Математическая биология и биоинформатика
2015. Т. 10. № 1. С. 193–205. doi: 10.17537/2015.10.193

========== **МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ** ==========

УДК: 001.575:577.218:579.84:57.017.723

О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста

Ри Н.А.[*1], Лихошвай В.А.[1,2], Хлебодарова Т.М.[1]**

[1]*Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия*
[2]*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия*

Аннотация. Основным ферментом, метаболизирующим нитрит в клетках *E. coli* при низких концентрациях субстрата в среде, является периплазматическая Nrf нитритредуктаза. Ранее нами была разработана модель утилизации нитрита клетками *E. coli* при культивировании их в условиях стационарного роста в проточном хемостате, которая учитывала динамику экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру ферментов, метаболизирующих и транспортирующих нитрит. Анализ модели показал, что для описания кинетики накопления нитрита в хемостате в области микромолярных концентраций нитрита требуется введение в модель дополнительного предположения о наличии в клетке более высокого уровня утилизации нитрита, чем это следует из генетических исследований. В настоящей работе мы показали, что существующее противоречие между результатами генетических и физиологических исследований в области низких концентраций нитрита может быть объяснено свойствами Nrf фермента, каталитическая активность и стабильность которого зависят от его локализации в периплазме, а возможность секреции белка в периплазму определяется наличием на мембране электрического потенциала. Анализ модели показал, что при низких концентрациях нитрита локальное изменение концентрации фермента при переходе из цитоплазмы в периплапазматическое пространство клетки под действием мембранного потенциала достаточно для формирования более высокой активности NrfA редуктазы в периплазме, чем это можно было ожидать, исходя из данных по уровню экспрессии *nrf* оперона.

Ключевые слова: *моделирование, регуляция экспрессии генов, Escherichia coli, анаэробное дыхание, нитритредуктазы.*

ВВЕДЕНИЕ

В условиях анаэробного дыхания на нитрите (NO_2) основными ферментами, утилизирующими субстрат в клетках *E. coli*, являются периплазматическая Nrf и цитоплазматическая NirB нитритредуктазы. Оба фермента метаболизируют NO_2 до аммония, однако Nrf редуктаза наиболее активна при низких концентрациях субстрата, а NirB – при высоких [1]. Механизмы, благодаря которым достигается такое сочетание активностей NrfA и NirB нитритредуктаз в клетке, обеспечиваются дифференциальной

[*]seahourse@mail.ru
[**]likho@bionet.nsc.ru

экспрессией *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру этих ферментов, и определяются транскрипционными факторами NarL и NarP, активное состояние которых зависит от NarQ и NarX киназ [2]. В отличие от *nir* оперона, экспрессия которого подвержена только позитивной регуляции со стороны нитрита [3], структура регуляторной области *nrf* оперона такова, что при низкой концентрации индуктора его экспрессия активируется, а при высокой – ингибируется [1, 4]. В результате, при высоких концентрациях нитрита в среде (> 2мМ) происходит переключение с одной генетической системы, которая кодирует структуру NrfA редуктазы и метаболизирует нитрит в периплазматическом пространстве клетки, на другую, которая кодирует структуру NirC транспортера и NirB нитритредуктазы и обеспечивает транспорт нитрита в клетку и его переработку цитоплазматической редуктазой.

Ранее нами на основании существующих данных о генетических механизмах регуляции *nrf* и *nir* оперонов была разработана модель, описывающая утилизацию нитрита клетками *E. coli* при культивировании их в условиях стационарного роста в проточном хемостате [5]. Было обнаружено, что модель, адаптированная к экспериментальным данным, описывает кинетику накопления нитрита в хемостате в области миллимолярных концентраций (> 2мМ) добавленного в хемостат субстрата без дополнительных предположений. В то же время для описания кинетики накопления нитрита в хемостате в области микромолярных концентраций добавленного нитрита (< 1мМ) требуется введение в модель дополнительного предположения о наличии более высокого уровня активности NrfA нитритредуктазы, чем это следует из генетических исследований. Оценка этой дополнительной активности (V_{add}) была проведена ранее [6], и ее уровень, необходимый для корректного описания экспериментальных данных, представленных на рис. 1 б, показан на рис. 1 а синей кривой.

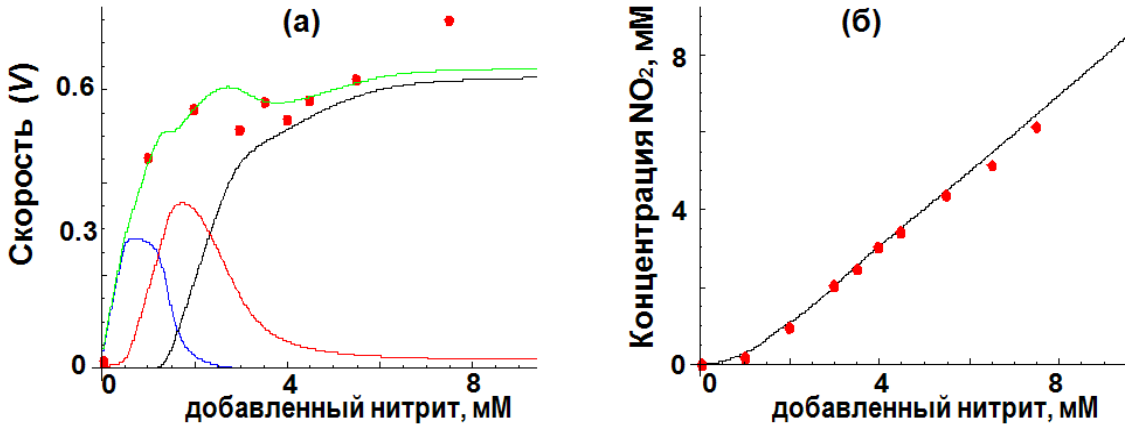

Рис. 1. (а) Зависимость скорости (V) утилизации нитрита от концентрации добавленного в хемостат нитрита. Синяя кривая отражает V_{add}, красная – V_{nrf}, черная – V_{nirB}, зеленая – совместное действие V_{nrf}, V_{nirB} и V_{add}. Точки – пересчитанные экспериментальные данные о скорости утилизации нитрита в хемостате из работы [7]. (б) Зависимость стационарного уровня нитрита в хемостате от концентрации добавляемого нитрита. Точки – экспериментальные данные [7]. Кривая – расчет модели с учетом V_{add}.

Мы предположили, что эта активность может быть реализована либо за счет высокой активности Nrf фермента в области низких концентраций нитрита, либо за счет повышенной стабильности Nrf белка, либо за счет наличия дополнительного фермента, активного только в этой области концентраций, т.е. за счет тех факторов, которые не были учтены в модели [5].

Гипотеза о дополнительном ферменте, активном только в области 0–1 мМ нитрита, была отвергнута нами [6] на основании анализа молекулярно-генетических механизмов

регуляции экспрессии генов, контролирующих структуру ферментов NapF, NarG, NarZ, NarK и NarU, которые в отсутствие нитрата могут утилизировать и транспортировать нитрит. Все эти ферменты в данной области имеют незначительную активность, которая возрастает с увеличением концентрации нитрита [1, 7–11].

Что касается двух других предположений, то они связаны со свойствами Nrf фермента как периплазматического белка, участвующего в формировании протонного градиента. Исходя из различных косвенных данных, можно предполагать, что каталитические свойства фермента и секреция в периплазму зависят от наличия электрического потенциала на мембране клетки, а локализация в периплазме отражается на стабильности белка [12–15]. То есть, простая оценка активности Nrf фермента по концентрации белка в цитоплазме клетки, основанная на активности химерного белка NrfA-β-gal [1], которая была использована нами [5], может не соответствовать действительности и быть причиной наблюдаемых в работе [5] противоречий.

В настоящей работе мы продолжили анализ механизмов утилизации нитрита в условиях проточного хемостата и на основе модели, опубликованной в [5], разработали новый вариант модели, в которой учли процессы секреции субъединиц Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму, формирования в этом пространстве активной гетеротетрамерной формы фермента ($NrfA_2B_2$), а также влияние мембранного потенциала на эти процессы и каталитические свойства фермента.

Анализ модели показал, что при низких концентрациях нитрита локальное изменение концентрации фермента при переходе из цитоплазмы в периплапазматическое пространство клетки под действием мембранного потенциала, максимальное значение которого наблюдается в области 0.2–1 мМ нитрита [16], достаточно для формирования более высокой активности NrfA редуктазы в периплазме, чем это можно было ожидать исходя из данных по уровню экспрессии *nrf* оперона [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Математическая модель утилизации нитрита клетками *E. coli*

Настоящая модель разработана на основе модели [5], в которой воспроизведены условия культивирования клеток *E. coli* в проточном хемостате на нитрите. Постоянная скорость роста и плотность культуры в хемостате обеспечивались фиксированным уровнем потребления глюкозы [7]. Модель была разработана на основе существующих качественных и количественных данных о механизмах регуляции экспрессии генов *nrfA, nirB* и *nirC* [1], кодирующих структуру NirB и NrfA нитритредуктаз и белка NirC, транспортирующего нитрит в клетку и выводящего его избыток из клетки.

Исходя из выше высказанных предположений, в модель [5] были включены процессы секреции субъединиц Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму и формирования в этом пространстве активной гетеротетрамерной формы фермента ($NrfA_2B_2$). Учтено влияние мембранного потенциала на стабильность белка, каталитические свойства фермента и транспорт субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму [12–15, 17]. При описании этих процессов использовались обобщенные функции Хилла [18].

Схема процессов, описанных в модели и влияющих на концентрацию нитрита в хемостате и внутри клетки, представлены на рис. 2.

Математическая модель, описывающая процессы (*a*–*k*) представлена автономной системой уравнений (1).

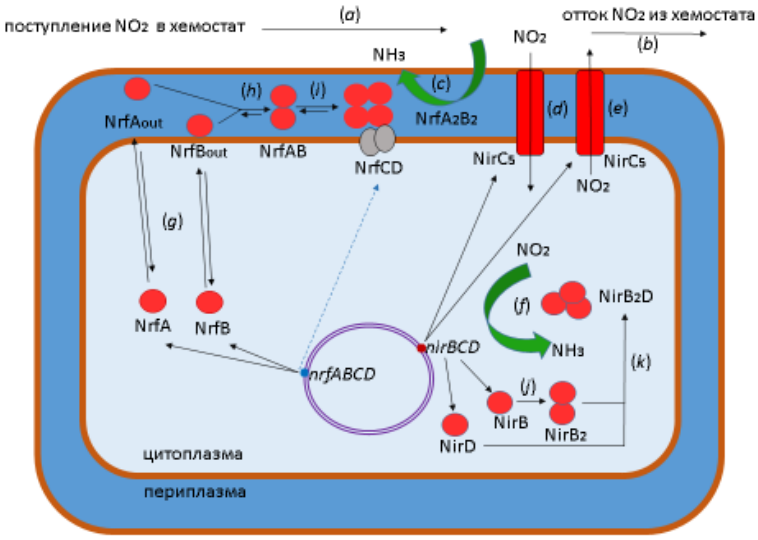

Рис. 2. Схема процессов, протекающих в хемостате при утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*: (*a*), (*b*) – поступление нитрита в хемостат и его вывод из хемостата с постоянной скоростью; (*c*) – переработка внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической NrfAB редуктазой; (*d*), (*e*) – транспорт внеклеточного нитрита в клетку и его экспорт из клетки в хемостат NirC транспортером; (*f*) – утилизация внутриклеточного нитрита цитоплазматической NirB редуктазой, (*g*) – транспорт субъединиц A и B Nrf редуктазы из цитоплазмы в периплазму и обратно, (*h*) – формирование и диссоциация гетеродимера NrfAB, (*i*) – формирование активной гетеродимерной формы Nrf редуктазы и ее распад в периплазме, (*j*) – формирование гомодимера $NirB_2$, (*k*) – формирование активной гетеротримерной формы NirB редуктазы. Диссоциация комплексов $NirB_2$ и $NirB_2D$ на рис. 2 не отражены, поскольку в модели эти процессы описаны как равновесные.

$$
\begin{cases}
\dfrac{du}{dt} = k_{flow}\cdot(s-u) - C\cdot(V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u,w)),\\
\dfrac{dw}{dt} = V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u,w) - V_{NirB}(u,w) - k_{flow}\cdot w,\\
\dfrac{dNrfA}{dt} = ks_{Nrf}\cdot m_{Nrf}(u) - Kd_{Nrf}\cdot NrfA - kt_{Nrf}\cdot k_U(U(s))\cdot NrfA + kt_{in,Nrf}\cdot NrfA_{out},\\
\dfrac{dNrfB}{dt} = ks_{Nrf}\cdot m_{Nrf}(u) - Kd_{Nrf}\cdot NrfB - kt_{Nrf}\cdot k_U(U(s))\cdot NrfB + kt_{in,Nrf}\cdot NrfB_{out},\\
\dfrac{dNrfA_{out}}{dt} = k_{peripl}\cdot(kt_{Nrf}\cdot k_U(U(s))\cdot NrfA - kt_{in,Nrf}\cdot NrfA_{out}) - Kd_{Nrfout}\cdot NrfA_{out} +\\
\qquad + kfAB\cdot(-NrfA_{out}\cdot NrfB_{out} + kd_{AB}\cdot NrfAB),\\
\dfrac{dNrfB_{out}}{dt} = k_{peripl}\cdot(kt_{Nrf}\cdot k_U(U(s))\cdot NrfB - kt_{in,Nrf}\cdot NrfB_{out}) - Kd_{Nrfout}\cdot NrfB_{out} +\\
\qquad + kf_{AB}\cdot(-NrfA_{out}\cdot NrfB_{out} + kd_{AB}\cdot NrfAB),\\
\dfrac{dNrfAB}{dt} = -kf_{AB}\cdot(-NrfA_{out}\cdot NrfB_{out} + kd_{AB}\cdot NrfAB) + 2\cdot kf_{A_2B_2}\cdot(-NrfAB + kd_{A_2B_2}\cdot Nrf) -\\
\qquad - Kd_{NrfAB}\cdot NrfAB,\\
\dfrac{dNrf}{dt} = -kf_{A_2B_2}\cdot(-NrfAB + kd_{A_2B_2}\cdot Nrf) - Kd_{NrfA_2B_2}\cdot Nrf.
\end{cases}
\tag{1}
$$

Здесь

u – концентрация нитрита во внеклеточном объеме хемостата,
w – концентрация нитрита внутри клетки,
$k_{flow}s$ – скорость поступления нитрита в хемостат,
$k_{flow}u$ – скорость оттока внеклеточного нитрита из хемостата,
$k_{flow}w$ – скорость вымывания внутриклеточного нитрита за счет оттока клеток из хемостата,
k_{flow} – константа скорости притока/оттока веществ в/из хемостата,
C – относительная доля объема клеток в хемостате,
s – концентрация нитрита, которая устанавливается в пустом хемостате (далее, добавленный нитрит),
$V_{Nrf}(u)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита нитритредуктазой NrfA,
$NrfA$ и $NrfB$ – концентрации субъединиц NrfA и NrfB в цитоплазме,
$NrfA_{out}$ и $NrfB_{out}$ – концентрации A и B мономеров в периплазме,
$NrfAB$ – концентрация димеров NrfAB в периплазме,
Nrf – концентрация активного фермента в форме гетеротетрамера в периплазме,
$V_{nirB}(w)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита редуктазой NirB,
$V_{NirC,in}$ – скорость импорта индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита в клетку транспортером NirC,
$V_{NirC,out}$ – скорость экспорта индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита из клетки белком NirC,
ks_{Nrf} – константа скорости синтеза мономеров NrfA и NrfB редуктазы,
Kd_{Nrf}, Kd_{Nrfout} – константы скорости деградации мономеров в цитоплазме и периплазме,
kt_{Nrf}, $kt_{in,Nrf}$ – константы скорости транспорта мономеров из цитоплазмы в периплазму и обратно,
k_{peripl} – коэффициент соотношения объемов, занимаемых периплазмой и цитоплазмой,
kf_{AB} и $kf_{A_2B_2}$ – константы скорости формирования димеров NrfAB и тетрамеров $NrfA_2B_2$,
Kd_{NrfAB}, $Kd_{NrfA_2B_2}$ – константы скорости деградации комплексов NrfAB и $NrfA_2B_2$,
$k_U(U(s))$ – динамический параметр скорости транспорта мономеров NrfA и NrfB, зависящий от величины мембранного потенциала клеток $U(s)$.

В модели принято, что концентрации субъединиц A (C_{NrfA}) и B (C_{NrfB}) NrfA фермента и субъединиц B (C_{NirB}) и D (C_{NirD}) NirB фермента в цитоплазме клетки пропорциональны относительной активности химерных белков NrfA-β-gal и NirB-β-gal, соответственно [1]. Их зависимости от концентрации нитрита в хемостате аппроксимированы обобщенными функциями, описанными в [5]:

$$m_{Nrf}(u) = \frac{\delta_{nrf,0} + \delta_{nrf,1} \times \left(\frac{u}{K_{nrf,1}}\right)^{h_{nrf,1}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nrf,1}}\right)^{h_{nrf,1}}} \times \frac{1 + \delta_{nrf,2} \times \left(\frac{u}{K_{nrf,2}}\right)^{h_{nrf,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nrf,2}}\right)^{h_{nrf,2}}}, \quad (2)$$

$$m_{Nir}(u)=\frac{\delta_{nir,0}+\delta_{nir,1}\times\left(\frac{u}{K_{nir,1}}\right)^{h_{nir,1}}+\delta_{nir,2}\times\left(\frac{u}{K_{nir,2}}\right)^{h_{nir,2}}}{1+\left(\frac{u}{K_{nir,1}}\right)^{h_{nir,1}}+\left(\frac{u}{K_{nir,2}}\right)^{h_{nir,2}}}, \quad (3)$$

$$C_{NrfA}(u) = C_{NrfA,\max}\, m_{Nrf}(u), \quad (4)$$

$$C_{NrfB}(u) = C_{NrfB,\max}\, m_{Nrf}(u), \quad (5)$$

$$C_{NirB}(u) = C_{NirB,\max}\, m_{Nir}(u), \quad (6)$$

$$C_{NirD}(u) = C_{NirD,\max}\, m_{Nir}(u). \quad (7)$$

Скорости переработки вне- и внутриклеточного нитрита NrfA и NirB редуктазами описаны уравнением Михаэлиса-Ментен согласно экспериментальным данным [14, 19, 20]. Вывод формул приведен в работе [5], полученные выражения представлены ниже.

$$V_{Nrf}(u)=kcat_{Nrf}\cdot\frac{u\cdot Nrf(u)}{Km_{Nrf}+u} \quad (8)$$

$$V_{NirB}(u,w)=kcat_{NirB_2D}\cdot\frac{w\cdot NirB_2D(u)}{Km_{NirB_2D}+w} \quad (9)$$

Принято, что удельная скорость транспорта мономеров A и B Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы, где происходит их синтез, в периплазматическое пространство, где формируется активная форма фермента, представляет переменную величину, зависящую от величины электрического потенциала: $kt_{Nrf}\cdot k_U\left(U(s)\right)$.

Для описания k_U использована обобщенная функция Хилла

$$k_U(U)=d_{U,0}+d_{U,1}\frac{\left(\frac{U}{K_U}\right)^{h_U}}{1+\left(\frac{U}{K_U}\right)^{h_U}}. \quad (10)$$

Мембранный потенциал клеток (U), описан в зависимости от концентрации добавленного в хемостат нитрита (s):

$$U(s)=\frac{d_{pmf,1}\times\left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}}+d_{pmf,2}\times\left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}{1+\left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}}+\left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}. \quad (11)$$

Концентрация транспортера NirC в клетке, скорость импорта нитрита из хемостата в клетку и его экспорта из клетки описаны согласно [5]:

$$C_{NirC}(u)=C_{NirC,\max}\frac{\left(m_{Nir}(u)\right)^5}{\left(Kd_{NirC}\right)^4+5\left(m_{Nir}(u)\right)^4}, \quad (12)$$

$$V_{NirC,in}(u)=kin_{NirC}\cdot\frac{u\cdot C_{NirC}(u)}{Km_{NirC,in}+u}, \quad (13)$$

$$V_{NirC,out}(u,w) = kout_{NirC} \cdot \frac{w \cdot C_{NirC}(u)}{Km_{NirC,out} + w}. \quad (14)$$

2. Оценка параметров модели

Оценку параметров модели проводили на основании известных экспериментальных данных по динамике роста культуры клеток *E. coli* в условиях проточного хемостата, кинетике утилизации нитрита редуктазами NrfA и NirB, параметров транспорта нитрита белками NirC [7, 10, 19, 21–27], а также в ходе вычислительных экспериментов. Оценка доли объема, занимаемого культурой *E. coli* в хемостате, приведена в работе [5]. Значения параметров, использованные в расчетах, приведены в таблице 1.

Значение коэффициента k_{peripl} оценено из экспериментальных данных, согласно которым доля периплазматического пространства составляет 8–40% от объема всей клетки *E. coli* [28–30]. Исходя из этого определено, что значение параметра k_{peripl} может изменяться в интервале 1.5–11.5. В модели это значение принято равным 6 (табл. 1).

Таблица 1. Список параметров модели

Параметр	Название параметра	Значение парамет-ра из [5][d]	Значение парамет-ра в модели (1)	Фор-мула	Источ-ник оценки значе-ния
k_{flow}	константа скорости протока в хемостате	$1.65 \cdot 10^{-4}$ сек$^{-1}$	$1.65 \cdot 10^{-4}$ сек$^{-1}$	(1)	[1]
$\delta_{nrf,0}$	параметры обобщенной функции m_{nrf}, описывающей зависимость активности *nrf* оперона от концентрации нитрита установившейся в хемостате	50	4.5	(2)	[1]
$\delta_{nrf,1}$		60	60		
$K_{nrf,1}$		0.36 мМ	0.36 мМ		
$h_{nrf,1}$		1.3	1.3		
$\delta_{nrf,2}$		0.16	0.16		
$K_{nrf,2}$		1.7 мМ	1.7 мМ		
$h_{nrf,2}$		3.0	3.0		
ks_{Nrf}	удельная скорость синтеза белков-мономеров NrfA и NrfB в цитоплазме на одну копию мРНК		$3.0 \cdot 10^{-8}$ мМ/сек	(1)	[*][b]
Kd_{Nrf}	константа скорости деградации мономеров NrfA и B в цитоплазме		$9.6\ 10^{-5}$ сек$^{-1}$	(1)	[13]
kt_{Nrf}	константа скорости транспорта NrfA и NrfB в периплазму		2.3 сек$^{-1}$	(1)	[*][b]
$kt_{in,Nrf}$	константа скорости импорта NrfA и NrfB в цитоплазму		22 сек$^{-1}$	(1)	[*][b]
kf_{AB}	константа скорости ассоциации мономеров NrfA и B		10 сек$^{-1}$	(1)	
kd_{AB}	константа диссоциации димеров NrfAB		0.00004 мМ	(1)	[21]
$kf_{A_2B_2}$	константа скорости ассоциации димеров NrfAB		10 сек$^{-1}$	(1)	
$kd_{A_2B_2}$	константа диссоциации тетрамеров $NrfA_2B_2$		0.004 мМ	(1)	
k_{peripl}	константа отношения объема цитоплазмы к периплазме		6	(1)	[28]
$d_{U,0}$	константы, входящие в формулу динамического параметра k_U, регулирующего скорость транспорта NrfA и NrfB из цитоплазмы в периплазму в зависимости от величины мембранного потенциала		1	(10)	[*][b]
$d_{U,1}$			4.5		
K_U			1 мМ		
h_U			2		

$d_{pmf,1}$	параметры, входящие в обобщенную функцию *U*, описывающую зависимость относительной величины мембранного потенциала от добавленной в хемостат концентрации NO_2		0.85	(11)	[32]
$K_{pmf,1}$			0.065 мМ		
$h_{pmf,1}$			2		
$d_{pmf,2}$			0.05		
$K_{pmf,2}$			0.55 мМ		
$h_{pmf,2}$			6		
Kd_{Nrfout}	константа скорости деградации мономеров NrfA и B в периплазме		$9.6\ 10^{-6}$ сек$^{-1}$	(1)	[13]
Kd_{NrfAB}	константа скорости деградации NrfAB				
$Kd_{NrfA_2B_2}$	константа скорости деградации $NrfA_2B_2$				
$kcat_{Nrf}$	константа скорости оборота нитритредуктазы NrfA	770 сек$^{-1}$	770 сек$^{-1}$	(8)	[33]
Km_{Nrf}	константа Михаэлиса редуктазы NrfA для нитрита	0.03 мМ	0.03 мМ		[34]
$C_{NirB,\max}$	максимальная концентрация белка NirB в клетке	0.007 мМ	0.015 мМ	(6)	[*][b]
$C_{NirD,\max}$	максимальная концентрация белка NirD в клетке	0.007 мМ	0.015 мМ	(7)	
$\delta_{nir,0}$	параметры обобщенной функции m_{nir}, описывающей активность *nir*-оперона в зависимости от концентрации нитрита установившейся в хемостате	2.3	2.3	(3)	[1]
$\delta_{nir,1}$		13	13		
$K_{nir,1}$		1.0 мМ	1.0 мМ		
$h_{nir,1}$		2.0	2.0		
$\delta_{nir,2}$		13,2	13,2		
$K_{nir,2}$		1.7 мМ	1.7 мМ		
$h_{nir,2}$		8.3	8.3		
Kd_{NirB_2}	равновесная константа диссоциации реакции формирования $NirB_2D$	0.025 мМ	0.025 мМ	(9)[c]	[*][b]
Kd_{NirB_2D}	равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера $NirB_2D$	0.025 мМ	0.025 мМ	(9)[c]	
$kcat_{NirB_2D}$	константа скорости каталитического оборота фермента NirB	1100.0 сек$^{-1}$	1100.0 сек$^{-1}$	(9)	[*][b]
Km_{NirB_2D}	константа Михаэлиса фермента NirB	0.006 мМ	0.006 мМ		[19]
$C_{NirC,\max}$	максимальная концентрация белка NirC в клетке	0.001, 0.005 мМ	0.015 мМ	(12)	[*][b]
kin_{NirC}	каталитическая константа скорости импорта нитрита в клетку белком NirC	500 сек$^{-1}$	150 сек$^{-1}$	(13)	
$Km_{NirC,in}$	константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в клетку белком NirC	0.008 мМ	1 мМ	(13)	[35]
$kout_{NirC}$	каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	100, 500 сек$^{-1}$	1000 сек$^{-1}$	(14)	[*][b]
$Km_{NirC,out}$	константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	0.008, 0.03 мМ	1 мМ	(14)	[35]
C	относительная доля объема клеток в хемостате	0.0003	0.0003	(1)	[7, 27]

[a] – мМ (миллимоль/литр), сек (секунда), если размерность не указана, то величина является безразмерной;
[b] – значение параметра подобрано в результате численных экспериментов;
[c] – константа входит в состав функции $NirB_2D(u)$, вывод формулы которой приведен в работе [5];
[d] – если значение отсутствует, то соответствующего параметра нет в модели, опубликованной в [5].

При оценке значений констант деградации субъединиц Nrf фермента в цитоплазме (NrfA, NrfB) и периплазме ($NrfA_{out}$, $NrfB_{out}$) исходили из данных о среднем времени

полужизни общего пула цитоплазматических белков (~2 час.) и стабильности периплазматической фракции белковых комплексов, которая на порядок выше [13].

Значения констант скорости формирования комплексов NrfAB (kf_{AB}) и $NrfA_2B_2$ ($kf_{A_2B_2}$) в периплазме оценены на основании косвенных данных по кинетике белок-белковых взаимодействий [30] и приняты в модели равными 10 сек$^{-1}$. Константы скорости диссоциации для димерной и тетрамерной форм Nrf редуктазы определены из экспериментальных данных [21].

Функции m_{nrf} и m_{nir}, описывающие экспрессию оперонов *nrfABCD* и *nirBDC* в зависимости от концентрации подаваемого в хемостат нитрита, были адаптированы к имеющимся экспериментальным данным [1]. Результаты их адаптации показаны ранее в работе [5].

3. Влияние мембранного потенциала на активность периплазматической Nrf нитритредуктазы

Как указано выше, ряд косвенных данных позволили нам предположить, что Nrf фермент транспортируется из цитоплазмы в периплазму в виде мономеров, субъединиц NrfA и NrfB [16], синтез которых происходит в цитоплазме. Секреция субъединиц фермента в периплазму инициируется появлением на мембране электрического потенциала [12] в результате активности респираторных ферментов, которые участвуют в формировании протонного градиента. Nrf нитритредуктаза относится именно к таким ферментам и нитрит является акцептором электронов (см. обзор [36]). Сборка и правильная ориентация фермента в пространстве периплазмы также зависят от наличия мембранного потенциала [12, 15]. Более того, показано, что константа Михаэлиса Nrf фермента зависит от величины мембранного потенциала [14], а величина мембранного потенциала зависит от концентрации нитрита [17].

Таким образом, целый ряд факторов указывали на то, что мембранный потенциал играет значительную роль в формировании каталитически активной молекулы Nrf фермента и влияет на ее каталитические свойства. Какие из этих факторов могут быть источником дополнительной активности фермента в микромолярной области концентраций нитрита?

Ранее мы проверили возможность влияния на кинетику утилизации нитрита в хемостате изменения каталитических свойств фермента под действием мембранного потенциала [6]. Было показано, что изменение $K_{m,nrf}$ даже на порядок и более, что выходит за рамки экспериментально наблюдаемых различий [14], приводит к незначительным изменениям (~5%) скорости утилизации нитрита ферментом Nrf в интересующей нас области и не может быть источником дополнительной активности фермента при низких концентрациях нитрита. Введение нелинейной активации Nrf низкими концентрациями субстрата позволяет достичь нужной активности фермента, однако данная гипотеза противоречит данным о простой кинетике реакции, описываемой уравнением Михаэлиса-Ментен [14].

Что касается влияния мембранного потенциала на процессы секреции фермента в периплазму и сборку в ее пространстве каталитически активной молекулы фермента, то ранее мы этот процесс не рассматривали. В предыдущем варианте модели [5] синтез субъединиц Nrf фермента и сборка каталитически активного гетеротетрамерного комплекса $NrfA_2$-$NrfB_2$ [21, 23] происходили в цитоплазме, и их концентрация была одинакова во всем объеме клетки. В настоящем исследовании учет процесса секреции субъединиц фермента в периплазму под влиянием мембранного потенциала автоматически приводил к локальному изменению концентрации субъединиц фермента. Коэффициент перехода, как было оценено из экспериментальных данных [28, 29], варьировал в широких пределах от 1.5 до 11.5. Мы выбрали промежуточное значение и определили k_{peripl} = 6 (табл. 1).

В ходе адаптации модели (1) к экспериментальным данным по кинетике утилизации нитрита в хемостате (рис. 3,б), были определены параметры функции *U* (табл. 1, рис. 3,а), описывающей величину мембранного потенциала. Оказалось, что наблюдаемая в модельном эксперименте зависимость *U* от концентрации добавленного в хемостат нитрита (рис. 3,а) очень близка к экспериментально выявленной области максимального действия мембранного потенциала. В работе [17] наибольшее значение потенциала наблюдалось в области 0.1–1мМ нитрита, которое было устойчиво, начиная с 0.2 мМ нитрита, и снижалось за пределами этой области.

Исходя из этого, можно полагать, что максимальная скорость секреции субъединиц Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму наблюдается в области 0.2–1мМ концентраций нитрита, т.е., именно в той области, в которой наблюдается низкий уровень синтеза субъединиц белка Nrf, недостаточный для описания кинетики утилизации NO_2 в хемостате [5]. Поскольку объем периплазмы существенно меньше объема цитоплазмы [28–30], то локальная концентрация фермента в периплазматическом пространстве в этом интервале концентраций субстрата будет существенно выше (в нашей модели коэффициент перехода равен 6), чем это следует из генетических исследований при расчете на весь объем клетки.

Исследование модели (1) показало, что этого условия достаточно для локального увеличения активности Nrf фермента в области микромолярных концентраций нитрита и согласования экспериментальных данных по кинетике утилизации нитрита в хемостате и экспрессии оперонов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит [1, 7].

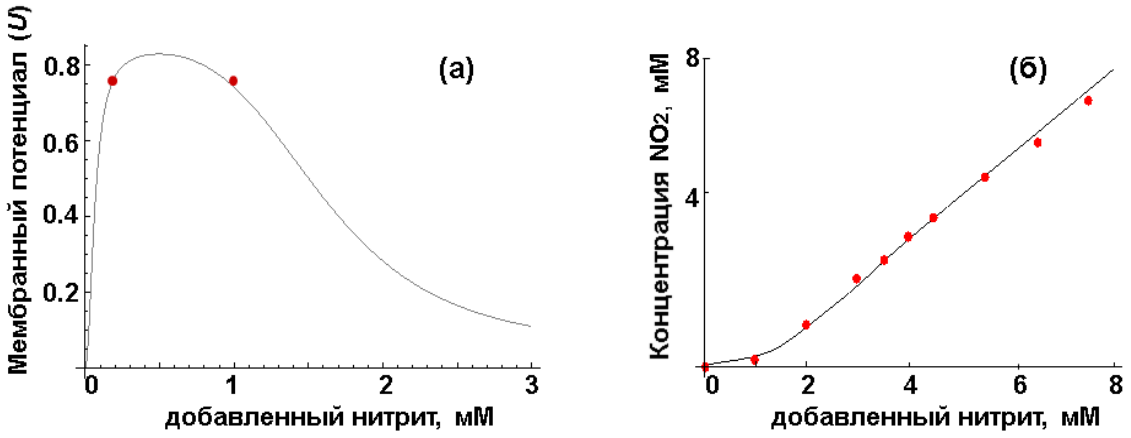

Рис. 3. Зависимость величины мембранного потенциала *U* (а) и стационарной концентрации нитрита в хемостате (б) от уровня, добавленного в хемостат субстрата. Кривая – расчет модели (1), экспериментальные данные показаны точками: (а) – из работы [17], (б) – [7]. Значения параметров модели приведены в табл. 1.

Таким образом, учитывая полученные ранее результаты [6], можно полагать, что механизмом регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы в области микромолярных концентраций добавленного нитрита, позволяющим согласовать физиологические и генетические данные [1, 7], является не наличие каких-либо дополнительных ферментов или регуляторов активности Nrf редуктазы, не изменение ее каталитических свойств, а локальное изменение концентрации фермента в периплазме, возникающее в результате действия мембранного потенциала на секрецию субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму в анализируемой области концентраций субстрата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 14-24-00123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang H., Gunsalus R.P. The nrfA and nirB nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 5813–5822.
2. Lee A., Delgado A., Gunsalus R.P. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 5309–5316.
3. Tyson K., Bell A., Cole J., Busby S. Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli* nirB promoter: interactions between FNR and NarL. *Mol. Microbiol.* 1993. V. 7. P. 151–157.
4. Stewart V., Bledsoe P. Synthetic lac operator substitutions for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 2104–2111.
5. Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., Ри Н.А., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков. *Матем. биол. и биоинформ*. 2013. Т. 8. С. 276–294. doi: 10.17537/2013.8.276
6. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при микромолярных концентрациях субстрата в хемостате. В: *Математическая биология и биоинформатика:* доклады V международной конференции. Под ред. Лахно В.Д. М: МАКС Пресс, 2014. С. 114–115.
7. Wang H., Tseng C.P., Gunsalus R.P. The napF and narG nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 5303–5308.
8. Kolesnikow T., Schröder I., Gunsalus R. Regulation of narK gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum. *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 7104–7111.
9. Bonnefoy V., Demoss J. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1994. V. 66. P. 47–56.
10. Clegg S., Yu F., Griffiths L., Cole J. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 143–155.
11. Rowley G., Hensen D., Felgate H., Arkenberg A., Appia-Ayme C., Prior K., Harrington C., Field S., Butt J., Baggs E., Richardson D. Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *J. Biochem.* 2012. V. 441. P. 755–762.
12. Daniels C., Bole D., Quay S., Oxender D. Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 5396–5400.
13. Talmadge K., Gilbert W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 1830–1833.
14. Van Wonderen J., Burlat B., Richardson D., Cheesman M.R., Butt J.N. The nitric oxide reductase activity of cytochrome C nitrite reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2008.V. 283. P. 9587–9594.
15. Price C.E. Driessen A.J. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1803. P. 748–766.
16. Ravcheev D.A., Thiele I. Systematic genomic analysis reveals the complementary aerobic and anaerobic respiration capacities of the human gut microbiota. *Front Microbiol.* 2014. V. 5. P. 674.

17. Pope N., Cole J. Generation of a membrane potential by one of two independent pathways for nitrite reduction by Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.* 1982. V. 128. P. 219–222.
18. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized Hill function method for modeling molecular processes. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. P. 521–531.
19. Coleman K.J., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Activation of nitrite reductase from *Escherichia coli* K 12 by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 1978. V. 175. P. 495–499.
20. Jackson R.H., Cole J.A., Cornish-Bowden A. The steady-state kinetics of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K 12. Nitrite and hydroxylamine reduction. *Biochem. J.* 1981. V. 199. P. 171–178.
21. Clarke T.A., Cole J.A., Richardson D.J., Hemmings A.M. The crystal structure of the pentahaem c-type cytochrome NrfB and characterization of its solution-state interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA. *Biochem. J.* 2007. V. 406. P. 19–30.
22. Jia W., Tovell N., Clegg S., Trimmer M., Cole J. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem. J.* 2009. V. 417. P. 297–304.
23. Lockwood C., Butt J.N., Clarke T.A., Richardson D.J. Molecular interactions between multihaem cytochromes: probing the protein-protein interactions between pentahaem cytochromes of a nitrite reductase complex. *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 263-268.
24. Lockwood C.W., Burlat B., Cheesman M.R., Kern M., Simon J., Clarke T.A., Richardson D.J., Butt J.N. Resolution of key roles for the distal pocket histidine in cytochrome C nitrite reductases. *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. P. 3059–3068.
25. Coleman K.J., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K 12. *Biochem. J.* 1978. V. 175. P. 483–493.
26. Poock S.R., Leach E.R., Moir J.W., Cole J.A., Richardson D.J. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 23664–23669.
27. Wright D.N., Lockhart W.R. Environmental control of cell composition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1965. V. 89. P. 1026–1031.
28. Graham L.L., Harris R., Villiger W., Beveridge T.J. Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 1623–1633.
29. Stock J.B., Rauch B., Roseman S. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 1977. V. 252. P. 7850–7861.
30. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. V. 2. № 5. P. a000414.
31. Northrup S.H., Erickson H.P. Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 3338–3342.
32. Motteram P.A.S., McCarthy J.E.G., Ferguson S.J., Jackson J.B. Cole J.A. Energy conservation during the formate-dependent reduction of nitrite by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1981. V. 12. P. 317–320.
33. Kemp G.L., Clarke T.A., Marritt S.J., Lockwood C., Poock S.R., Hemmings A.M., Richardson D.J., Cheesman M.R., Butt J.N. Kinetic and thermodynamic resolution of the interactions between sulfite and the pentahaem cytochrome NrfA from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 2010. V. 431. P. 73–80.
34. Clarke T.A., Kemp G.L., Van Wonderen J.H., Doyle R.M., Cole J.A., Tovell N., Cheesman M.R., Butt J.N., Richardson D.J., Hemmings A.M. Role of a conserved glutamine residue in tuning the catalytic activity of *Escherichia coli* cytochrome c nitrite reductase. *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 3789–3799.

35. Rycovska A., Hatahet L., Fendler K., Michel H. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. P. 1342–1350.
36. Clarke T.A., Mills P.C., Poock S.R., Butt J.N., Cheesman M.R., Cole J.A., Hinton J.C., Hemmings A.M., Kemp G., Söderberg C.A., Spiro S., Van Wonderen J., Richardson D.J. *Escherichia coli* cytochrome C nitrite reductase NrfA. *Methods Enzymol*. 2008. V. 437. P. 63–77.

Материал поступил в редакцию 06.04.2015, опубликован 26.05.2015.