

УДК 577.31

Катрин ТОМСОН, Пеэтер ЛИЙК, Райво ВИЛУ

ПРОБЛЕМЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ НЕСТАБИЛЬНЫХ ПЛАЗМИДСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК- ПРОДУЦЕНТОВ

Развитие современной биотехнологии неразрывно связано с применением плазмидсодержащих продуцентов. Однако при их культивировании наблюдается довольно быстрая потеря плазмидсвязанных полезных синтезов — клетки пытаются как бы избавиться от навязанной им чужеродной нагрузки, которая может достигать весьма существенных размеров. Например, продукция белка плазмидных генов может составлять до 25% от всего синтезированного клеточного белка. В настоящее время известно, что нестабильность плазмидсодержащих продуцентов определяется особенностями следующих процессов: а) репликацией рекомбинантных плазмид, б) сегрегацией плазмид между дочерними клетками при делении клеток, в) модификацией и рестрикцией плазмид, г) регуляцией транскрипции и трансляции плазмидных генов, д) посттрансляционной модификацией, самосборкой и деградацией чужеродных белков, е) транспортом готового продукта из клетки, а также клеточных механизмов регуляции, приводящих к изменению (как правило, к уменьшению) скорости роста трансформированных клеток. На основании знания указанных механизмов возможно решение основной прикладной задачи в этой области — целенаправленного выбора вектора и клетки-реципиента для достижения максимальной продуктивности каждого конкретного процесса производства.

Для феноменологического описания нестабильности плазмидсодержащих продуцентов рассмотрим сначала проблему т.н. физической нестабильности плазмидной ДНК. В результате протекания указанных процессов (пункты а—в) плазмидная ДНК может или физически исчезать из клеток-реципиентов, или модифицироваться, в том числе таким образом, что целевой продукт более не синтезируется. Следуя Т. Иманака и С. Айба (Imanaka, Aiba, 1981), рассмотрим простейшую модель, описывающую физическую нестабильность плазмидной ДНК. Предположим, что мы имеем только два типа клеток: плазмидсодержащие (пл⁺-клетки) и плазмиднесодержащие (пл⁻-клетки), концентрации которых в культуре x_+ и x_- имеют удельные скорости роста μ_+ и μ_- соответственно. Предполагая, что вероятность потери плазмид пропорциональна удельной скорости роста пл⁺-клеток, получим для непрерывной культуры систему

$$\begin{aligned} dx_+/dt &= \mu_+ x_+ - \rho \mu_+ x_+ - D x_+, \\ dx_-/dt &= \mu_- x_- + \rho \mu_+ x_+ - D x_-, \end{aligned} \quad (1)$$

где D — скорость протока; $\mu_+ x_+$ и $\mu_- x_-$ — прирост соответствующих клеток; $D x_+$ и $D x_-$ — разбавление клеток протоком; $\rho \mu_+ x_+$ — процесс образования пл⁻-клеток из пл⁺. Скорость последнего процесса зависит

от удельной скорости роста, т.е. от частоты деления клеток. В случае стационарного состояния получим из системы (1)

$$\begin{aligned} D &= (1 - p)\mu_+, \\ x_+/x_- &= (D - \mu_-)/p\mu_+, \end{aligned} \quad (2)$$

т.е. для достижения стационарного состояния $x_+ \neq 0$ необходимо, чтобы $D < \mu_+$. Из соотношения x_+/x_- видно, что для $x_+/x_- > 0$ в стационарном состоянии необходимо, чтобы $D > \mu_-$. Итак, сосуществование указанных двух типов клеток в стационарном состоянии культивирования возможно при скорости потока, удовлетворяющей условию

$$\mu_- < D < \mu_+. \quad (3)$$

D в интервале (μ_-, μ_+) предопределяет стационарное соотношение x_+/x_- пл⁺- и пл⁻-клеток в культуре. Сравнимые количества обоих типов клеток наблюдаются только в случае, если $D \cong (\mu_+ + \mu_-)/2$.

Тогда

$$\mu_- + \mu_+ p \cong D \cong \mu_+ - p\mu_+.$$

Как известно, «природные» плазмидные гены кодируют белки или ферменты, обеспечивающие клетке преимущества в селективных условиях — при росте в присутствии антибиотиков и на субстратах, которые пл⁻-клетками не утилизируются и т.д. В биотехнологических же приложениях клонированные гены, как правило, клетке-реципиенту не нужны (гормон роста человека в *E. coli* и т.д.). В этом случае плазмиды являются при росте клеток-реципиентов метаболической нагрузкой, приводящей к дополнительным синтезам и вместе с тем к уменьшению их удельной скорости роста по сравнению с пл⁻-клетками ($\mu_+ < \mu_-$). Полученные экспериментальные данные (Imanaka, Aiba, 1981) свидетельствуют о том, что удельная скорость роста пл⁻-клеток в неселективных условиях в 1—2,5 раза больше соответствующей величины пл⁺-клеток. Это означает, что в неселективных условиях пл⁺-клетки неизбежно исчезают из культуры во время культивирования. Справедливость данного вывода не зависит от способа культивирования. Выражение для скорости исчезновения пл⁺-клеток в проточной культуре в неселективных условиях мы получаем, решая систему (1)

$$\begin{aligned} F(t) &= x_+/(x_+ + x_-) = \\ &= ((p\mu_+ / (\mu_- - \mu_+ + p\mu_+) + x_-^0 / x_+^0) \exp((\mu_- - \mu_+ + p\mu_+)t) + \\ &\quad + (\mu_- - \mu_+) / (\mu_- - \mu_+ + p\mu_+))^{-1}. \end{aligned} \quad (4)$$

Как видно из выражения (4) и учитывая уравнение Моно $\mu = \mu_{\max} \times S / (K_s + S)$, кинетика изменения содержания пл⁺- и пл⁻-клеток определяется значениями пяти параметров: $\mu_{\max}^-$, $\mu_{\max}^+$, K_{s^-} , K_{s^+} и p . Очевидно в случае практического применения неселективных условий культивирования для получения недорогого продукта можно руководствоваться правилом: культивирование вести до тех пор, пока сохраняется достаточное количество пл⁺-клеток (активных продуцентов), а момент окончания определять экспериментально исходя из результатов опытного культивирования. Подробный количественный анализ указанной ситуации дан в работе Д. Ф. Оллиса (Ollis, 1982). Для определения же указанных параметров (теоретический интерес представляют особенно параметры роста пл⁺-клеток) существуют по крайней мере две возможности. Необходимые значения можно определить с помощью соответствующих математических методов анализа по кривой $F(t)$. Естественно, что для этого необходимо надежное экспериментальное определение указанной зависимости, что, по-видимому, не всегда выполнимо по причине погрешности часто применяемого метода высева. Другой возможностью определения

значений указанных констант является раздельное культивирование пл⁺-клеток в неселективных условиях и пл⁺-клеток в селективных условиях в проточных культурах. В этом случае определение $\mu_{\max}$ и K_S сводится к рутинному экспериментальному определению хемостатной кривой (зависимости скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата $\mu=f(S)$) для пл⁺-клеток.

Для определения параметров $\mu_{\max}$, K_S и p , характеризующих пл⁺-клетки, рассмотрим систему уравнений (1). Предполагая, что пл⁺-клетки в селективных условиях теряют способность расти, получим в случае стационарного состояния из уравнения (1)

$$x_+/x_- = (1 - p)/p,$$

т. е. соотношение концентраций пл⁺- и пл⁺-клеток остается постоянным при тех скоростях протока (D), при которых стационарное состояние достижимо. После определения вероятности p , из хемостатной кривой возможно определить также значения $\mu_{\max}$ и K_S .

До сих пор мы рассматривали сформулированную модель с точки зрения описания физической стабильности плазмид во время культивирования клеток-реципиентов и определения соответствующих феноменологических параметров. Однако при попытках практического применения плазмидных продуцентов нас непосредственно интересует продуктивность плазмид-кодируемых генов. В качестве продуктов могут выступать как низкомолекулярные продукты, образовавшиеся в результате деятельности ферментов, кодированных плазмидными генами, так и соответствующие белки (ферменты). Они могут оставаться в составе биомассы, или быть выведены из клеток-продуцентов. Из проведенного анализа видно, что культивирование плазмидного продуцента в неселективных условиях приводит неизбежно к исчезновению пл⁺-клеток из ферментера, и тем самым к потере интересующей нас продукции. Так как в селективных условиях $\mu_+ > \mu_-$ (как правило, $\mu_- = 0$), то при проведении производственных процессов следует принимать во внимание эту сохраняющую пл⁺-клетки способность. Однако и в этом случае нельзя полностью избежать нестабильности процесса синтеза из-за потери плазмид, а также из-за возможных структурных перестроек плазмидной ДНК, приводящих к инактивации «гена-продуцента» (член $p\mu_+x_+$ в уравнении (1)). Добавив к системе уравнений (1) уравнения синтеза продукта и утилизации субстрата, получим при $\mu_- = 0$ систему

$$\begin{aligned} dx_+/dt &= \mu_+x_+ - p\mu_+x_+ - Dx_+, \\ dx_-/dt &= p\mu_+x_+ - Dx_-, \\ dS/dt &= \mu_+x_+/Y_{XS^*} + (S_0 - S)D, \\ dP/dt &= Y_{PX^*}\mu_+x_+ - PD, \end{aligned} \quad (5)$$

где S — концентрация лимитирующего субстрата в ферментере; P — концентрация синтезируемого продукта; S_0 — концентрация лимитирующего субстрата в подаваемой в ферментер среде; Y_{XS^*} — выход биомассы в пересчете на единицу использованного субстрата для пл⁺-клеток (здесь рассматривается случай, когда синтез продукта связан с ростом); Y_{PX^*} — выход продукта в пересчете на единицу синтезированной биомассы клеток. Рассмотрим два случая: первый — с нестабильным геном ($p > 0$) и второй — с полностью стабильным геном-производителем ($p = 0$). При $p > 0$ получим из первого уравнения системы (5) для стационарного состояния, как и выше, $D = (1 - p)\mu_+$ (см. уравнение (2))

$$x_+ = Y_{XS^*} (S - S_0) D / \mu_+ = Y_{XS^*} (S - S_0) (1 - p), \quad (6)$$

$$P = Y_{PX^*} x_+ \mu_+ / D = Y_{PX^*} Y_{XS^*} (S - S_0).$$

Продуктивность единицы объема ферментера выражается, как известно,

$$\begin{aligned} Q_X &= x_+ D, \\ Q_P &= P D, \end{aligned} \quad (7)$$

где Q_X — продуктивность по биомассе, Q_P — продуктивность по продукту.

Подставляя (6) в формулу (7) и учитывая, что скорость протока $D = (1-p)\mu_+$, получим:

$$\begin{aligned} Q_X &= Y_{XS^*} (S - S_0) (1-p) D = Y_{XS^*} (S - S_0) (1-p)^2 \mu_+, \\ Q_P &= Y_{PX^*} Y_{XS^*} (S - S_0) D = Y_{PX^*} Y_{XS^*} (S - S_0) (1-p) \mu_+ = \\ &= Y_{PS^*} (S - S_0) (1-p) \mu_+, \end{aligned}$$

где $Y_{PS^*} = Y_{PX^*} Y_{XS^*}$ — коэффициент выхода продукта в пересчете на единицу потребленного субстрата. Принимая во внимание уравнение Моно, получим

$$\begin{aligned} Q_X &= Y_{XS^*} (S - S_0) (1-p)^2 \mu_{\max^*} S / (K_{S^*} + S), \\ Q_P &= Y_{PS^*} (S - S_0) (1-p) \mu_{\max^*} S / (K_{S^*} + S). \end{aligned} \quad (8)$$

Как видно из приведенных выражений, продуктивность при заданном S зависит в обоих случаях от значений Y_{PS^*} и $\mu_{\max^*}$, и в условиях лимита по субстрату также от K_{S^*} , т.е. от характеристик пл⁺-клеток. Чем больше значения Y_{PS^*} и $\mu_{\max^*}$, тем больше продуктивность. Однако следует отметить, что по логике регуляции внутриклеточного метаболизма $\mu_{\max^*}$ тем меньше, чем больше Y_{PS^*} . Если $\mu_{\max^*} = f(Y_{PS^*})$ — нелинейная функция, то существуют оптимальные значения Y_{PS^*} и $\mu_{\max^*}$, при которых продуктивности Q_X и Q_P максимальные, и первая задача исследователей заключается в конструировании систем, обладающих именно этими оптимальными значениями.

Как видно из (8), продуктивность зависит также от значения вероятности p . Сравнение нестабильной системы ($p > 0$) с соответствующей стабильной ($p = 0$) показывает, что

$$\begin{aligned} Q_{X \text{ нестаб}} &= (1-p)^2 Q_{X \text{ стаб}}, \\ Q_{P \text{ нестаб}} &= (1-p) Q_{P \text{ стаб}}. \end{aligned} \quad (9)$$

Видно, что при значениях вероятности p , заметно отличающихся от нуля, потери продуктивности могут быть существенными, особенно, если целевой продукт выделяется из биомассы. Отсюда вытекает вторая задача оптимального конструирования плазмидных продуцентов — задача генетической стабилизации генов-производителей.

До сих пор мы рассматривали самую простую модель, согласно которой клетки либо содержали, либо не содержали плазмиды, и все ростовые характеристики (Y_{XS} , $\mu_{\max}$ и т.д.) зависели только от этого. В то же время значение p оставалось постоянным. Вполне очевидно, что такая ситуация при экспериментальных исследованиях может не реализовываться, особенно в переходных процессах. Реально ростовые характеристики клеток зависят не только от наличия или отсутствия плазмид, но и от их количества в конкретной клетке (copy-number) и изменяющееся распределение плазмид в клетках во время культивирования приводит к тому, что p не является постоянной величиной.

Учет указанных обстоятельств значительно усложняет проведение соответствующих феноменологических моделей. В качестве примера рассмотрим следующую модель: число плазмид, полученных в момент «рождения» клетки удваивается, плазмидные ДНК распределяются при деле-

нии между (одинаковыми) дочерними клетками с равной вероятностью $q=0,5$, все ростовые параметры клеток зависят от количества содержащихся в них плазмид. Допустим, что существует максимальное количество плазмид (n), при которых клетка сохраняет еще жизнеспособность. Тогда вероятность возникновения i -плазмидной клетки из j -плазмидной (после предварительного удвоения их числа) определена законом биномиального распределения

$$p(j, i) = j! / (i! (j - i)! 2^{-j}).$$

Учитывая, что i -плазмидные клетки могут возникать из клеток, унаследовавших $[(i+1)/2]$, $[(i+1)/2] + 1, \dots, n$ плазмид, получим

$$dx_i/dt = -\mu_i x_i + \sum_{j=[(i+1)/2]}^n 2p(2j, i) \mu_j x_j, \quad (10)$$

где μ_i , x_i — соответственно удельная скорость роста и концентрация i -плазмидных клеток при $i=0, 1, 2, \dots, n$.

В качестве примера решим полученную систему линейных дифференциальных уравнений методом Рунге—Кутты на ЭВМ. При одинаковом начальном распределении клеток и скорости роста $\mu_i=0,5 \text{ ч}^{-1}$ или $\mu_i=1-2|(n/2-i)|/n$, если $|n/2-i|$ — абсолютная величина. В первом случае моделируются неселективные условия культивирования, во втором — селективные. В неселективных условиях плазмидные клетки исчезают из культуры в полном согласии с «простой» моделью, в селективных же условиях устанавливается стационарное распределение клеток, которое зависит от значений μ_i (рис. 1, 2).

Как видно из примера, учет распределения плазмид заметно усложняет модель и приводит к необходимости измерения количества плазмид в клетках. Для решения указанной проблемы в настоящее время еще отсутствуют реальные возможности.

Приведенная модель построена с использованием предположений об особенностях клеточных механизмов репликации и сегрегации плазмид, которые, однако, нельзя считать доказанными. Экспериментального подтверждения требуют предположения о случайной сегрегации плазмид между дочерними клетками при делении, а также о точном удвоении при этом количества плазмид. В принципе возможен механизм репликации, восстанавливающий некоторое распределение плазмид независимо от их унаследованного количества. В этом случае вероятность возникновения бесплазмидных клеток постоянна и находится в согласии с «простой» моделью, рассмотренной выше.

Механизмами, способными изменять распределение плазмид в клетках, их количество и первичную структуру, являются рестрикция и рекомбинация. В результате рестрикции инактивируются и деградируются плазмидные гены, в результате рекомбинации незначительно изменяются лишь плазмидные ДНК (замена нескольких оснований и т. д.), хотя возможны и значительные перестройки (делеции и т. д.). Указанные процессы протекают независимо от деления клеток. Поэтому для их учета вместо члена $\rho \mu_+ x_+$ необходимо ввести ρx_+ , что в стационарном состоянии приводит к зависимости соотношения x_+/x_- от D , т. е. $x_+/x_- = D/\rho$. Это обстоятельство позволяет идентифицировать по хемотатной кривой механизм возникновения бесплазмидных клеток.

Механизмы, изменяющие количество и первичную структуру плазмидов, не оказывают прямого влияния на значение $\mu_{\max+}$ и/или $\mu_{\max-}$, так как ДНК составляет 2—5% от сухого вещества клетки. Их влияние на ростовые характеристики клеток (в первую очередь через изменение соответствующих $\mu_{\max}$, как указано) реализуется благодаря тому, что они могут значительно изменять интенсивность экспрессии генов-произ-

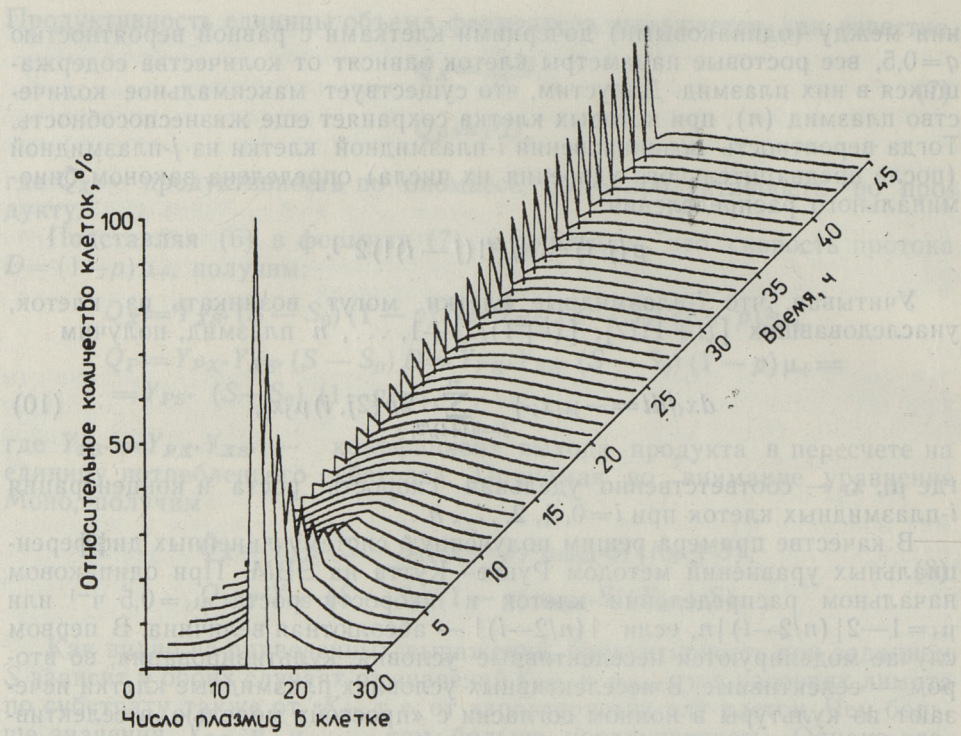


Рис. 1. Изменение распределения плазмид в клетках согласно уравнению (10) в случае моделирующего роста клеток в неселективных условиях. В момент времени $t=0$ существовали только клетки, содержащие 15 плазмид. Начальное распределение $i=0, 1, \dots, n, \mu_i=0,54-1$.

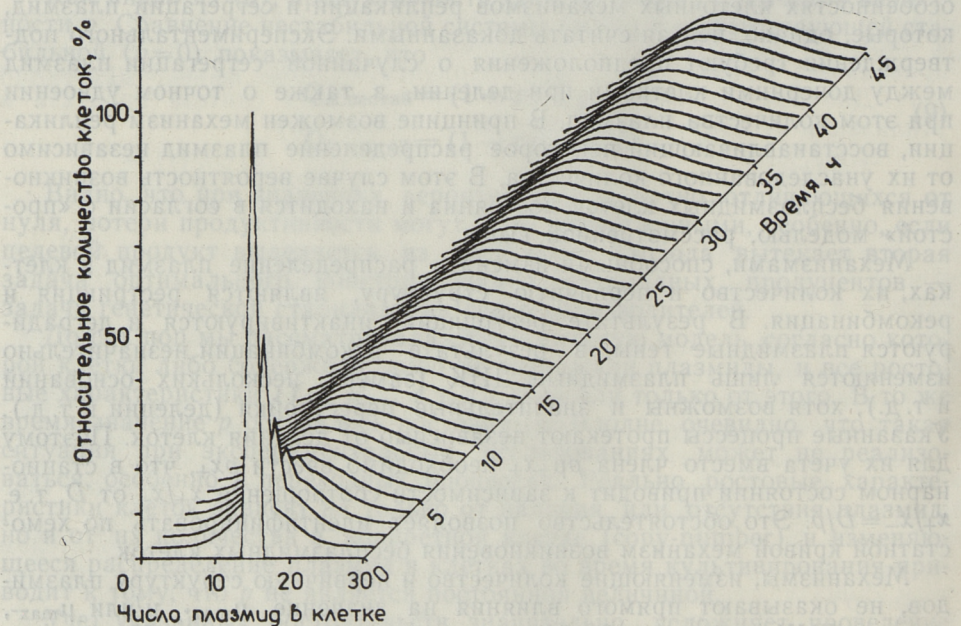


Рис. 2. Изменение распределения плазмид в клетках согласно уравнению (10) в случае моделирующего роста клеток в селективных условиях. Начальное распределение $i=0, 1, \dots, n, \mu_i=1-2|(n/2-i)|/n$.

водителей. При этом интенсивность транскрипции определяется в первую очередь «силой» использованного промотора, имеющего градицию интенсивности, интенсивность трансляции — качеством сайта связывания рибосом на м-РНК, а также вторичной структурой м-РНК. Указанные три фактора — доза генов-производителей, сила соответствующих промоторов и структурные особенности м-РНК определяют в значительной степени нагрузку на метаболизм клеток-хозяинов при синтезе целевых продуктов. Как было указано выше, должна существовать оптимальная нагрузка синтеза чужеродных белков, при которой достигается максимальная продуктивность процесса. При этом соответствующие критерии оптимальности должны вытекать из особенностей регуляции внутриклеточного метаболизма и скорости роста.

Большой теоретический и практический интерес представляют также проблемы посттрансляционной модификации и деградации уже готового продукта. Установлено, что в условиях, когда чужеродный белок занимает до 10—20% общего белка клетки, образование их пространственной структуры протекает таким образом, что белок является уже нефункциональным (Yamazaki и др., 1983). Для активации молекул белка необходимо сначала денатурировать (раскручивать), а затем ренатурировать их в условиях, в которых образуется уже нативная конформация белка.

Поскольку в прокариотической клетке отсутствуют соответствующие ферментативные системы модифицирования (гликозилирования и т. д.) и обработки молекул белка, то в некоторых случаях это может стать препятствием при использовании прокариотических клеток для производства указанных белков.

Отдельно следует остановиться на т. н. heat-shock и SOS-реакциях клетки, которые индуцируются целым рядом неблагоприятных условий (УФ-облучение, повышенная температура и т. д.), а также, как показывают экспериментальные данные (Goff, Goldberg, 1985), синтезом чужеродных белков в клетке. В результате индуцирования указанных генов синтезируются протеолитические ферменты, деградирующие в первую очередь чужеродные белки. Поскольку рассматриваемые механизмы реализуются на посттрансляционном уровне, то с их помощью клетке не удастся избежать энергетических расходов на синтез чужеродного белка, однако аминокислоты, израсходованные на «навязанный» синтез чужеродных белков могут быть использованы вновь. Учет указанных посттрансляционных механизмов возможен с помощью соответствующих членов в уравнении, описывающих синтез продукта в системе (5).

Проведенный нами в настоящей статье анализ особенностей культивирования плазмидсодержащих продуцентов нельзя считать исчерпывающим. Нами рассмотрены лишь основные механизмы, определяющие стабильность плазмид и продуктивность соответствующих продуцентов.

ЛИТЕРАТУРА

- Goff, S. A., Goldberg, A. L. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. // *Cell*, 1985, **41**, 587—595.
Imanaka, T., Aiba, S. A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1981, **369**, 1—14.
Ollis, D. F. Industrial fermentations with (unstable) recombinant cultures. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1982, **B 297**, 617—629.
Yamazaki, H., Ohmura, K., Nakayama, A., Takeichi, Y., Otozoi, K., Yamasaki, M., Tamura, G., Yamane, K. α -Amylase genes from an α -amylase hyperproducing *Bacillus subtilis* strain: molecular cloning and nucleotide sequence. // *J. Bacteriol.*, 1983, **156**, 327—337.

Институт химической и биологической физики
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
3/VII 1987

Тартуский государственный университет

PLASMIIDIGA RAKKUDE EBASTABIILSUS PIDEVAL KULTIVEERIMISEL

T. Imanaka ja S. Aiba poolt 1981. aastal kasutusele võetud lihtsat plasmiidiga rakkude kasvu kirjeldavat mudelit on käesolevas töös analüüsitud rakkude pideva kultiveerimise juhul. Kasvu kirjeldavates diferentsiaalvõrrandites on plasmidi elimineerumist rakust arvestatud liikmega $-p\mu_+x_+$. On tuletatud valem, mis kirjeldab plasmiidide eliminatsiooni rakkude pideval kultiveerimisel mitteselektiivsetes tingimustes, ning näidatud, et plasmidi sisaldavate ja ilma plasmiidita rakkude suhe statsionaarses kultiveerimiselekus selektiivsetes tingimustes on määratud ainult plasmiidse DNA elimineerumise tõenäosusega ($x_+/x_- = (1-p)/p$) ega sõltu läbivoolukiirusest D . On võrreldud fermenteri produktiivsust ruumalaühiku kohta ($Q_X = xD$ ja $Q_P = PD$, kus x ja P on vastavalt biomassi ja produkti kontsentratsioonid) geneetiliselt stabiilsete rakkude juhul ($p=0$) ja geneetiliselt ebastabiilsete rakkude juhul ($p>0$) ning näidatud, et kehtivad seosed $Q_{X \text{ ebastab.}} = (1-p)^2 Q_{X \text{ stab.}}$ ja $Q_P = (1-p) Q_{P \text{ stab.}}$. On esitatud mudel, mis arvestab plasmiidide jaotust eeldustel, et 1) plasmiidid replitseeruvad üks kord rakutsüklis ja 2) plasmiidid jaotuvad võrdsete tütarrakkude vahel juhuslikult. Arvuti abil on imiteeritud plasmidi sisaldavate rakkude kasvu selektiivsetes ja mitteselektiivsetes tingimustes. On vaadeldud erinevaid mehhanisme, mis võivad põhjustada plasmiidse DNA ebastabiilsust ja nende mehhanismide fenomenoloogilist kirjeldamist.

Katrin TOMSON, Peeter LIIK, Raivo VILU

INSTABILITY OF PLASMID-CARRYING CELLS IN CONTINUOUS CULTURE: A THEORETICAL STUDY

A simple model of growth of plasmid-containing cells, first introduced by T. Imanaka and S. Aiba in 1981 has been analysed in the case of continuous cultivation of the cells. In this model elimination of the plasmid DNA from the cell is taken into account by a formula $-p\mu_+x_+$ introduced into the differential equations of growth. An equation describing the kinetics of elimination of plasmid DNA from the continuous culture of the cells in nonselective growth conditions has been developed. It is shown that the ratio of plasmid-bearing and plasmid-free cells in steady-state conditions of cultivation under the selective pressure is determined solely by the probability of elimination of the plasmid DNA ($x_+/x_- = (1-p)/p$) and is not dependent on the flow rate D . Volumetric productivity of the fermentor ($Q_X = xD$ and $Q_P = PD$, where x and P are biomass and product concentrations) is compared in the case of cells, containing either genetically stable ($p=0$) or unstable ($p>0$) genes, producing the desired products. It is shown that $Q_{X \text{ unstab.}} = (1-p)^2 Q_{X \text{ stab.}}$ and $Q_P \text{ unstab.} = (1-p) Q_{P \text{ stab.}}$. A model has been developed where the distribution of the plasmids is taken into account. We also assume that the plasmids are replicating once per cell cycle and the plasmids are segregating randomly between equal daughter cells. Computer simulation of the growth of plasmid-bearing cells under selective and nonselective conditions was carried out. Different mechanisms which may lead to the instability of the plasmid DNA and phenomenological description of these mechanisms are discussed.