

СТОХАСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЛАЗМИД

А.Н. Шуваев, А.В. Брильков^{*}

Плазмиды, внехромосомные кольцевые молекулы ДНК, несут в себе дополнительные функции, например, позволяя бактериям выживать в неблагоприятной среде с антибиотиками и токсическими веществами. Стохастичность возникает в двух основных процессах динамики плазмид: репликации во время жизненного цикла бактерии и сегрегации при делении. В работе построена стохастическая модель эволюционной динамики плазмид с использованием приближения в виде одношаговых процессов. Исследовалась динамика при малых смещениях, для чего применялся подход Бюргесса. Анализ показывает, что релаксация системы к равновесному состоянию происходит в форме процесса Орнштейна-Уленбека. Полученные кривые были сопоставлены с экспериментальными данными. При этом показано, что гиперболический механизм ингибирования репликации хорошо описывает процесс контроля репликации.

Плазмиды бактерий – внехромосомные молекулы ДНК, чаще кольцевидной формы, являются дополнительным генетическим материалом клетки (кроме основного – хромосомы). Они несут в себе дополнительные функции, позволяя плазмидсодержащей клетке выживать в неблагоприятной среде с антибиотиками и токсическими веществами [1]. Кроме того, плазмиды широко применяются и в биотехнологических процессах для получения активных штаммов-продуцентов. Часто в бактериальной клетке существует несколько копий одной и той же плазмиды, иногда несколько десятков [1-3]. Однако поддержание большого числа копий плазмиды в клетке весьма дорогостояще и поэтому невыгодно при отсутствии неблагоприятного для популяции фактора.

^{*} © А.Н. Шуваев, Институт биофизики СО РАН, andrejshuvaev@yandex.ru; А.В. Брильков, Красноярский государственный университет, bril@ibp.ru, 2006.

В настоящей работе построена стохастическая модель эволюционной динамики плазмид, т.е. изменения количества плазмид в бактериальной клетке с течением времени. 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 плазмиды, возникает бесплазмидный штамм. Таким образом, поскольку в течение клеточного цикла количество плазмид варьирует, существует распределение клеток в популяции по количеству плазмид.

Модель динамики плазмид в виде одношагового процесса. Будем рассматривать динамику бактериальных плазмид в одной клетке. В этом случае 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. Этот процесс можно изобразить следующим образом (рис. 1).

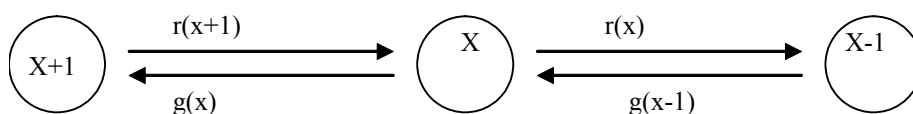


Рис. 1 Изображение динамики плазмид в виде одношагового процесса:
 X – количество плазмид в данном состоянии, $r(x)$ – вероятность потери одной копии плазмиды,
 $g(x)$ – вероятность увеличения количества плазмид (на 1)

Здесь окружностями обозначены состояния, $r(x)$ и $g(x)$ – вероятности перехода между ними. Переход осуществляется через определенный интервал времени (время между двумя последовательными делениями). Если отсутствует передача плазмид между бактериями в процессе конъюгации, то эта схема соответствует Марковскому процессу. Этот случай неконъюгативных плазмид и рассматривается в настоящей работе.

Переходы между состояниями (рис. 1) обусловлены несколькими факторами. В первом приближении всех их можно разделить на две 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).

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 $x \rightarrow \infty$. Такую зависимость можно описать сигмоидой, экспоненциальной и гиперболической функциями. Исходя из современных представлений по контролю репликации [2], можно выбрать последний. При нормировке следует учитывать ограниченность клеточных ресурсов на поддержание плазмид и интегрировать в пределах $(0, X_{\max})$. Тогда, с учетом нормировочного множителя, имеем:

$$g(x) = \frac{1}{1 + k_g x} \frac{k_g}{\ln(1 + k_g X_{\max})}. \quad (1)$$

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:

$$r(x) = \frac{1}{1 + \frac{1}{k_r x}} \frac{k_r}{X_{\max} k_r - \ln(1 + k_r X_{\max})}. \quad (2)$$

Величины k_g и k_r здесь играют роль параметров.

Приближение для одношаговых процессов. Схеме на рис. 1 соответствует управляющее уравнение:

$$\frac{dP(x, t)}{dt} = r(x+1)P(x+1, t) + g(x-1, t)P(x-1, t) - (r(x) + g(x))P(x, t). \quad (3)$$

Так как мы предполагаем изменения в количестве плазмид малыми, можно заменить в правой части оператор сдвига оператором дифференцирования [7]: $f(x+a) = \exp(aD)f(x)$. Получаем:

$$\frac{dP(x,t)}{dt} = e^D \{r(x)P(x,t)\} + e^{-D} \{g(x)P(x,t)\} - (r(x) + g(x))P(x,t). \quad (4)$$

Раскладывая в ряд Тейлора оператор дифференцирования, окончательно получаем приближение Фоккера-Планка для одношаговых процессов [5]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P(x, t)}{\partial t} &= \left\{1 + \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{2!} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \dots\right\} [r(x)P(x, t)] + \left\{1 - \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{2!} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \dots\right\} [g(x)P(x, t)] = \\ &= -\frac{\partial}{\partial x} [(g(x) - r(x))P(x, t)] + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial x^2} [(g(x) + r(x))P(x, t)]. \end{aligned} \quad (5)$$

Непосредственное решение уравнения (5) сложно, но его можно получить при исследовании поведения около стационарного положения. Для этого воспользуемся методом, предложенным Бюргессом [4, 5].

Для этого достаточно знать, что $g(x)$ монотонно убывает с x , а $r(x)$ монотонно растет (рис. 2). Область пересечения двух кривых будет решением в стационарной точке системы уравнений (1, 2).

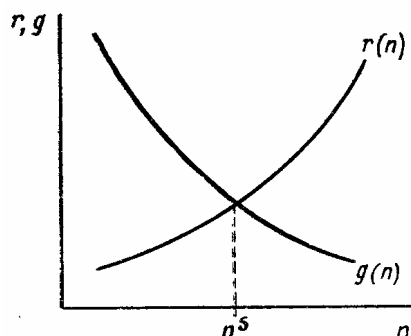


Рис. 2. Стационарное состояние системы при равновесии между $r(n)$ и $g(n)$

В стационарной точке имеем $r(x^{st}) = g(x^{st})$. Далее положим

$$x = x^{st} + f, \quad (6)$$

где f – малое смещение из стационарной точки. Подставляя (6) в (5), разложив коэффициенты по f и оставив только неисчезающие члены, получаем:

$$\frac{\partial P(f,t)}{\partial t} = (r'(x^{st}) - g'(x^{st})) \frac{\partial}{\partial f} [fP(f,t)] + \frac{r(x^{st}) + g(x^{st})}{2} \frac{\partial^2 P(f,t)}{\partial f^2}. \quad (7)$$

Решение уравнения (7) известно – к положению равновесия система релаксирует в виде процесса Орнштейна-Уленбека [6]:

$$P(f, t | f_0, t_0) = \sqrt{\frac{\eta}{2\pi\xi(1 - \exp[-2\eta(t - t_0)])}} \exp\left[-\frac{\eta(f - f_0 \exp[-\eta(t - t_0)])^2}{2\xi(1 - \exp[-2\eta(t - t_0)])}\right]. \quad (8)$$

Здесь $\eta = (r'(x^{st}) - g'(x^{st}))$, $\xi = \frac{r(x^{st}) + g(x^{st})}{2}$.

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

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

Здесь S – отношение нормирующих множителей: $S = \frac{k_g}{k_r} \frac{X_{\max} - \ln(1 + k_r X_{\max})}{\ln(1 + k_g X_{\max})}$.

Подставляя это значение сначала в (1) и (2), а затем в (8), получаем распределение Гаусса, релаксирующее к равновесному состоянию. Время релаксации находим из соотношения

$$\tau = \frac{1}{r'(x^{st}) - g'(x^{st})}. \quad (9)$$

Для иллюстрации, положим, что в начальный момент времени $t_0 = 0$, начальное смещение $f_0 = 5$ плазмид. Графически решение (8) с использованием (1) и (2) представлено на рис. 3.

Значения вероятности того, что бактерия содержит $x^{st} + f$ плазмид, в зависимости от времени представлены на рис. 4.

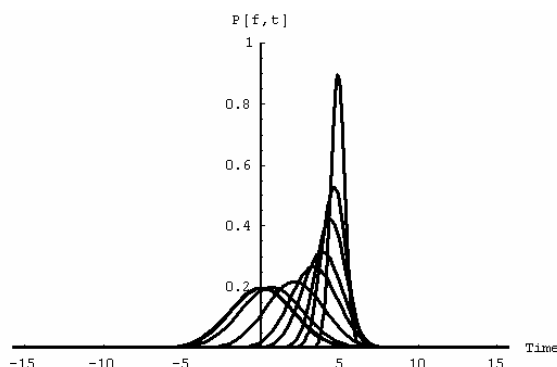


Рис. 3. Релаксация распределения вероятности (8) к равновесному состоянию. $k_g = 0.9$ [plasmid⁻¹],

$k_r = 10.0$ [plasmid⁻¹], x^{st} принято за начало координат

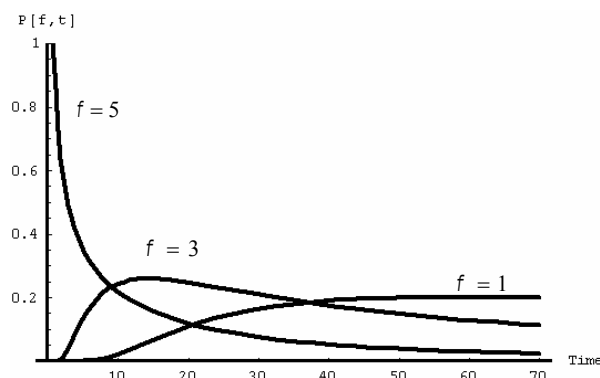


Рис. 4. Вероятность смещения f [plasmid] от равновесного значения в зависимости от времени. Расчеты проводились по уравнению (8). Время – в относительных единицах. $k_g = 0.9$ [plasmid⁻¹],

$k_r = 10.0$ [plasmid⁻¹]

Сравнение с экспериментом. Сравнение расчетных данных по стохастической модели популяционной динамики плазмид (сплошная линия) с экспериментальными данными Terawaki et al. [3] приведено на рис. 5. 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: $k_g = 0.05$ [plasmid⁻¹], $k_r = 10$ [plasmid⁻¹]. Отметим, что хорошее соответствие с экспериментальными данными существенно зависит от варьирования этих параметров.

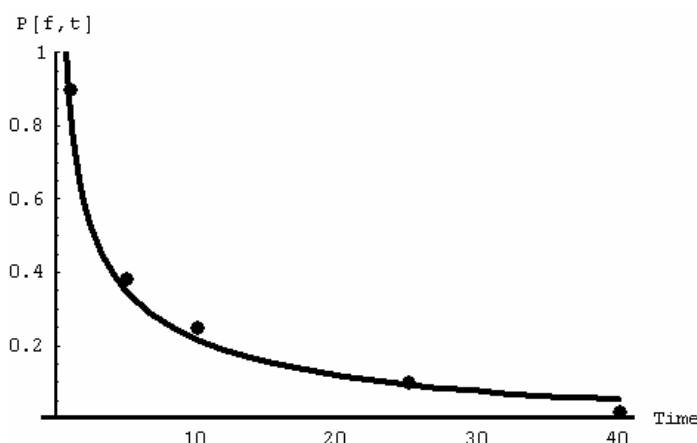


Рис. 5. Сравнение расчетных данных стохастической модели (сплошная линия) с экспериментальными данными [3]. $k_g = 0.9$ [plasmid⁻¹], $k_r = 10.0$ [plasmid⁻¹]

Обсуждение. Стохастический подход с уравнением Фоккера-Планка был использован Rouzine et al. для изучения эволюции вирусов [8]. В области изучения популяционной динамики плазмид стохастическими методами можно отметить работы Ehrenberg [9] и Paulsson and Ehrenberg [2]. 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 равнове-

сия. Показано, что задача сводится к известным стохастическим уравнениям и, в частности, к уравнению Фоккера-Планка (5, 7), которые, в целом, неплохо описывают процесс релаксации распределения количества плазмид после возмущения к равновесному состоянию. С помощью подхода Бюргесса удалось оценить вклад каждого периода жизненного цикла бактерии в отдельности в динамику плазмид. Показано, что поведение распределения для количества копий плазмиды может быть представлено в виде процесса Орнштейна-Уленбека (8). Большое практическое значение может иметь оценка времени релаксации (9).

Результаты стохастического моделирования могут быть использованы в медицине для оценки времени исчезновения внутрибольничных инфекций, вызванных резистентными микроорганизмами, и в биотехнологии для оценки параметров нестабильности генноинженерных плазмидсодержащих штаммов продуцентов [10].

Авторы выражают благодарность профессору А. М. Баранову за ценные замечания при рецензировании работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Summers D.K. The biology of plasmids. – Cambridge, MA: Blackwell science, 1996.
2. Paulsson J., Ehrenberg M. // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 279. – P. 73.
3. Terawaki Y., Ishizu K., Horiuchi S., Goto, N., Nakaya R. // J. Bacteriol. – 1976. – V. 128. – No. 3. – P. 693.
4. Burgess R. // Proc. Phys. Soc. London. – 1956. – B69. – P. 1020.
5. 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.
6. Risken H. The Fokker-Planck equation. Methods of solution and applications. – New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1989.
7. Маделунг Э. Математический аппарат физики. – М.: «Физматгиз», 1960.
8. Rouzine I. et al. // Microbiol. And Mol. Biol. Reviews. – 2001. – V. 65. – No. 1. – P. 151.
9. Ehrenberg M. // Biophys. J. – 1996. – V. 70. – P.135.
10. Печуркин Н.С. Популяционные аспекты биотехнологии / Н.С.Печуркин, А.В.Брильков, Т.В.Марченкова. – Новосибирск: Наука, 1990.

STOCHASTIC MODEL OF BACTERIAL PLASMIDS DYNAMICS

A.N. Shuvaev, A. V. Bril'kov

Plasmids, the extrachromosomal ring-like DNA molecules, bear itself the additional functions, for example allowing the bacteria to stay alive in unfavourable media with antibiotics and toxic substances. Stochasticity arises in two main processes of plasmid dynamics: replication during the life cycle of bacteria and segregation during the partition. In this work the stochastic model of evolutionary dynamics of plasmids was constructed using the approximation in the form of one step processes. To investigate the dynamics in the case of small displacements, the Burgess approach was used. Analysis shows that relaxation of the system to the steady state occurs as a Ornstein-Uhlenbek process. Founded curves were compared with experimental data. It was shown that hyperbolic mechanism of inhibition of replication describes the replication control in a good way.