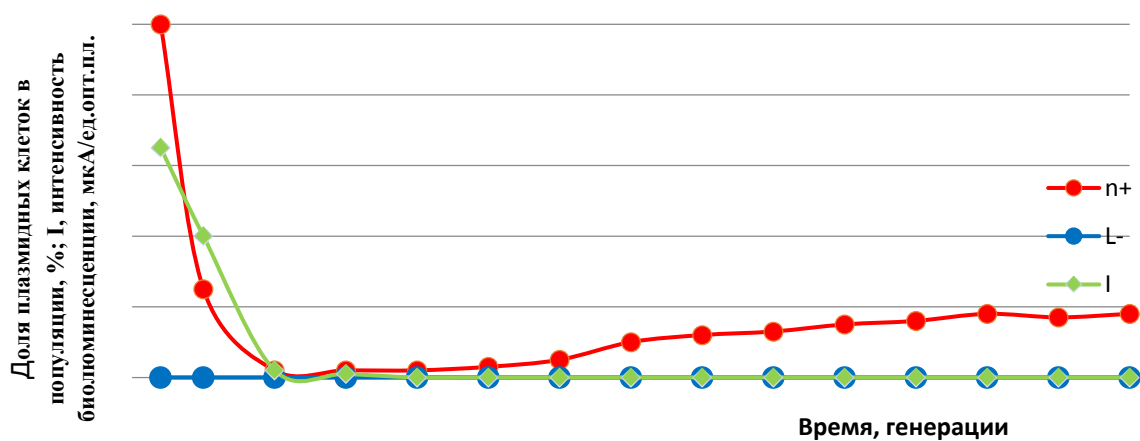


Рисунок 2. Экспериментальная эволюция популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r Lux^+) при длительном непрерывном культивировании в хемостате с лимитированием роста бактерий по глицерину в селективных условиях (50 мкг/мл ампициллина Ap в среде). Обозначения: n^+ – доля плазмидсодержащих клеток в популяции, выражающих фенотип (Ap^r , Lux^+); L^- – доля плазмидсодержащих клеток в популяции, выражающих фенотип (Ap^r , Lux^-); I – удельная интенсивность биолюминесценции трансгенных бактерий, мкА/ед. опт. пл.; 48 генераций – момент времени, когда была отключена подача ампициллина в среду для культивирования

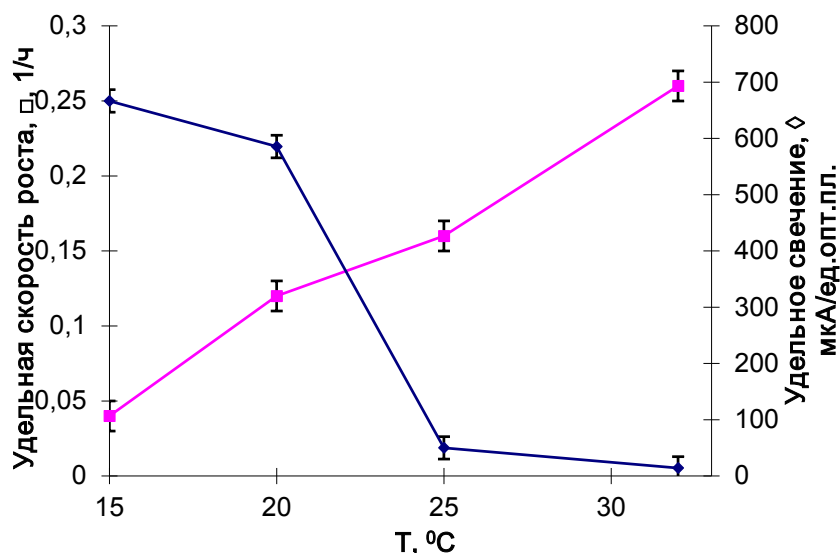


Рисунок 3. Зависимость удельной скорости роста популяции и удельной интенсивности билюминесценции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r , Lux^+) от температуры среды с глицерином. Обозначения: \square – удельная скорость роста популяции, час⁻¹; \diamond – удельная интенсивность билюминесценции, мКА/ед. опт. пл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что непрерывное культивирование микроорганизмов в хемостате является наиболее адекватной моделью природных условий с лимитированием роста недостатком субстратов, прежде всего, энергетических. Однако существует ряд экспериментальных данных, которые не учитываются в математической модели хемостата [5-8]. Выше предложена математическая модель, описывающая влияние экспрессии клонированных на плазидах генов на селективное преимущество бесплазмидных клеток при низких скоростях размножения бактерий (рис. 1). Таким образом, показано, что селективное преимущество бесплазмидных бактерий должно возрастать при низких скоростях размножения бактерий (формула (7), рис. 1).

С другой стороны, эффективность экспрессии клонированных генов у трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 (pPHL-7), (Ap^r , Lux^+) снижается при длительном культивировании в хемостате в процессе экспериментальной эволюции (рис. 2). Таким образом, в процессе приспособления к условиям окружающей среды селективное преимущество бесплазмидных бактерий, или «стоимость» поддержания плазмид в клетках бактерий, снижается, что приводит к выживанию и сохранению трансгенных бактерий в природных условиях (так называемый «плазмидный парадокс» [1-4,15,16]).

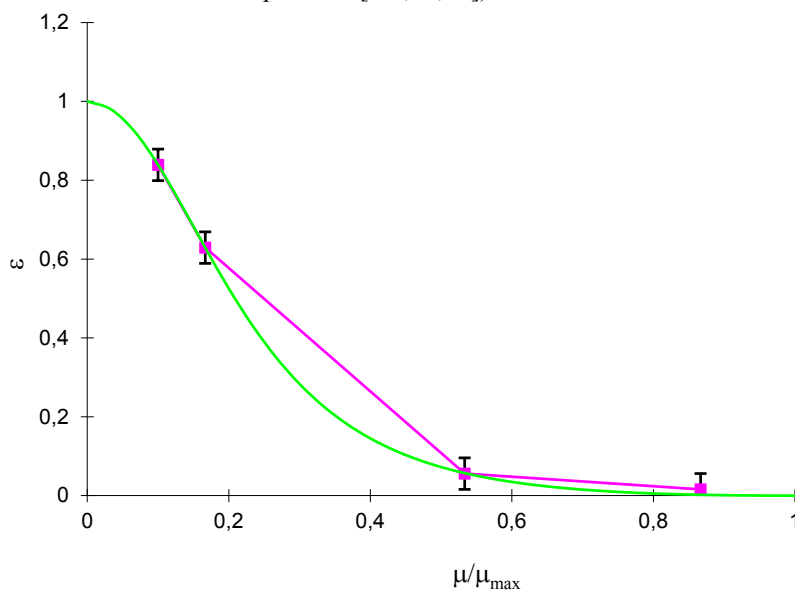


Рисунок 4. Снижение эффективности экспрессии клонированных генов билюминесценции при оптимальной удельной скорости роста популяции трансгенных бактерий *Escherichia coli* Z 905 pPHL-7 (Ap^r , Lux^+) при непрерывном культивировании на среде с глицерином как источником углерода и энергии. Обозначения: непрерывная линия – теоретическая кривая, рассчитанная по формуле (5)

В наших экспериментах было показано, что эффективность экспрессии клонированных генов биолюминесценции морских фотобактерий в *E. coli* Z 905 (Ap^r, Lux⁺) зависит не только от типа источника углерода и энергии, но и от температуры культивирования, задающей определенное физиологическое состояние клетки (рис. 3, 4). При низких температурах культивирования (15-20° С), далеких как от оптимальных для люминесцентной системы морских фотобактерий *P. leiognathi* (26° С), так и для роста *E. coli* (37° С), обнаружено возрастание эффективности экспрессии клонированных генов биолюминесценции фотобактерий (рис. 3). Причем, чем меньше удельная скорость роста популяции, тем выше уровень экспрессии клонированных на плазидах генов биолюминесценции. Таким образом, интенсивность экспрессии генов биолюминесценции отличается от аналогичной у исходных природных клеток-хозяев (морских светящихся бактерий *P. leiognathi*), и у новых трансгенных бактерий *E. coli* Z 905 (Ap^r, Lux⁺), которые получили их. Повышение эффективности экспрессии клонированных генов может привести к резкому возрастанию селективного преимущества бесплазмидных вариантов при низких скоростях роста трансгенных бактерий [2,3], что необходимо учитывать при использовании трансгенных бактерий, например, в процессах биоремедиации (биоаугментации).

Селективное преимущество бесплазмидных клеток по сравнению с плазмидсодержащими трансгенными бактериями («давление отбора», [8]) оценивается по разнице скоростей размножения трансгенной и бесплазмидной популяций [8,13] (рис. 1). Часто используемый близкий по смыслу параметр «стоимость приспособленности» («fitness cost») отличается от общепринятого определения селективного преимущества [1,2,4,15,16]. Стоимость приспособленности («fitness cost») определяется по динамике численностей этих популяций в конкурентных экспериментах при последовательных пересевах («transfer experiments») в смешанной культуре плазмидных и бесплазмидных клеток бактерий. Очевидно, что влияние экспрессии клонированных генов на скорость размножения бактерий необходимо учитывать в процессе оценки популяционной «стоимости» и динамики приспособленности трансгенных бактерий к условиям среды.

Список литературы / References

1. MacLean R.C., Millan A.S. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Current biology*, 2015, vol. 25, no. 17, pp. R764-R767.
2. Wein T., Hulter N.F., Mizrahi I., Dagan T. Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. *Nature com*, 2019, vol. 10, p. 2595.
3. Брильков А.В., Логинов Ю.Ю., Брилькова Е.В., Ганусов В.В., Шуваев А.Н. ГМО: Экспериментальная эволюция и проблемы безопасности. Красноярск: Изд-во Сибирского федерального университета, 2021, 224 с. [Brilkov A.V., Loginov Yu.Yu., Brilkova E.V., Ganusov V.V., Shuvaev A.N. GMOs: *Experimental Evolution and Safety Issues*. Krasnoyarsk: Publishing house of the Siberian Federal University, 2021, 224 p. (In Russ.)]
4. Carroll A.C., Wong A. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can. J. Microbiol.*, 2018, vol. 64, pp. 293-304.
5. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 1949, vol. 3, pp. 371-394.
6. Pirt S.J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Oxford: Blackwell Sci. publ., 1975, 274 p.
7. Novick A., Szilard L. Description of the chemostat. *Science*, 1950, vol. 112, pp. 715-718.
8. Moser H. *The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat*. Carnegie institution of Washington, 1958, 136 p.
9. Gitelzon I.I., Pechurkin N.S., Brilkov A.V. *Population Problems in the Biology of Unicellular Organisms*. London: Harwood Academic Publ. GmbH (United Kingdom), 1989, 77 p.
10. Illarionov B.A., Blinov V.M., Donchenko A.P. e. al. Isolation of Bioluminescent Functions From *Photobacterium leiognathi*: Analysis of luxA, luxB, luxG and Neighboring Genes. *Gene*, 1990, vol. 86, pp. 89-94.
11. Zavilgelsky G.B., Shakulov R.S. Mechanisms and Origin of Bacterial Bioluminescence. *Mol. biol.*, 2018, vol. 52., no. 6, pp. 935-947.
12. Тюлькова Н.А., Сандалова Т.П. Сравнительное исследование влияния температуры на бактериальные люциферазы. *Биохимия*, 1996, т. 61, вып. 2, с. 275-287. [Tyulkova N.A., Sandalova T.P. Comparative study of the effect of temperature on bacterial luciferases. *Biochemistry*, 1996, vol. 61, no. 2, pp. 275-287. (In Russ.)]
13. Levin B.R., Stewart F.M. The population biology of bacterial plasmids: A priori conditions for the existence of conjugationally transmitted factors. *Genetics*, 1977, vol. 87, no. 10, pp. 209-228.
14. Jones I.M., Primrose S.B., Robinson A., Ellwood D.C. Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture. *Mol. Gen. Genet.*, 1980, vol. 180, pp. 579-584.
15. Lenski R.E. Evaluating the fate of genetically modified microorganisms in the environment: are they inherently less fit? *Experientia*, 1993, vol. 49, pp. 201-209.
16. Cooper T.F., Rozen D.E., Lenski R.E. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Echerichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 3, pp. 1072-1077.

MATHEMATICAL MODELLING OF TRANSGENIC BACTERIA EXPERIMENTAL EVOLUTION (GMO) IN MODEL AND NATURAL ECOSYSTEMS**Brilkov A.V.¹, Loginov Yu.Yu.^{1,2}, Brilkova E.V.^{1,3}, Ganusov V.V.², Jabrun I.V.⁴, Shuvaev A.N.⁵**¹ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru*² Reshetnev Siberian State University of Science and Technology*Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia; e-mail: loginov@sibsau.ru*³ Institute of biophysics FRC SB RAS*Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia; e-mail: evmorbril@mail.ru*^{2*} Present address: University of Tennessee*Knoxville, TN 37996-1937, USA; e-mail: vitaly.ganusov@gmail.com*⁴ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: ijabrun@sfu-kras.ru*⁵ Siberian Federal University*Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia; e-mail: ashuvaev@sfu-kras.ru*

Abstract. The paper analyzes the experimental evolution of transgenic microorganisms (GMOs) under conditions of limiting their growth by energy substrates. These conditions are typical for the development of GMOs in nature. The most adequate ecological model of natural conditions is a continuous cultivation in the chemostat. It has been shown that the cost of maintaining GMOs sharply increases at low rates of reproduction of transgenic bacteria. This is due to an increase in the efficiency of expression of cloned genes while limiting the growth of GMOs. Experiments revealed an increase in the efficiency of expression of bioluminescence genes of marine luminescent bacteria *Photobacterium leiognathi*, cloned in *Escherichia coli* Z905, at low growth rates during continuous cultivation.

Key words: *transgenic microorganisms, experimental evolution, fitness cost, mathematical modeling, continuous culture.*