= МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ==

УДК: 581.129:577.352.53

Мембранный потенциал как механизм регуляции активности периплазматической нитритредуктазы: математическая модель

Ри Н.А.*, Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М.**

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Аннотация. В условиях анаэробного дыхания на нитрите (NO₂) главной составляющей дыхательной цепи в клетках Escherichia coli является периплазматическая нитритредуктаза NrfA, которая обеспечивает формирование цепи передачи электронов на мембране клетки, необходимой для синтеза АТФ, и утилизацию нитрита при концентрациях субстрата не более 2 мМ. Ранее авторами была выдвинута гипотеза, что активность NrfA редуктазы при низких концентрациях NO₂ в среде определяется не только механизмами регуляции экспрессии генов, кодирующих ее структуру, но и действием мембранного потенциала на процессы формирования активной формы фермента в периплазме. Для обоснования этой гипотезы была разработана модель утилизации NO₂ клетками *E. coli* в хемостате, сопряженная с процессами формирования электрического потенциала на мембране клетки. В отсутствие экспериментальных данных о структуре цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите, были рассмотрены два гипотетических сценария формирования мембранного потенциала при культивировании клеток в хемостате с участием форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2, компонентами которых являются форматдегидрогеназа Fdh-H и гидрогеназы Hyd-3 и Hyd-4, и разработаны соответствующие модели. Показано, что включение в модель утилизации нитрита клетками *E. coli* конкретных молекулярно-генетических метаболических процессов, ведущих к формированию мембранного потенциала, позволяет корректно описать экспериментальные данные по кинетике его утилизации в хемостате. Показано также, что результат моделирования не зависит от сценария формирования мембранного потенциала. В целом, полученные данные подтверждают важную роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы при микромолярных концентрациях нитрита в среде. Не исключено, что этот механизм может быть важен и для других белков, активность которых зависит от их локализации в периплазме.

Ключевые слова: анаэробное дыхание, нитрит, мембранный потенциал, периплазматическая NrfA нитритредуктаза, моделирование.

введение

Процессы денитрификации у бактерий тесно связаны с метаболизмом нитрата и нитрита и наработкой энергии в анаэробных условиях. Существуют два типа периплазматических ферментов, перерабатывающих нитрит и участвующих в формировании протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. К первой группе

^{*}kashev@bionet.nsc.ru

^{**}tamara@bionet.nsc.ru

ферментов относятся NirS и NirK нитритредуктазы, которые восстанавливают нитрит до азота: $NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$. Ко второму типу относится Nrf нитритредуктаза, которая восстанавливает нитрит до аммония $NO_2 \rightarrow NH_4$ и присутствует у разных классов протеобактерий, в том числе и у *Escherichia coli* [1, 2].

У *E. coli*, в условиях дыхания на нитрите, периплазматическая формат-зависимая NrfA редуктаза (ЕС 1.7.2.2) является основным ферментом, который перерабатывает нитрит при концентрациях субстрата в среде ниже 2 мМ и участвует в формировании протонного градиента [3, 4]. Донором электронов в данной ситуации служит формат, который является продуктом гликолиза и перерабатывается одной из трех форматдегидрогеназ – FDH-H, Fdh-N и Fdh-O. Последняя не подвержена регуляции и синтезируется на постоянно низком уровне [5]. В условиях дыхания на нитрате Fdh-N форматдегидрогеназа считается наиболее значимым респираторным ферментом [4]. Однако в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста на нитрите, Fdh-N форматдегидрогеназа практически не синтезируется, и достаточно высокой активностью обладает только Fdh-H комплекс [6], который считается основным ферментом переработки формата в условиях ферментации, т.е., в отсутствии электронных акцепторов [4].

В то же время показано [6], что экспрессия гена fdhF, кодирующего структуру форматдегидрогеназы Fdh-H, индуцируется нитритом, причем только в области низких концентраций субстрата. Молекулярная природа этой активации неясна, однако профиль экспрессии fdhF гена удивительно напоминает таковой для *nrf* оперона [7], кодирующего структуру Nrf нитритредуктазы. Сопряженная экспрессия генов, кодирующих Fdh-H дегидрогеназу и NrfA редуктазу, в совокупности с экспериментальными данными по делециям Fdh-H-кодирующих генов, позволяют предположить возможность переноса электронов в результате окисления формата Fdh-H дегидрогеназой на нитрит, восстанавливаемый NrfA редуктазой. [8, 6].

Профиль экспрессии *nrf* оперона, кодирующего структуру NrfA фермента, зависит от концентрации нитрита в среде и определяется транскрипционными факторами NarL и NarP [7]. Структура регуляторной области *nrf* оперона такова, что при низкой концентрации индуктора экспрессия оперона активируется, а при высокой – ингибируется [7, 9]. В результате, при концентрациях нитрита в среде больше, чем 2 мМ, происходит переключение на другую генетическую систему, которая кодирует структуру NirC транспортера и NirB нитритредуктазы и обеспечивает транспорт нитрита в клетку и его переработку цитоплазматической редуктазой [3].

Ранее нами были исследованы молекулярно-генетические механизмы утилизации нитрита клетками *E. coli* методами математического моделирования. Были разработаны две математические модели утилизации нитрита в популяции клеток, размножающихся в проточном хемостате в глюкозо-лимитированных условиях анаэробного дыхания на нитрите. Первая модель [10] продемонстрировала достаточность генетических механизмов регуляции активности *nrf* и *nir* оперонов для объяснения данных по кинетике утилизации нитрита при его концентрации в среде выше 2 мМ и их неспособность обеспечить таковую при концентрации нитрита меньше 1 мМ. В результате был сделан вывод о наличии дополнительного молекулярного механизма, обеспечивающего утилизацию нитрита в данной области концентраций субстрата, неизвестной природы.

Для анализа возможных механизмов реализации недостающей нитритутилизирующей активности была разработана вторая модель [11, 12]. В результате ее анализа было высказано предположение, что наиболее вероятным фактором, обеспечивающим необходимую активность, является мембранный потенциал (МП), и его роль состоит в регуляции активности периплазматической NrfA нитритредуктазы при концентрациях субстрата не превышающих 1 мМ. Однако молекулярный механизм формирования мембранного потенциала остался неизученным.

РИ и др.

В отсутствие конкретных данных о механизмах формирования протонного градиента в условиях дыхания на нитрите, была проведена реконструкция гипотетической цепи передачи электронов от формата к нитриту с участием Fdh-H дегидрогеназы. Как отмечено выше, это единственный фермент, утилизирующий формат и обладающий достаточно высокой активностью в условиях культивирования клеток *E. coli* в проточном хемостате [6]. Поскольку Fdh-H дегидрогеназа входит в состав двух форматгидрогенлиазных комплексов – FHL-1 и FHL-2 [13, 14], в настоящей работе предложено два альтернативных сценария с ее участием. Модель утилизации нитрита [12], дополненная этими гипотетическими молекулярно-генетическими механизмами формирования протонного градиента, в обоих случаях воспроизводит экспериментально наблюдаемую динамику утилизации нитрита клетками *E. coli* в проточном хемостате в области малых значениях концентраций добавленного нитрита (< 2 мМ), [15], т.е., ликвидирует противоречие между физиологическими и генетическими данными [10], что позволяет считать мембранный потенциал механизмом регуляции активности периплазматической NrfA редуктазы у *E. coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Реконструкция молекулярно-генетического механизма формирования протонного градиента в условиях дыхания на нитрите

Ряд экспериментальных данных [8, 14, 6, 13, 16, 17] позволяет сделать предположение, что в формировании протонного градиента в условиях анаэробного дыхания на нитрите может участвовать Fdh-H форматдегидрогеназа, активные сайты которой расположены в цитоплазме. Предпосылкой служат данные [6], что в условиях хемостата Fdh-H дегидрогеназа является единственной форматдегидрогеназой, экспрессия которой зависит от концентрации нитрита в среде, и профиль этой экспрессии удивительно напоминает таковой для *nrf* оперона, кодирующего структуру NrfA нитритредуктазы [7]. При этом неизвестно, какова структура цепи передачи электронов от формата к нитриту, учитывая особенности глюкозо-лимитирующих условий стационарного роста клеток *E. coli* в хемостате.

Fdh-H форматдегидрогеназа входит в состав двух мультиферментных цитоплазматически ориентированных комплексов FHL-1 и FHL-2, ассоциированных с мембраной. Форматгидрогенлиазный комплекс FHL-1, помимо Fdh-H дегидрогеназы, содержит гидрогеназу Hyd-3, а FHL-2 – гидрогеназу Hyd-4 [14, 16]. Рассмотрим возможности обоих комплексов с точки зрения их участия в формировании дыхательной цепи в выше описанных условиях.

Согласно исследованиям [18], основная роль Hyd-3 гидрогеназы связана с наработкой молекулярного водорода (H₂) при окислении формата Fdh-H дегидрогеназой. Экспрессия оперона *hyc*, кодирующего структуру Hyd-3, оптимальна в кислой области значений рН и в отсутствие глюкозы в среде [18, 19]. Показано также, что основным ферментом, потребляющим H₂ в анаэробных условиях, является Hyd-2 гидрогеназа [18]. Учитывая, что клетки *E. coli* в хемостате культивируются при слабокислом pH = 6.5 и низкой концентрации глюкозы в среде (2.25 мМ) [20], можно предположить наличие активности FHL-1 комплекса в условиях стационарного роста клеток в хемостате. Исходя из этого, были предложены следующие гипотетические сценарии формирования респираторной цепи с участием FHL-1 комплекса в условиях культивирования клеток E. coli в хемостате и при низких концентрациях нитрита в среде (<1 мМ).

Сиенарий 1. В результате сопряженной активности ферментов FHL-1 комплекса из формата в цитоплазме синтезируется молекулярный водород, который в отсутствие электронных акцепторов выводится из клетки и накапливается в среде. В респираторных условиях, в присутствии электронных акцепторов, этот водород может быть использован в качестве субстрата респираторными мембран-связанными гидрогеназами, которых у *E. coli* как минимум две, гидрогеназа Hyd-1 и Hyd-2 [21, 17]. Это предположение не вступает в противоречие с каталитическими свойствами ферментов. Известно, что константы Михаэлиса для Hyd-1 и Hyd-2 по отношению к водороду имеют на порядок более низкие значения (2–4 мкМ), чем Hyd3 (34 мкМ) [22, 23, 16], что создает реальную возможность утилизации Н₂ в периплазме при появлении в среде акцепторов электронов, в частности, нитрита. Учитывая данные [18, 24], согласно которым в анаэробных условиях in vivo Hyd-1 гидрогеназа не участвует в потреблении H₂, выбор был остановлен на гидрогеназе Hyd-2, физиологические условия функционирования которой (pH_{опт} ~ 6-8) [22] не исключают возможности ее участия в формировании респираторной цепи с NrfA редуктазой в глюкозолимитирующих условиях стационарного роста культуры в хемостате.

Сценарий формирования гипотетической цепи передачи электронов в глюкозолимитирующих условиях анаэробного дыхания на нитрите с участием FHL-1 комплекса и Hyd-2 гидрогеназы показан на рисунке 1. Источником электронов в данной ситуации служит формат, из которого при участии FHL-1 синтезируется молекулярный водород, который диффундирует в периплазму и в присутствии нитрита служит субстратом для респираторной гидрогеназы Hyd-2 и источником электронов для NrfA редуктазы, восстанавливающей благодаря этому нитрит до аммония.



Рис. 1. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-1 комплекса в условиях дыхания на нитрите с использованием в качестве посредника респираторной, мембран-связанной Hyd-2 гидрогеназы. Зелеными пунктирными линиями показан возможный путь передачи электронов от формата к молекулярному водороду и далее от водорода через хиноны к нитриту.

Вопрос о возможности формирования цепи переноса электронов, в которой донором является водород, а нитрит – акцептором, остается открытым, поскольку единственный эксперимент [25], результаты которого не поддерживают сценарий, предложенный на рисунке 1, и возможность участия Hyd-2 в потреблении водорода в присутствии нитрита, проводился в области высоких значений нитрита, равных 10 мМ, что гораздо выше области значений, оптимальных для респираторной

нитритредуктазы, которые сравнимы с K_m (25–30 μ M), судя по данным [26]. В отсутствии других работ, которые бы исследовали кинетику утилизации водорода гидрогеназами в условиях, близких к оптимальным для NrfA редуктазы, а также в различных областях pH среды, можно считать, что гипотеза об участии FHL-1 и Hyd-2 в формировании цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите имеет право на существование.

Альтернативным вариантом участия FHL-1 ферментного комплекса R формировании протонного градиента может быть участие, входящей в его состав, Hyd-3 гидрогеназы в качестве протонной помпы. Эта возможность просматривается в структуре HycD/HycC субъединиц Hyd-3 фермента, обладающих значительным сходством с респираторным комплексом НАДН:хиноноксидоредуктазы (Complex 1) [27, 16, 28], и продемонстрирована в экспериментах у двойных мутантов с делециями оперонов *hya* [Hyd-1] и *hyb* [13], проведенных при pH = 6.5 в ферментирующих условиях, что совпадает с условиями роста клеток в проточном хемостате [20] в отсутствие нитрита. В случае прямой транслокации протонов через FHL-1 комплекс, механизм формирования мембранного потенциала будет идентичен таковому с участием FHL-2 комплекса, который рассматривается далее.

Что касается FHL-2 комплекса, то его физиологическая роль до сих пор неясна [17]. Особенности структурной организации Hyd-4 гидрогеназы, входящей в состав FHL-2 комплекса, позволяют предположить наличие у нее прямой протон-транслоцирующей активности [14, 27, 29]. Причем, согласно данным [30, 31], в кислых pH активность Hyd-4 гидрогеназы в направлении продукции молекулярного водорода существенно снижена по сравнению с таковой для Hyd-3, что в условиях хемостата создает условия для реализации респираторного сценария.

Сценарий 2. На основании данных о возможном участии Hyd-4 в цепи переноса электронов мы предлагаем следующий альтернативный сценарий формирования гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-2 комплекса в глюкозолимитирующих условиях анаэробного дыхания на нитрите (см. рис. 2).



Рис. 2. Схема гипотетической цепи передачи электронов от формата к нитриту с участием FHL-2 комплекса в результате реализации прямой протон-транслоцирующей активности гидрогеназы Hyd-4.

Источником электронов в данной ситуации служит формат, который образуется в результате гликолиза. Мы предполагаем, что в условиях слабокислого pH в хемостате, но в ограничениях по глюкозе и в отсутствии добавленного формата, активность Hyd-4 гидрогеназы может быть достаточной для обеспечения необходимого потока электронов через хиноны на NrfA редуктазу, восстанавливающей нитрит до аммония.

Источником электронов в данной ситуации служит формат, который образуется в результате гликолиза. Исходя из данных [30, 31], мы предполагаем, что в условиях слабокислого pH в хемостате активность каталитической субъединицы (HyfG) Hyd-4 гидрогеназы в направлении синтеза молекулярного водорода будет существенно снижена, что в присутствии электронных акцепторов, в частности нитрита, создает условия для передачи электронов к пулу хинонов и активации Nrf редуктазы, восстанавливающей благодаря этому нитрит до аммония. Экспериментальных данных об участии гидрогеназы Hyd-4 в дыхании на нитрите пока нет.

2. Математическая модель дыхания на нитрите

Для анализа предложенных выше механизмов формирования мембранного потенциала и его участия в регуляции активности респираторной NrfA редуктазы мы, модифицировали разработанную ранее базовую модель, описывающую молекулярномеханизмы утилизации нитрита *E*. генетические клетками coli R глюкозолимитирующих условиях проточного хемостата [12], дополнив ee подсистемами, описывающими молекулярно-генетические и метаболические процессы формирования протонного градиента в условиях дыхания на нитрите согласно тем сценариям, которые реконструированы выше (см. рис. 1 и 2).

Базовая модель подробно характеризуется в работе [12]. Поэтому здесь дадим ee краткое неформальное описание. Базовая модель представлена только подсистемами, которые описывают процессы переработки внеклеточного нитрита периплазматической NrfA редуктазой. транспорта нитрита В клетку NirC транспортером и его переработки внутри клетки цитоплазматической NirB редуктазой. В системе учитывается синтез, и деградация субъединиц, процессы секреции и сборки субъединиц в NrfA редуктазный комплекс в периплазме и сборка NirB редуктазы в цитоплазме [12]. В этой модели процессы секреции субъединиц NrfA редуктазы из цитоплазмы в периплазму в зависимости от величины условного мембранного потенциала моделировались с помощью функций Хилла [32].

В модифицированных моделях, построенных на основе базовой модели с учетом описанных выше процессов, процессы секреции периплазматических белков (NrfA редуктазы и Hyd-2 гидрогеназы) также зависят от величины мембранного потенциала. Однако в отличие от базовой модели, в ее модифицированных версиях, мембранный потенциал возникает в результате реализации конкретных молекулярных процессов переноса протонов (H⁺) из цитоплазмы, где они нарабатываются при окислении формата Fdh-H дегидрогеназой, в периплазму, где они используются NrfA редуктазой для восстановления нитрита до аммония, через хиноновый цикл окисления-восстановления хинонов (MK↔MKH₂).

В модифицированных моделях цепь передачи электронов, обеспечивающая дыхание клетки, реализуется двумя сценариями.

В сценарии 1 протоны на пул хинонов поступают с промежуточной утилизацией цитоплазматических протонов FHL-1 комплексом, обеспечивающего синтез молекулярного водорода и его последующее использование гидрогеназой Hyd-2. Сценарий 1 реализуется по следующей стехиометрической схеме:

 $HCOO^{-}_{cyt} + H^{+}_{cyt} \rightarrow CO_{2} + H_{2,c}$ $H_{2,c} \rightarrow H_{2,prp}$ 243

$$H_{2prp} + 2H^{+}_{cyt} + MK \rightarrow + MKH_{2} + 2H^{+}_{prp} + 2e^{-}$$
$$NO_{2} + 8H^{+}_{prp} + 6e^{-} + 3MKH_{2} \rightarrow NH_{4}^{+} + 3MK + 2H_{2}O + 6H^{+}_{prp}$$

В сценарии 2 протоны на пул хинонов поступают напрямую через FHL-2 протонтранслоцирующий комплекс согласно стехиометрической схеме:

РИ и др.

$$2\text{HCOOH} + 4\text{H}^+_{c} + \text{MK} \rightarrow 2 \text{ CO}_2 + \text{H}_2 + \text{MKH}_2 + 2\text{H}_{prp} + 2\text{e}^-$$
$$\text{NO}_2 + 8\text{H}^+_{prp} + 6\text{e}^- + 3\text{MKH}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{MK} + 2\text{H}_2\text{O} + 6\text{H}^+_{prp}$$

Индексы *с* и *prp* показывают локализацию метаболитов в цитоплазме и периплазме, соответственно.

Ниже представлены математические модели М1 и М2, описывающие эти процессы, согласно реконструированным выше сценариям. Численные расчеты проводили на расширенной модели, в которую включено описание молекулярно-генетических процессов утилизации нитрита в хемостате (базовая модель) и процессов формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 (сценарий 1) или FHL-2 (сценарий 2) комплексов.

2.1. Математическая модель формирования мембранного потенциала с участием FHL1 комплекса (сценарий 1)

Сценарий 1, схема которого приведена на рисунке 1, описывает реконструированный на основе литературных данных, молекулярно-генетический механизм формирования протонного градиента на мембране клетки *E. coli* в результате процессов, последовательность которых показана на рисунке 3.



Рис. 3. Последовательность ферментативных реакций формирования цепи передачи электронов от формата к нитриту с участием FHL-1 комплекса с использованием респираторной, мембрансвязанной Hyd-2 гидрогеназы в качестве посредника.

Модель, реализующая последовательность реакций, представленных на рисунке 3, включает молекулярно-генетические механизмы функционирования ферментных комплексов FHL-1 (на рисунке 3 и в модели обозначен как FHL1) и Hyd-2 (обозначен как HYD2), обеспечивающих процессы утилизации формата и молекулярного водорода, а также процессы синтеза субъединиц этих ферментов, сборки активных комплексов: форматгидрогенлиазного FHL-1 в цитоплазме и гидрогеназы Hyd-2 в периплазме. Формализованное описание приведено ниже.

Процесс синтеза формата (FRM) из пирувата, который происходит благодаря активности пируватформатлиазного комплекса PFL [33], в модели мы описали обобщенной функцией Хилла, зависящей от концентрации нитрита, поскольку экспрессия *pfl* оперона, кодирующего структуру субъединиц пируватформатлиазного комплекса PFL, контролируется нитритом через NarL транскрипционный фактор [34]:

$$ks_{FRM}(u) = ks_{0,FRM} \cdot \frac{1 + w_{i,NO2,FRM} \cdot \left(\frac{u}{K_{u,FRM}}\right)^{h_{u,FRM}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{u,FRM}}\right)^{h_{u,FRM}}}.$$
(1)

Здесь ks_{0,FRM} – константа базисной скорости синтеза формата; w_{i,NO2,FRM}, K_{u,FRM}, h_{u,FRM}, – константы, входящие в обобщенную функцию Хилла и описывающие ингибирующий эффект нитрита на скорость синтеза формата.

Концентрация формата в цитоплазме клетки, которая зависит от соотношения скоростей его синтеза, окисления ферментами FHL-1 комплекса до углекислого газа и водорода, а также вывода из клетки благодаря активности FocA транспортера [35], определяется согласно дифференциальному уравнению:

$$\frac{dFRM_c}{dt} = ks_{FRM}(u) - k_{flow} \cdot FRM_c - V_{form, FRM, FHL1}.$$
(2)

Здесь $V_{form,,FRM,FHL1}$ – скорость утилизации формата, $ks_{FRM}(u)$ – скорость синтеза формата, зависящая от уровня нитрита в среде, k_{flow} – константа скорости оттока FRM_c из цитоплазмы в периплазму. Здесь, и везде ниже, добавление буквы c в индексацию означает локализацию вещества и/или его функциональной части в цитоплазме. Иначе вещества и/или осуществляемые ими функции локализованы в периплазме

Процессы формирования активного FHL-1 комплекса в модели описаны системой дифференциальных уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dFdhF_{c}}{dt} = ks_{FdhF} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FdhF_{c}, \\ \frac{dHyd_{3,c}}{dt} = ks_{hyc} \cdot m_{hyc} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{3,c}, \\ \frac{dFHL1_{c}}{dt} = V_{form,FHL1} - V_{form,FRM,FHL1} + V_{util,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1_{c}, \\ \frac{dFHL1FRM_{c}}{dt} = V_{form,FRM,FHL1} - V_{form,H,FRM,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1FRM_{c}, \\ \frac{dFHL1HFRM_{c}}{dt} = V_{form,H,FRM,FHL1} - V_{util,FHL1} - k_{flow} \cdot FHL1HFRM_{c}, \end{array} \right\}$$

где $FdhF_c$ и $Hyd_{3,c}$ – концентрации мономеров форматдегидрогеназы Fdh-H и субъединиц HYD-3 гидрогеназы в цитоплазме, значения которых определяются соответствующими константами синтеза k_{SFdh} и k_{Shyc} , и значениями относительных активностей оперонов m_{FdhF} и m_{hyc} ; $k_{d,c}$ – константы деградации белков и комплексов в цитоплазме. *FHL*1_c, *FHL*1*FRM*_c, *FHL*1*HFRM*_c – концентрации комплексов FHL-1 и его соединений с форматом и протоном, соответственно.

Уравнения, описывающие скорость формирования комплекса FHL-1 ($V_{form,FHL1}$), его связывания с форматом ($V_{form,FRM,FHL1}$) и протоном ($V_{form,H,FHL1}$), а также скорость выделения продуктов реакции ($V_{util,FHL1}$) приведены ниже. Синтез субъединиц ферментных комплексов FHL-1 и HYD-3 определяется уровнем экспрессии оперонов *fdhF* и *hyc*, кодирующих их структуру, и описан функциями m_{FdhF} и m_{hyc} , соответственно. Их вид определен на основании данных [6, 36, 37], которые свидетельствуют о том, что эти опероны подвержены отрицательной регуляции нитратом. Поскольку для нитрата и нитрита существует единая система регуляции

через NarP и NarL транскрипционные факторы, то можно предположить появление ингибирующего действия на экспрессию оперонов не только со стороны нитрата, но и нитрита. В связи с чем относительные активности оперонов *fdhF* и *hyc* описаны формулами:

$$m_{fdhF} = \frac{s0_{fdhF} + s1_{fdhF} \cdot \left(\frac{u}{K1_{fdhF}}\right)^{h_{fdhF}} + s2_{fdhF} \cdot \left(\frac{u}{K2_{fdhF}}\right)^{h_{2fdhF}}}{1 + \left(\frac{u}{K1_{fdhF}}\right)^{h_{1fdhF}} + \left(\frac{u}{K2_{fdhF}}\right)^{h_{2fdhF}}}, \quad (4)$$

$$m_{hyc} = \frac{s0_{hyc} + s1_{hyc} \cdot \left(\frac{u}{K1_{hyc}}\right)^{h_{1hyc}} + s2_{hyc} \cdot \left(\frac{u}{K2_{hyc}}\right)^{h_{2hyc}}}{1 + \left(\frac{u}{K1_{hyc}}\right)^{h_{1hyc}} + \left(\frac{u}{K2_{hyc}}\right)^{h_{2hyc}}}, \quad (5)$$

где параметры sO_{FdhF} и sO_{hyc} описывают базовый уровень активности оперонов fdhF и hyc, соответственно; $s1_{FdhF}$, $K1_{FdhF}$, $h1_{FdhF}$ – параметры, описывающие активацию нитритом fdhF и hyc оперонов, соответственно; $s2_{FdhF}$, $K2_{FdhF}$, $h2_{FdhF}$ – параметры, описывающие ингибирование нитритом fdhF и hyc оперонов.

Нарабатываемые с оперонов *fdhF* и *hyc* полипептиды FdhF и Hyd формируют форматлиазный комплекс *FHL*-1, который связывается с субстратами: форматом и протонами, образуя комплекс, обозначенный в модели как *FHL*1*HFRM*_c, который распадается с образованием конечных продуктов реакции:

$$V_{form,FHL1} = k_{FHL1} \cdot \left(\frac{FdhF_c \cdot Hyd_{3,c}^4}{K_{dis,FHL1}^4} - FHL1_c \right),$$

$$V_{form,FRM,FHL1} = k_{FRM,FHL1} \cdot \left(\frac{FHL1_c \cdot FRM_c}{K_{dis,FRM,FHL1}} - FRMFHL1_c \right),$$

$$V_{form,H,FRM,FHL1} = k_{H,FRM,FHL1} \cdot \left(\frac{FRMFHL1_c \cdot H_{in}}{K_{dis,H,FRM,FHL1}} - FRMHFHL1_c \right),$$

$$V_{uil,FHL1} = kcat_{FHL1} \cdot FHL1HFRM_c,$$
(6)

где константы распада и диссоциации комплекса *FHL*-1 и комплексов, в которые он входит, обозначены как k_{FHL1} , $k_{FRM,FHL1}$, $k_{H,FRM,FHL1}$ и $K_{dis,FHL1}$, $K_{dis,FRM,FHL1}$, $K_{dis,H,FRM,FHL1}$; $k_{cat_{FHL1}}$ – обобщенная константа оборота комплекса FHL-1.

Процессы синтеза субъединиц Hyd-2 гидрогеназы и формирования активной формы фермента в периплазматическом пространстве клетки описаны системой уравнений:

$$\frac{d}{dt} Hyd_{2,c} = ks_{hyd} \cdot m_{hyd} - (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_{2}) - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2,c},
\frac{d}{dt} Hyd_{2} = -k_{peripl} \cdot (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_{2}) - V_{form,Hyd_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2},
\frac{d}{dt} Hyd_{2,cmp} = V_{form,Hyd_{2}} - V_{form,Hyd_{2},H_{2}} + V_{util,Hyd_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2,cmp},
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2} = V_{form,Hyd_{2},H_{2}} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2},
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMK = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMK,
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMKH = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH,
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMKH = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH,
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMKH = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH,
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMKH = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} - V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH,
\frac{d}{dt} Hyd_{2}H_{2}DMKH_{2} = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - V_{util,Hyd_{2}} - k_{flow} \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH_{2}.$$

Здесь $Hyd_{2,c}$ – концентрация субъединиц Hyd-2 в цитоплазме, Hyd_2 , $Hyd_{2,cmp}$, Hyd_2H_2 , Hyd_2H_2DMK , Hyd_2H_2DMKH , $Hyd_2H_2DMKH_2$ – концентрации субъединиц фермента, активных комплексов Hyd-2 и ее соединений с молекулярным водородом в периплазме, диметилхиноном и протонами, соответственно; ks_{hyd} – константа синтеза мономеров с оперона *hyd.* $kt_{out}(PMF)$ – константа транспорта субъединиц гидрогеназы Hyd-2 в периплазматическое пространство; kt_{in} – константа обратного транспорта субъединиц в цитоплазму; $k_{d,c}$ и k_d – константы деградации белков и комплексов в цитоплазме и периплазме, соответственно.

По аналогии с регуляцией экспрессии *hyc* оперона, кодирующего Hyd-3 гидрогеназу, в модели транскрипция оперона *hyb*, кодирующего Hyd-2, находится под ингибирующим контролем не только нитрата, как это было показано в работе [37], но и нитрита. Исходя из этого, относительная доля активности оперона *hyd* описывается уравнением:

$$m_{hyd} = \frac{s0_{hyd} + s1_{hyd} \cdot \left(\frac{u}{K1_{hyd}}\right)^{h_{hyd}}}{1 + \left(\frac{u}{K1_{hyd}}\right)^{h_{hyd}}}$$
(8)

Скорости формирования комплекса V_{form,Hyd_2} , связывание гидрогеназы с водородом V_{form,Hyd_2,H_2} и хиноном $V_{form,Hyd_2,H_2,DMK}$ описываются уравнениями:

$$V_{form,Hyd_{2}} = k_{Hyd_{2}} \cdot \left(\frac{Hyd_{2}^{3}}{K_{dis,Hyd_{2}}^{2}} - Hyd_{2,cmp}\right),$$

$$V_{form,Hyd_{2},H_{2}} = k_{Hyd_{2},H_{2}} \cdot \left(\frac{Hyd_{2,cmp} \cdot H_{2}}{K_{dis,Hyd_{2},H_{2}}} - Hyd_{2}H_{2}\right),$$

$$V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK} = k_{Hyd_{2},H_{2},DMK} \cdot \left(\frac{Hyd_{2,cmp}H_{2} \cdot DMK}{K_{dis,Hyd_{2},H_{2},DMK}} - Hyd_{2}H_{2}DMK\right)$$
(9)

$$V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} = k_{Hyd_{2},H_{2},DMK,H} \cdot \left(\frac{Hyd_{2}H_{2}DMK_{2} \cdot H_{in}}{K_{dis,Hyd_{2},H_{2},DMK,H}} - Hyd_{2}H_{2}DMKH\right)$$
$$V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} = k_{Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} \cdot \left(\frac{Hyd_{2}H_{2}DMK_{2}H \cdot H_{in}}{K_{dis,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}}} - Hyd_{2}H_{2}DMKH_{2}\right)$$
$$V_{util,Hyd_{2}} = kcat_{Hyd_{2}} \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH_{2}$$

РИ и др.

где k_{Hyd_2} , k_{Hyd_2,H_2} , $k_{Hyd_2,H_2,DMK}$, $k_{Hyd_2,H_2,DMK,H}$, k_{Hyd_2,H_2,DMK,H_2} – константы распада комплексов гидрогеназы Hyd-2 и ее соединений с субстратами – молекулярным водородом, диметилхиноном и протонами; K_{dis,Hyd_2} , K_{dis,Hyd_2,H_2} , $K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK}$, $K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK,H}$ – константы диссоциации вышеуказанных комплексов; $kcat_{Hyd_2}$ – константа оборота фермента Hyd-2.

Процессы секреции субъединиц Hyd-2 из цитоплазмы в периплазму включают механизм регуляции их скорости транспорта (*kt*_{out}) мембранным потенциалом PMF, который определяется соотношением концентрации протонов по обе стороны мембраны и описан с помощью обобщённых функций Хилла [32].

$$PMF = \frac{k_{H_{out}}}{H_{in}}; \ kt_{out}\left(PMF\right) = \frac{kt0 + w_{kt} \cdot \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}}{1 + \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}}.$$
(10)

Концентрация протонов в цитоплазме H_{in} определяется согласно уравнению:

$$\frac{d}{dt}H_{in} = ks_{H_{in}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{atp} - V_{form, Hyd_2, H_2, DMK, H} - V_{form, Hyd_2, H_2, DMK, H_2} . (11)$$

Здесь $k_{SH_{in}}$ – суммарная скорость наработки протонов в цитоплазме, V_{atp} – скорость работы F₀F₁ АТФ-синтазы, которая синтезирует АТФ при транспорте протонов из периплазмы ($k_{H_{out}}$) в цитоплазму. Скорость АТФ-синтазы в модели определяется согласно формуле:

$$V_{atp} = k_{atp} (PMF) \cdot \frac{kcat_{ATPase} \cdot k_{H_{out}} \cdot ATPase}{K_{M,ATPase} + k_{H_{out}}},$$
(12)

здесь $k_{H_{out}}$ – концентрация протонов в периплазме; *ATPase* – концентрация АТФсинтазы в клетке, которая в модели, исходя из данных [38], принята постоянной; $kcat_{ATPase}$, $K_{M,ATPase}$ – константы оборота АТФ-синтазы и константа Михаэлиса для протонов.

Скорость переноса протонов из периплазмы в цитоплазму определяется величиной мембранного потенциала согласно механизму работы фермента АТФ-синтазы [39] и описана с использованием функции Хилла:

$$k_{atp} \left(PMF \right) = \frac{k0_{atp} + w_{atp} \cdot \left(\frac{PMF}{K_{atp, PMF}} \right)^{h_{atp, PMF}}}{1 + \left(\frac{PMF}{K_{atp, PMF}} \right)^{h_{atp, PMF}}}.$$
(13)

Молекулярный водород (H_2), нарабатываемый в ходе окисления формата FHL-1 комплексом ($V_{uil,FHL1}$), как и все газы, беспрепятственно диффундирует в периплазму 248

клетки и перерабатывается гидрогеназой Hyd-2 ($V_{formlHyd_2,H_2}$), избыток выводится далее из клетки в среду ($k_{H_2,out}$ H_2). Этот процесс описан следующим образом:

$$\frac{d}{dt}H_2 = k_{peripl} \cdot V_{util,FHL1} - V_{form,Hyd_2,H_2} - \left(k_{flow} + k_{H_2,out}\right) \cdot H_2.$$
(14)

Связь между двумя системами утилизации формата и нитрита осуществляется через пул хинонов. В анаэробных условиях наибольшую роль играют диметилменахинон (DMKH2) и менахинон (MKH2), концентрации которых зависят от присутствия того или иного акцептора в среде. Поскольку при культивировании *E. coli* в присутствии нитрита концентрация DMKH2 в клетке в два раза больше, чем MKH2 (оценено из данных [40, 41, 42]), модель адаптирована к концентрации DMKH2, что не исключает возможного участия и MKH2 в процессе переноса электронов.

Изменение концентрации диметилменахинона (*DMK*) и его восстановленной формы диметименахинола (*DMKH*2) в мембране клетки описывается согласно уравнениям:

$$\frac{d}{dt}DMK = -V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} + 3 \cdot V_{util,Nrf} - k_{flow} \cdot DMK,$$

$$\frac{d}{dt}DMKH2 = ks_{DMKH2} - V_{util,Hyd_2} + 3 \cdot V_{form,DMK,H,NO2,Nrf} - k_{flow} \cdot DMKH2,$$

$$\frac{d}{dt}NrfA_2B_2 = V_{form,Nrf} + V_{util,Nrf} - V_{form,u,Nrf} - (k_d + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2,$$

$$\frac{d}{dt}Nrfu = V_{form,u,Nrf} - V_{form,H,u,Nrf} - (k_d + k_{flow}) \cdot Nrfu,$$

$$\frac{dNrfHu}{dt} = V_{form,H,u,Nrf} - V_{form,DMK,H,u,Nrf} - (k_d + k_{flow}) \cdot NrfHu,$$

$$\frac{dNrfDMKHu}{dt} = V_{form,DMK,H,u,Nrf} - V_{util,Nrf} - k_{flow} \cdot NrfDMKHu.$$
(15)

Здесь ks_{DMKH2} — конститутивная скорость синтеза хинола, $V_{form,Hyd_2,H_2,DMK}$ — скорость формирования комплекса гидрогеназы и субстратов, V_{util,Hyd_2} — скорость высвобождения продуктов гидрогеназой. $V_{formlNrf}$ — скорость формирования активной формы NrfA фермента из димеров NrfA-NrfB; $V_{form,u,lNrf}$, $V_{form,H,u,lNrf}$, $V_{form,DMK,H,u,lNrf}$ — скорости связывания NrfA с нитритом, периплазматическими протонами и хинолами; $V_{util,Nrf}$ — скорость высвобождения продуктов NrfA редуктазой. Уравнения, описывающие данные скорости приведены ниже:

$$V_{form,Nrf} = k_{dis,NrfA_2B_2} \cdot \left(\frac{NrfAB^2}{K_{dis,NrfA_2B_2}} - NrfA_2B_2 \right),$$

$$V_{form,u,Nrf} = k_{Nrf,u} \cdot \left(\frac{NrfA_2B_2 \cdot u}{K_{dis,NrfA_2B_2u}} - Nrfu \right),$$

$$V_{form,H,u,Nrf} = k_{Nrf,H,u,Nrf} \cdot \left(\frac{Nrfu \cdot k_{H_{out}}^2}{K_{dis,H,u,Nrf}} - NrfHu \right),$$

$$V_{form,DMK,H,u,Nrf} = k_{DMKH2,H,u,Nrf} \cdot \left(\frac{NrfHu \cdot DMKH2^3}{K_{dis,DMKH2,H,u,Nrf}^3} - NrfDMKHu \right),$$

$$V_{util,Nrf} = kcat_{Nrf} \cdot NrfDMKHu.$$
(16)

Полная система дифференциальных уравнений модели М1 утилизации нитрита в хемостате с учетом сценария 1 формирования МП (уравнения (1)–(16)) приведена в Приложении 1.

2.2. Математическая модель формирования мембранного потенциала с участием FHL-2 комплекса (сценарий 2)

Сценарий 2, схема которого приведена на рис. 2, описывает гипотетический молекулярно-генетический механизм формирования протонного градиента на мембране клетки *E. coli* в результате процессов, последовательность которых приведена на рис.4:



Рис. 4. Последовательность ферментативных реакций формирования цепи передачи электронов от формата к нитриту с участием FHL-2 комплекса в результате реализации прямой протонтранслоцирующей активности гидрогеназы Hyd-4.

Отличие данного сценария от предыдущего варианта формирования мембранного потенциала связано с различиями в механизмах функционирования FHL-1 и FHL-2 форматдегидрогенлиазных комплексов. FHL-2 комплекс способен за счет работы протон-транслоцирующих белков за один ферментативный акт переносить два протона в периплазму и два протона – на хиноны, тем самым из цитоплазмы выводятся четыре протона. С учетом последнего, уравнение, определяющее концентрацию цитоплазматических протонов будет иметь вид:

$$\frac{dH_{in}}{dt} = ks_{H_{in}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{atp} - V_{form,H,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_3,FRM_2,FHL2}$$
(17)
$$-V_{form,H_4,FRM_2,FHL2}$$

Здесь $k_{S_{H_{in}}}$ – обобщенная скорость наработки внутриклеточных протонов; $V_{form,H,FRM_2,FHL2}$, $V_{form,H_2,FRM_2,FHL2}$, $V_{form,H_4,FRM_2,FHL2}$ описывают скорости формирования комплекса протонов и FHL-2.

В модели форматдегидрогеназа, входящая в состав FHL-2 комплекса, перерабатывает две молекулы формата в цитоплазме для того, чтобы перенести два электрона на гидрогеназу Hyd-4 (по аналогии с FHL-1) и еще дополнительно два электрона на пул хинонов:

$$\frac{d}{dt}FRM_{c} = ks_{FRM}\left(u\right) - k_{flow} \cdot FRM_{c} - V_{form, FRM, FHL2} - V_{form, FRM_{2}, FHL2}$$
(18)

Процессы синтеза формата, формирование комплексов NrfA редуктазы и скорости работы АТФ-синтазы аналогичны таковым в сценарии 1, а процессы утилизации происходят согласно вышеприведенной схеме и описаны и системой уравнений:

250

$$\frac{d}{dt}FdhF_{c} = ks_{FdhF} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FdhF_{c},$$

$$\frac{d}{dt}Hyd_{4,c} = ks_{hyf} \cdot m_{hyf} - V_{form,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{4,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2_{c} = V_{form,FHL2} - V_{form,FRM,FHL2} + V_{uil,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2_{c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2FRM_{c} = V_{form,FRM,FHL2} - V_{form,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM_{c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2FRM_{2,c} = V_{form,FRM_2,FHL2} - V_{form,H,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2HFRM_{2,c} = V_{form,H,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2HFRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_2FRM_{2,c} = V_{form,H_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2HFRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_3FRM_{2,c} = V_{form,H_2,FHL2} - V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_2FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_3FRM_{2,c} = V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_4FRM_{2,c} = V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,M_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_4FRM_{2,c} = V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_4FRM_{2,c} = V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_4FRM_{2,c} = V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2H_4FRM_{2,c} = V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c},$$

$$\frac{d}{dt}FHL2DMKH_4FRM_{2,c} = V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{util,FHL2} - k_{flow} \cdot FHL2DMKH_4FRM_{2,c}.$$

$$(19)$$

В модели предполагается, что активность *hyf* оперона ингибируется нитритом по аналогии с другими оперонами дыхательной системы, что отражено в уравнении:

$$m_{hyf} = \frac{s0_{hyf} + s1_{hyf} \cdot \left(\frac{u}{K1_{hyf}}\right)^{h1_{hyf}}}{1 + \left(\frac{u}{K1_{hyf}}\right)^{h1_{hyf}}}.$$
 (20)

Мономер FDH-H и четыре субъединицы гидрогеназы Hyd-4 – HyfA, HyfH, HyfI и HyfG [14] – образуют комплекс FHL-2. Поскольку мономеры гидрогеназы нарабатываются с одного оперона, то их концентрации в модели приняты равными и обозначаются одной переменной Hyd₄. Таким образом, процесс формирования форматлиазного комплекса описывается уравнением:

$$V_{form,FHL2} = k_{FHL2} \cdot \left(\frac{FdhF_c \cdot Hyd_{4,c}}{K_{dis,FHL2}} - FHL2_c\right), \tag{21}$$

Скорости формирования FHL-2 комплекса с форматом, протонами и хинонами имеют вид:

$$V_{form,FRM,FHL2} = k_{FRM,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2_c \cdot FRM_c}{K_{dis,FRM,FHL2}} - FHL2FRM_c\right),$$

$$V_{form,FRM_{2},FHL2} = k_{FRM,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2FRM_{c} \cdot FRM_{c}}{K_{dis,FRM,FHL2}} - FHL2FRM_{2,c} \right),$$

$$V_{form,H,FRM_{2},FHL2} = k_{FRM_{2},H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_{2},H,FHL2}} - FHL2HFRM_{2,c} \right),$$

$$V_{form,H_{2},FRM_{2},FHL2} = k_{FRM_{2},H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2HFRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_{2},H,FHL2}} - FHL2H_{2}FRM_{2,c} \right),$$

$$V_{form,H_{3},FRM_{2},FHL2} = k_{FRM_{2},H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2H_{2}FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_{2},H,FHL2}} - FHL2H_{3}FRM_{2,c} \right),$$

$$V_{form,H_{4},FRM_{2},FHL2} = k_{FRM_{2},H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2H_{2}FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_{2},H,FHL2}} - FHL2H_{4}FRM_{2,c} \right),$$

$$m_{,DMK,H,FRM,FHL2} = k_{DMK,FRM_{2},H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHLH_{4}FRM_{2,c} \cdot DMK}{K_{dis,DMK,FRM_{2},H_{4},FHL2}} - FHL2DMKH_{4}FRM_{2,c} \right),$$

$$V_{util,FHL2} = kcat_{FHL2} \cdot FHL2DMKH_{4}FRM_{2,c}.$$

DИ и пр

Здесь k_{FHL2} , $k_{FRM,FHL2}$, $k_{FRM_2,H,FHL2}$, $k_{DMK,FRM_2,H,FHL2}$ – константы распада комплексов FHL-2 и его соединений с субстратами – форматом, протонами и диметилхиноном; $K_{dis,FHL2}$, $K_{dis,FRM,FHL2}$, $K_{dis,FRM_2,FHL2}$, $K_{dis,DMK,FRM_2,FHL2}$ – константы диссоциации комплекса FHL-2 и формата (*FHLFRM_c* и *FHL2FRM_{2,c}*), цитоплазматических протонов (*FHL2HFRM_{2,c}*, *FHL2H₂FRM_{2,c}*, *FHL2H₃FRM_{2,c}*, *FHL2H₄FRM_{2,c}*) и молекул хинона (*FHL2DMKH₄FRM_{2,c}*), соответственно; $kcat_{FHL2}$ – константа оборота FHL-2.

Переменными в уравнениях выступают концентрации веществ, обозначенных следующим образом: *FRM_c* – концентрация формата в цитоплазме, *DMK*, *DMKH2* – концентрации окисленного и восстановленного диметилменахинона в мембране, *H_{in}* – концентрация протонов в цитоплазме, *FHL2* – концентрация активной формы FHL-2.

Полная система дифференциальных уравнений модели M2 утилизации нитрита с учетом сценария 2 формирования МП (уравнения (17)–(22)) приведена в Приложении 2.

2.3. Оценка параметров

 V_{for}

Оценку параметров модифицированных моделей проводили на основании известных экспериментальных данных, как прямых, так и косвенных, по кинетике ферментативных реакций, в результате которых формируется цепь передачи электронов, по экспрессии оперонов, кодирующих структуру FHL-1 и FHL-2 ферментных комплексов, и других ферментов респираторной цепи [6, 36, 37, 43, 44, 45]. Значения параметров приведены в таблицах 1–4 (см. Приложение 3).

В моделях принято, что концентрация субъединиц фермента Fdh-H в цитоплазме клетки пропорциональна относительной активности химерного белка FdhF- β -gal [6]. Функция m_{fdhF} , описывающая экспрессию оперона fdhF в зависимости от концентрации подаваемого в хемостат нитрита, была адаптирована к этим экспериментальным данным [6], и результаты ее адаптации показаны на рис.5 синей кривой. Что касается функций m_{hyc} и m_{hyb} , то их вид был установлен на основании косвенных данных, указывающих на ингибирующее действие нитрата на активность этих оперонов [36, 37], и в предположении, что действие нитрита на активность этих оперонов аналогично нитрату. По аналогии с оперонами *nrf* и *fdhF* было предположено, что транскрипционная активность оперона *hyf* (m_{hyf}) также находится под ингибирующим

действием нитрита. Параметры функций m_{hyf} , m_{hyc} и m_{hyb} были определены в ходе адаптации полной модели к данным по стационарной концентрации нитрита в хемостате [15]. Результаты адаптации функций m_{hyf} , m_{hyc} и m_{hyb} представлены на рисунках 5,а и 5,6.



Рис. 5. (а), (б) – Зависимость активности оперонов *fdhF* (а, синяя кривая), *hyb* (а, красная кривая), *hyc* (а, зеленая кривая) и *hyf* (б), от концентрации нитрита, добавленного в хемостат, рассчитанная по моделям M1 (а) и M2 (б); (в) – зависимость скорости транспорта субъединиц периплазматических ферментов из цитоплазмы в периплазму в зависимости от величины мембранного потенциала (PMF). Точки – экспериментальные значения активности химерного белка FdhF- β -gal, измеренные в работе [6].

В моделях принято, что максимальная концентрация формата в цитоплазме может достигать значения 20 мМ, которое оценено из данных [46].

Величина мембранного потенциала определяет скорость секреции субъединиц периплазматических ферментов из цитоплазмы в периплазму и зависит от разности концентраций протонов в периплазме и цитоплазме. Концентрации протонов были оценены на основании данных [47], согласно которым внутри клетки поддерживается рН, близкий к оптимальному (7.8), тогда как в периплазме он определяется, в основном, рН окружающей среды. В условиях хемостата рН среды поддерживается постоянным и равным 6.5, что и определяет концентрацию протонов в периплазме (kHout), равную 3·10⁻⁴ мМ. В силу этого в условиях проточного хемостата величина мембранного потенциала зависит от скорости оттока протонов из цитоплазмы, которая определяется активностью форматгидрогенлиазного комплекса в процессе окисления формата. Экспериментальное подтверждение положительного влияния потенциала на скорость транспорта периплазматических белков (ktout) [48] определило вид функции, а значения входящих в нее констант были подобраны в процессе адаптации полной модели к экспериментальным данным. Зависимость константы транспорта от величины мембранного потенциала была определена в процессе адаптации полной модели к экспериментальным данными приведена на рис.5в. При этом величина мембранного потенциала, вычисленная по результатам расчета модели утилизации нитрита, соответствует экспериментальным данным [49].

Параметры базовой модели, описывающей молекулярно-генетические процессы утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток *E. coli* в проточном хемостате, в основном, соответствуют таковым в работе [12] и представлены в таблице 4 Приложения 3.

3. Влияние различных механизмов формирования мембранного потенциала на динамику накопления нитрита в хемостате

Результаты численного анализа динамики функционирования моделей М1 и М2 утилизации нитрита в хемостате, учитывающих молекулярно-генетические и метаболические процессы формирования мембранного потенциала с участием различных форматгидрогенлиазных комплексов, FHL-1 и FHL-2, показаны на рисунке 6.



Рис. 6. Скорость переработки нитрита культурой клеток *E. coli* в зависимости от уровня, добавленного в хемостат нитрита [мМ]. Красная сплошная линия – скорость утилизации нитрита периплазматической редуктазой $V_{form,u,Nrf}$, рассчитанной по модели М1 (а) и М2 (б), соответственно; красная пунктирная – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой, рассчитанная по модели с нерегулируемым транспортом субъединиц в периплазму; зеленая – скорость утилизации нитрита цитоплазматической NirB нитритредуктазой; голубая – общая скорость переработки нитрита. Точки – рассчитанные экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита клетками *E. coli* в хемостате [7]. Значения параметров моделей М1 и М2, использованные при расчетах, приведены в таблицах 1–4.

Из рисунка 6 следует, что независимо от сценария формирования мембранного потенциала, теоретические расчеты динамики утилизации нитрита в хемостате (синяя кривая) хорошо согласуются с экспериментально наблюдаемой кинетикой (точки), что подтверждает обоснованность и непротиворечивость ранее высказанной в работе [12] гипотезы о влиянии мембранного потенциала на скорость утилизации нитрита в области низких (~1 мМ) концентраций субстрата.

Видно, что активность Nrf редуктазы, рассчитанная по модели без учета влияния мембранного потенциала на транспорт субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму (рис. 6, красные пунктирные кривые), при 1 мМ добавленного нитрита составляет менее 50 % от наблюдаемой в эксперименте.

Таким образом, нами доказано, что включение конкретных молекулярногенетических и метаболических процессов, ведущих к формированию мембранного потенциала, в модель утилизации нитрита позволяет корректно описать экспериментальные данные по кинетике его утилизации в хемостате.

Необходимо отметить, что хотя в процессе выбора гипотетической структуры цепи переноса электронов на нитрите мы ориентировались на конкретные условия культивирования клеток в проточном хемостате с фиксированной скоростью роста, плотностью культуры и pH среды, которые несомненно влияют на активность ферментов форматгидрогенлиазных комплексов и респираторных гидрогеназ и ограничивает выбор партнеров, нам не удалось идентифицировать наиболее оптимальный сценарий формирования мембранного потенциала. Т.е., окончательный выбор того или иного механизма формирования цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите требует дополнительных экспериментальных исследований.

4. Роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической NrfA нитритредуктазы

Ранее нами было показано, что известных генетических механизмов регуляции активности ферментов метаболизирующих и транспортирующих нитрит недостаточно для описания кинетики его утилизации в проточном хемостате в области концентраций субстрата 0-1 мМ [10]. Анализ различных источников дополнительной нитритутилизирующей активности показал, что в данной области концентраций нитрита значимой активностью обладает только Nrf нитритредуктаза, активность которой, как периплазматического фермента, могла зависеть от мембранного потенциала [11]. Это предположение основывалось на косвенных данных о том, что мембранный потенциал влияет на секрецию белков в периплазму, их сборку и правильную ориентацию в пространстве периплазмы, т.е., на формирование активной формы фермента и ее активность [50, 51], а также опирается на данные о том, что значение мембранного потенциала зависит от концентрации нитрита, причем наибольшее значение потенциала наблюдается в области 0.1-1 мМ нитрита, которое снижается при концентрации нитрита более 1 мМ [49]. В ходе моделирования мы проверили это предположение и проанализировали влияние мембранного потенциала как на каталитические свойства фермента, так и скорость секреции субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму. Расчеты показали, что для корректного описания экспериментальных данных по кинетике утилизации нитрита в условиях культивирования клеток E. coli в хемостате достаточно локального изменения концентрации субъединиц фермента при переходе из цитоплазмы в периплазму [11, 12].

Таким образом, стало ясно, что мембранный потенциал может быть частью механизма регуляции активности Nrf нитритредуктазы в периплазме и реализации ее функции как респираторного фермента в условиях анаэробного дыхания на нитрите. Однако для получения более веских теоретических обоснований этого предположения необходимо было продемонстрировать корректное действие мембранного потенциала на активность Nrf редуктазы и кинетику утилизации нитрита в хемостате, формируемого в результате конкретных молекулярно-генетических и метаболических процессов. Т.е., необходимо было провести реконструкцию молекулярных механизмов формирования мембранного потенциала и оценить их действие в рамках конкретных моделей.

Мы проанализировали молекулярно-генетические механизмы формирования цепи передачи электронов в клетке *E. coli* и обнаружили, что в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста на нитрите отсутствует активность Fdh-N форматдегидрогеназы – основного фермента переработки формата в респираторных условиях [6], т.е., отсутствует экспериментально доказанный путь передачи электронов от формата к нитриту.

Ряд экспериментальных данных [6, 8, 13, 14, 16, 17] позволил нам предположить, что в условиях, близких к экспериментам Ванга и коллег [15] по культивированию культуры бактерий в хемостате на нитрите, в формировании протонного градиента может участвовать Fdh-H форматдегидрогеназа, активные сайты которой расположены в цитоплазме. В связи с предполагаемой ролью Fdh-H фермента в формировании дыхательной цепи, были рассмотрены два альтернативных сценария возможных механизмов передачи электронов от формата к нитриту с участием этого фермента и промежуточных посредников. Согласно этим сценариям были разработаны модели молекулярно-генетических процессов, ведущих к формированию респираторной цепи на нитрите, которые были интегрированы с ранее разработанной моделью утилизации нитрита в условиях хемостата [12]. Анализ динамики функционирования этой расширенной модели однозначно показал необходимость учета мембранного потенциала для корректного описания экспериментальных данных [7], однако он не позволил сделать каких-либо выводов относительно механизмов его формирования в условиях анаэробного дыхания клеток *E. coli* на нитрите. Необходимо признать, что для решения этого вопроса нужны дополнительные экспериментальные исследования.

Что касается условий реализации данного механизма регуляции активности респираторной Nrf редуктазы *E. coli*, ограниченных областью концентраций нитрита 0–2 мM, то вероятнее всего он реализуется в естественной среде обитания бактерий в составе микробиоты кишечника млекопитающих, включая и человека. Подобное предположение следует из данных работы [52], в которой показано, что уровень нитрата в кишечнике мышей достигает 2–3 мМ. При его восстановлении приходит накопление нитрита и активации респираторной системы утилизации нитрита. При концентрации нитрата 2–3 мM, согласно данным [15], в среде накапливается 1–2 мМ нитрита.

В то же время, концентрация нитрата 2–3 мМ – это оптимальная концентрация NO₃ для активации экспрессии оперона, кодирующего Nap нитратредуктазу [15], и переработки нитрата в естественных условиях обитания *E. coli* именно этим ферментом, периплазматическим, но не обладающим, согласно предположению [53], протон-транслоцирующей активностью. Его локальная активность в периплазме также зависит от механизмов его секреции из цитоплазмы в периплазму.

У NrfA редуктазы *E. coli* эти механизмы связаны с наличием в ее структуре трансмембранных последовательностей, узнаваемых белками-транспортерами системы Tat [51]. Эти последовательности широко распространены. Они встречаются у многих видов бактерий и даже в хлоропластах [54], бактериальное происхождение которых в настоящее время доказано [55, 56].

Мы не исключаем, что мембранный потенциал может быть составной частью механизма регуляции активности не только респираторной Nrf нитритредуктазы, но и более широкого спектра белков, активность которых зависит от их локализации в периплазме.

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту № 0324-2018-0017 и при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-01-00237а).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Полная система уравнений модели М1, описывающей процессы утилизации нитрита в хемостате с учетом механизмов формирования мембранного потенциала по сценарию 1:

$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} &= k_{flow} \cdot (s - u) + C \cdot \begin{bmatrix} k_{du,NrfA_2B_2u} \cdot (NrfA_2B_2 \cdot u - K_{du,NrfA_2B_3u}^{-1} \cdot u) + k_{du,NirC_3} \cdot (NirC_5 - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot u) \\ + k_{cau,NirCout} \cdot NirC_5u + k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5 \cdot w) + \\ + k_{du,NirE_2Dv} \cdot (NirB_2Dv - K_{i,NirB_2Dv}^{-1} \cdot NirB_2D \cdot w) - k_{flow} \cdot w, \\ \frac{dNirC}{dt} &= k_{SNr} \cdot m_{Nr}(u) + 5 \cdot k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5 - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5) - (k_{d,NirC_3v} \cdot NirC_5) \\ - (k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5u - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v - 5 \cdot k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5 - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5) - \\ - k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5u - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v - 5 \cdot k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5 - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5 \cdot w) - \\ - (k_{d,NirC_3v} \cdot (NirC_5u - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v - 1) - k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v) - \\ - (k_{d,NirC_3v} \cdot (NirC_5u - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v - 1) - k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v) - \\ - (k_{d,NirC_3v} \cdot (NirC_5u - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v - 1) - (k_{cut,NirC_0u} + k_{flow}) \cdot NirC_5v) - \\ - (k_{d,NirC_3v} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5v) - (k_{cut,NirCout} + k_{flow}) \cdot NirC_5v) \\ - (k_{dNirB_2} - k_{du,NirC_3v} \cdot (NirC_5v - K_{du,NirC_3v}^{-1} \cdot NirC_5 \cdot v) - (k_{cut,NirCout} + k_{flow}) \cdot NirC_5v), \\ \frac{dNirB}{dt} = k_{SNr} \cdot m_{Nir}(u) + 2 \cdot k_{du,NirB_2} \cdot (NirB_2 - K_{du,NirB_2}^{-1} \cdot NirB_2) - (k_{d,NirB_1} + k_{flow}) \cdot NirD_5v), \\ \frac{dNirB_2}{dt} = k_{du,NirB_2} \cdot (NirB_2 - K_{du,NirB_2}^{-1} \cdot NirB_2) \cdot (NirB_2 - K_{du,NirB_2}^{-1} \cdot NirB_2) - (k_{du,NirB_2} \cdot NirD_1) - (k_{d,NirB_2} \cdot NirD_1) - (k_{d,NirB_2} + k_{flow}) \cdot NirD_2 + k_{du,NirB_2} \cdot NirD_2) - (k_{d,NirB_2} \cdot NirB_2) \cdot NirB_2 - NirD_1) - \\ - (k_{d,NirB_2} - (NirB_2D - K_{du,NirB_2}^{-1} \cdot NirB_2) \cdot NirB_2D_1 + k_{du,NirB_2} \cdot NirB_2D_$$

Продолжение системы уравнений модели М1.

$$\begin{aligned} \frac{dNrfA_c}{dt} &= ks_{Nrf} \cdot m_{Nrf}(u) - \left(kt_{out}(PMF) \cdot NrfA_c - kt_m \cdot NrfA\right) - \left(k_{d,NrfA_c} + k_{flow}\right) \cdot NrfA_c, \\ \frac{dNrfB_c}{dt} &= ks_{Nrf} \cdot m_{Nrf}(u) - \left(kt_{out}(PMF) \cdot NrfB_c - kt_m \cdot NrfB\right) - \left(k_{d,NrfB_c} + k_{flow}\right) \cdot NrfB_c, \\ \frac{dNrfA}{dt} &= k_{peripl} \cdot \left(kt_{out}(PMF) \cdot NrfA_c - kt_m \cdot NrfA\right) + k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfAB - \frac{NrfA \cdot NrfB}{K_{dis,NrfAB}}\right) - \\ - \left(k_{d,NrfA} + k_{flow}\right) \cdot NrfA, \\ \frac{dNrfB_c}{dt} &= k_{peripl} \cdot \left(kt_{out}(PMF) \cdot NrfB_c - kt_m \cdot NrfB\right) + k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} + NrfA \cdot NrfB\right) - \\ - \left(k_{d,NrfA} + k_{flow}\right) \cdot NrfA, \\ \frac{dNrfB}{dt} &= k_{peripl} \cdot \left(kt_{out}(PMF) \cdot NrfB_c - kt_m \cdot NrfB\right) + k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} + NrfA \cdot NrfB\right) - \\ - \left(k_{d,NrfB} + k_{flow}\right) \cdot NrfB, \\ \frac{dNrfAB}{dt} &= 2k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfAB}^{-1} + \left(NrfAB\right)^2\right) - k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} + NrfA \cdot NrfB\right) - \\ - \left(k_{d,NrfB} + k_{flow}\right) \cdot NrfAB, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= k_{dis,NrfAB} \cdot \left(NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfAB}^{-1} + \left(NrfAB\right)^2\right) + k_{cot,NrfAB} + k_{flow} \cdot NrfA \cdot NrfB - \\ - \left(k_{d,NrfAB} + k_{flow}\right) \cdot (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfAB}^{-1} + NrfA_2B_2 \cdot u) - (k_{d,NrfAB} + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= k_{dis,NrfAB} + K_{flow} \cdot (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfAB}^{-1} + NrfA_2B_2 \cdot u) - (k_{d,NrfAB} + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2u}{dt} &= k_{dis,NrfAB} + K_{flow} \cdot (NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfAB}^{-1} + K_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2u}{dt} &= k_{dis,NrfA} + Nrf - V_{porm,DMK,H,s,Nrf} - (k_{d,NrfHu} + k_{flow}) \cdot NrfHu, \\ \frac{dNrfDMKHu}{dt} &= V_{porm,M,H,H,s,Nrf} - V_{porm,DMK,H,s,Nrf} - (k_{d,NrfHu} + k_{flow}) \cdot NrfHu, \\ \frac{dH_{if}}{dt} &= ks_{H_{in}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{oup} - V_{porm,Hod_2H_2,DMK,H_2}, \\ \frac{dDMKH2}{dt} &= ks_{DMKH2} - V_{uid,Nrf} - k_{flow} \cdot MMK, \\ \frac{dDMKH2}{dt} &= ks_{DMKH2} - V_{uid,Nrf} - k_{flow} \cdot MMK, \\ \frac{dDMKH2}{dt} &= ks_{Mi} - N_{uid,Nrf} - V_{uid,Nrf} - k_{flow} \cdot MMK + NO2,Nrf - k_{flow} \cdot DMKH2, \\ \frac{dDMKH2}{dt} &= ks_{Mi} + N_{uid} + N_{uid} + N_{uid} +$$

Продолжение системы уравнений модели М1.

$$\begin{cases} \frac{dFdhF_{c}}{dt} = ks_{FdhF} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FdhF_{c}, \\ \frac{dHyd_{3,c}}{dt} = ks_{hyc} \cdot m_{hyc} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{3,c}, \\ \frac{dFHL1_{c}}{dt} = V_{form,FHL1} - V_{form,FHL1} + V_{udl,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1_{c}, \\ \frac{dFHL1FRM_{c}}{dt} = V_{form,FHL1} - V_{form,HL1} - V_{form,H,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1FRM_{c}, \\ \frac{dFHL1HFRM_{c}}{dt} = V_{form,FHL1} - V_{form,H,FRM,FHL1} - V_{udl,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1FRM_{c}, \\ \frac{dHyd_{2,c}}{dt} = ks_{hyd} \cdot m_{hyd} - (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_{2}) - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2,c}, \\ \frac{dHyd_{2}}{dt} = -k_{peripl} \cdot (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_{2}) - V_{form,Hyd_{2}} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}, \\ \frac{dHyd_{2,cmp}}{dt} = V_{form,Hyd_{2}} - V_{form,Hyd_{2}H_{2}} + V_{util,Hyd_{2}} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}, \\ \frac{dHyd_{2,cmp}}{dt} = V_{form,Hyd_{2}H_{2}} - V_{form,Hyd_{2}H_{2}} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}, \\ \frac{dHyd_{2}H_{2}DMKK}{dt} = V_{form,Hyd_{2}H_{2},DMK} - V_{form,Hyd_{2}H_{2},DMK,H} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH, \\ \frac{dHyd_{2}H_{2}DMKH_{2}}{dt} = V_{form,Hyd_{2}H_{2},DMK,H} - V_{form,Hyd_{2}H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH, \\ \frac{dHyd_{2}H_{2}DMKH_{2}}{dt} = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H} - V_{form,Hyd_{2}H_{2},DMK,H_{2}} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH, \\ \frac{dHyd_{2}H_{2}DMKH_{2}}{dt} = V_{form,Hyd_{2},H_{2},DMK,H_{2}} - V_{udi,Hyd_{2}} - k_{flow} \cdot Hyd_{2}H_{2}DMKH_{2}. \end{cases}$$

Здесь и в модели M2, приведенной в Приложении 2, *и* – концентрация нитрита в внеклеточном объеме хемостата, *w* – концентрация нитрита в цитоплазме клетки. Остальные переменные описаны в основном тексте статьи.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Полная система уравнений модели M2, описывающей процессы утилизации нитрита в хемостате с учетом механизмов формирования мембранного потенциала по сценарию 2:

,

$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} &= k_{\beta_{nw}} \cdot (s - u) + C \cdot \left[k_{du,N\sigma_{0},B_{w}}^{-1} \left(NrfA_{2}B_{2} \cdot u - K_{du,N\sigma_{0},B_{2},B_{w}}^{-1} \cdot u \right) + k_{du,N\sigma_{0},1} \cdot \left(NirC_{5} - K_{du,N\sigma_{0},w}^{-1} \cdot u \right) + k_{du,N\sigma_{0},1} \cdot \left(NirC_{5} - K_{du,N\sigma_{0},w}^{-1} \cdot u \right) + k_{du,N\sigma_{0},1} \cdot \left(NirC_{5} - K_{du,N\sigma_{0},w}^{-1} \cdot NirC_{5} \cdot w \right) + k_{du,N\sigma_{0},w} \cdot \left(NirC_{5} - K_{du,N\sigma_{0},w}^{-1} \cdot NirC_{5} \cdot w \right) + k_{du,N\sigma_{0},w} \cdot \left(NirC_{5} - K_{du,N\sigma_{0},w}^{-1} \cdot NirC_{5} \cdot w \right) + k_{du,N\sigma_{0},w} \cdot NirC_{5} - \left(k_{d,N\sigma_{0},w} \cdot NirC_{5} - \left(k_{d,N\sigma_{0},w} \cdot NirC_{5} \right) - \left(k_{d,N\sigma_{0},w} \cdot NirC_{5} \cdot w \right) - \left(k_{d,N\sigma_{0},w} \cdot NirD_{5} \cdot NirD_{5} - \left(k_{d,N\sigma_{$$

Продолжение системы уравнений модели М2 см. на следующей странице.

260

$$\begin{cases} \frac{dNrfB}{dt} = k_{paray} \cdot (kl_{aux}(PMF) \cdot NrfB_{z} - kl_{au} \cdot NrfB) + k_{div,NrfA} \cdot (NrfAB - K_{div,NrfA}^{-1} \cdot NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) \cdot NrfA \cdot NrfB, \\ \frac{dNrfAB}{dt} = 2k_{div,NrfA} \cdot (NrfAB_{z} - K_{div,NrfA}^{-1} \cdot (NrfAB)^{2}) - k_{div,NrfA} \cdot (NrfAB - K_{div,NrfA}^{-1} \cdot NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) \cdot NrfAB, \\ \frac{dNrfAB}{dt} = 2k_{div,NrfAB} \cdot (NrfAB_{z} - K_{div,NrfAB}^{-1} \cdot (NrfAB)^{2}) + k_{div,NrfAB} \cdot (NrfAB - K_{div,NrfA}^{-1} \cdot NrfA - NrfB) - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) \cdot NrfAB, \\ \frac{dNrfAB_{z}}{dt} = k_{div,NrfAB} \cdot (NrfAB_{z} - K_{div,NrfAB}^{-1} \cdot (NrfAB)^{2}) + k_{div,NrfAB} \cdot NrfA_{z} - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) \cdot NrfA_{z} - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) \cdot NrfA_{z} - k_{hirNrfAB} \cdot (NrfAB_{z} - K_{div,NrfAB}^{-1} \cdot NrfA_{z} - k_{flow}) \cdot NrfA_{z} - k_{hirNrfAB} \cdot NrfA_{z} - K_{div,NrfAB} \cdot NrfA_{z} - k_{flow} \cdot NrfA_{z} - k_{flow$$

РИ и др.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Таблица 1. Список значений параметров, общих для моделей формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 и FHL-2 комплексов (уравнения (1)–(16))

Обозначение параметра	Название	Значение [ед. измер.] ^а	№ уравн. ^б	Ссылка
k _{Nrf,H,u,Nrf}	константа распада комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , NO ₂ и протонов	10 cek^{-1}		
$K_{dis,H,u,Nrf}$	константа диссоциации комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , нитрита и протонов	4·10 ⁻⁶ мМ		
k _{DMKH2,H,u,Nrf}	константа распада комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , нитрита, протонов и менахинола	10 cek^{-1}	(16)	[*] ^B
K _{dis,DMKH2,H,u,Nrf}	константа диссоциации комплекса, состоящего из $NrfA_2B_2$, нитрита, протонов и менахинола	0.5∙мМ		
kt0 W_{kt} $K_{t,PMF}$ h_{terPME}	константы, входящие в функцию kt_{out} влияния мембранного потенциала на транспорт NrfA и NrfB в периплазму	$ \begin{array}{r} 0.1 \\ 1 \\ 34.5 \\ 25 \\ \end{array} $	(10)	
$\frac{s0_{fdhF}}{s1_{fdhF}}$ $\frac{s1_{fdhF}}{h1_{fdhF}}$ $\frac{h1_{fdhF}}{s2_{fdhF}}$ $\frac{K2_{fdhF}}{h2_{fdhF}}$	параметры, входящие в функцию m_{fdhF} , описывающую влияние нитрита на уровень экспрессии мономера Fdh-H	0.55 1 0.05 MM 3.5 0.69 0.34 MM 7.5	(4)	[6]
$\frac{kO_{atp}}{W_{atp}}$ $K_{atp,PMF}$ $h_{atp,PMF}$	параметры, описывающие влияние мембранного потенциала на скорость синтеза АТФ (k_{atp})	0.004 4.7 37 20	(13)	[*] ^B
<i>kcat_{ATPase}</i>	каталитическая константа АТФ-синтазы	300 сек ⁻¹	(12)	[44]
K _{M,ATPase} ATPase	константа михаэлиса АтФ-синтазы для протонов концентрация АТФ-синтазных комплексов в клетке	1·10 ⁻⁵ мМ 3.3·10 ⁻³ мМ 3 16·10 ⁻⁴	(12)	[*] ^B
k _{H_{out}}	концентрация протонов в периплазме	мМ		
ks _{0,FRM}	константа синтеза формата в ходе гликолиза	1.3534 мМ	(1)	[*] ^в
$W_{i,NO2,FRM} \ K_{u,FRM} \ h_{u,FRM}$	параметры, входящие в функцию ks _{FRM} , описывающую ингибирование синтеза формата нитритом	0.64 2.3 мМ 7	(1)	[34]
k _{d,c}	константа деградации белков и белковых комплексов в цитоплазме	9.6·10 ⁻⁵ сек ⁻¹	(3), (7), (19)	[*] ^B
k _{d,prp}	константа деградации белков и белковых комплексов в периплазме	9.6·10 ⁻⁶ сек ⁻¹	(7), (15)	

^а мМ (миллимоль/литр), сек (секунда), если размерность не указана, то величина является безразмерной;

⁶ соответствует нумерации формул в основном тексте статьи;

^в значение параметра подобрано в результате численных экспериментов.

Таблица 2. Список значений параметров для модели формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 комплекса (сценарий 1)

Обозн. параметра	Название	Значение [ед. измер.] ^а	№ уравн. ^б	Ссылка
ks _{hyc}	константа синтеза мономеров, входящих в состав гидрогеназы Hyd3	2.5·10 ⁻⁴ мМ/сек 2.5·10 ⁻⁴	(3))	
ks _{fdhF}	константа синтеза Fdh-H мономеров	мМ/сек 1.05·10 ⁻⁴	(15)	
KS _{DMKH2}	константа синтеза хинола	мМ/сек	(15)	[*] ^B
ks _{Hin}	базовая скорость наработки протонов в периплазме	0.15 мМ/сек	(11)	
k _{FHL1}	константа распада комплекса FHL-1	$10 \mathrm{cek}^{-1}$		
K _{dis,FHL1} k _{FRM,FHL1}	константа диссоциации комплекса FHL-1 константа распада комплекса, состоящего из FHL-1 и формата	10 cek^{-1}		
K _{dis,FRM,FHL1}	константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-1 и формата	12.2 мМ	(6)	[43]
k _{H,FRM,FHL1}	константа распада комплекса, состоящего из FHL-1, формата и протонов	10 cek^{-1}		[*] ^B
$K_{dis,H,FRM,FH}$	константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-1, формата и протонов	1·10 ⁻⁵ мМ		[']
$k_{cat,FHL1}$	константа оборота фермента FHL-1	2833 сек ⁻¹		[43]
ks _{hyd}	константа синтеза мономеров, входящих в состав Hyd-2 комплекса	0.237 мМ/сек	(7)	
k _{Hyd2}	константа распада комплекса Hyd-2 на мономеры	10 cek^{-1}		[*] ^B
K_{dis,Hyd_2}	равновесная константа диссоциации комплекса Hyd-2	0.05 мМ		ĹĴ
k_{Hyd_2, H_2}	константа распада комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода	10 cek^{-1}		
K_{dis,Hyd_2,H_2}	константа диссоциации комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода	2·10 ⁻³ мМ		[57]
$k_{Hyd_2, H_2, DMK}$	константа распада комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода и хинона	10 cek^{-1}	(9)	
K _{dis,Hyd2} , H ₂ ,DMK	константа диссоциации комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода и хинона	0.1 мМ		$[*]^{B}$
K _{dis,Hyd2} , H ₂ ,DMK,H	константа диссоциации комплекса, состоящего из Hyd-2 и протонов и хинона	10 ⁻⁵ мМ		
$kcat_{Hyd_2}$	константа оборота фермента Hyd-2	1314 cek^{-1}		[45]
$k_{\mathrm{H}_{2},out}$	константа диффузии водорода из периплазмы в окружающую среду	1 cek^{-1}	(14)	
s0 _{hyc}		0.1		
s1 _{hyc}	параметры, входящие в функцию m_{hyc} ,	1.05		
$K1_{hyc}$	описывающую влияние нитрита на уровень	0.1 MM	(5)	
$\frac{n T_{hyc}}{s 2_{hyc}}$	экспрессии мономеров, входящих в	0.088	(5)	[*] ^B
$K2_{hyc}$	комплекс гидрогеназы 3	0.88 мМ		
h2 _{hyc}		15		
sO_{hyd}	параметры, входящие в функцию $m_{h, J}$,	0.218		
SI _{hyd}	описывающую влияние нитрита на уровень	1 47 M	(8)	
h1 _{hyd}	экспрессии мономеров гидрогеназы Hyd-2	5.2		

^а, ^б, ^в см. в таблице 1 Приложения 3.

Обозначение параметра	Название	Значение [ед. измер.] ^а	№ уравн. ^б	Ссылка
ks _{hyc}	константа синтеза субъединиц,	1.69 мМ/сек		
ks _{fdhF}	константа синтеза Fdh-H мономеров	1.69 мМ/сек	(3)	
ks _{DMKH2}	константа синтеза хинола	5·10 ⁻⁵ мМ/сек		
ks _{Hin}	базовая скорость наработки протонов в периплазме	1.2 мМ/сек	(11)	[*] ^B
k_{FHL2}	константа распада комплекса FHL-2	10 сек ⁻¹		
K _{dis,FHL2}	константа диссоциации комплекса FHL-2	0.5 мМ	(21)	
k _{FRM, FHL2}	константа распада комплекса, состоящего из FHL-2 и формата	10 cek^{-1}		
$K_{dis,FRM,FHL2}$	константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2 и формата	12.2 мМ		[43]
k _{FRM2} ,H,FHL2	константа распада комплекса, состоящего из FHL-2, формата и протонов	10 cek^{-1}		
$K_{dis,FRM_2,H,FHL2}$	константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2, формата и протонов	5·10 ⁻⁵ мМ	(22)	[*] ^B
k _{dmk, frm₂,h,fhl2}	константа распада комплекса, состоящего из FHL-2, формата, протонов и хинона	10 cek^{-1}		
$K_{dis,DMK,\ FRM_2,H_4,FHL2}$	константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2, формата, протонов и хинона	5·10 ⁻³ мМ		
kcat _{FHL2}	константа оборота фермента FHL-2	2833 сек ⁻¹		[43]
s0 _{hyf}	параметры, входящие в функцию	1		
s1 _{hvf}	<i>m</i> _{hyd} , описывающую влияние	0.003	(20)	гчэВ
K1 _{hyf}	нитрита на уровень экспрессии	0.65 мМ		[*]
$h1_{hyf}$	мономеров гидрогеназы 4	3.5		

Таблица 3. Список значений параметров для модели формирования мембранного потенциала с участием FHL-2 комплекса (сценарий 2)

^а, ^б, ^в см. в таблице 1 Приложения 3.

Таблица 4. Список значений параметров базовой модели утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток *E. coli*.

Обозначение	Истранис	Значение	Course
параметра	пазвание	[ед. измер.] ^а	Ссылка
S	добавленная концентрация нитрита в хемостат	0-8 мМ	[12]
k_{flow}	константа скорости протока в хемостате	$1.65 \cdot 10^{-4} \mathrm{cek}^{-1}$	
$\delta_{\mathit{nrf},1}$		60	
$K_{nrf, 1}$	параметры обобщенной функции mnrf,	0.36 мМ	
$h_{nrf,1}$	описывающей зависимость активности nrf оперона	1.3	[12]
$\delta_{nrf,2}$	от концентрации нитрита установившейся в	0.16	
$K_{nrf,2}$	хемостате	1.7 мМ	
$h_{nrf,2}$		3	
$ks_{Nrf,A_c} = ks_{Nrf,B_c}$	максимальная удельная скорость синтеза белков NrfA и NrfB	3.6.10 ° мМ/сек	[*] ^B
ks _{NirC}	максимальная удельная скорость синтеза NirC мономеров	3.5·10 ⁻⁵ мМ/сек	LJ
ks _{NirB} =ks _{NirD}	максимальная концентрация белка NirB и NirD в клетке	=ks _{NirC} /5	
k _{dis,NrfAB}	константа диссоциации димера NrfAB на субъединицы	10 ⁵ сек ⁻¹	[12]
K _{dis.NrfAB}	равновесная константа диссоциации димера NrfAB	0.00004 мМ	1
$k_{dis,NrfA_2B_2}$	константа диссоциации димера NrfA ₂ B ₂ на димеры	10 ⁵ сек ⁻¹	1
K _{dis,Nrf A₂B₂}	равновестная константа диссоциации тетрамера NrfA ₂ B ₂	0.004 мМ	
δ_{peripl}	константа отношения объема цитоплазмы к периплазме	6	
$k_{d,NrfA_c} = k_{d,NrfB_c}$	константа скорости деградации мономеров NrfA и В в цитоплазме	$9.6 \cdot 10^{-5} \mathrm{cek}^{-1}$	
$k_{d,NrfA=}k_{d,NrfB} = k_{d,NrfA_2B_2}$	константа скорости деградации мономеров NrfA и B, NrfAB и NrfA $_2B_2$ в периплазме	$9.6 \cdot 10^{-6} \mathrm{cek}^{-1}$	
$k_{cat,NrfA_2B_2u}$	константа скорости оборота нитритредуктазы NrfA	700 сек ⁻¹	
$K_{dis,NrfA_2B_2u}$	константа Михаэлиса редуктазы NrfA для нитрита	0.03 мМ	
$K_{dis,NirB_2}$	равновесная константа диссоциации реакции формирования NirB ₂	0.002 мМ`	[12]
$K_{dis,NirB_2D}$	равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера NirB ₂ D	0.002 мМ	[12]
$K_{cat,NirB_2Dw}$	константа скорости каталитического оборота фермента NirB	1100 сек ⁻¹	
$K_{dis,NirB_2Dw}$	константа диссициации комплекса нитрита с ферментом NirB	0.006 мМ	
$k_{d,NirC}$	Скорость деградации NirC	0.0011 cek ⁻¹	
$k_{d,NirC_5}$	скорость деградации NirC ₅	0.00011 cek^{-1}	
k _{d.NirB}	скорость деградации NirB	0.00011 cek ⁻¹	1
k _{d.NirD}	скорость деградации NirD	0.00011 cek ⁻¹	1
k _{d,NirB}	скорость деградации NirD	0.00011 cek ⁻¹	1
k _{d.NirBa} D	скорость легралации NirB ₂ D	0.000011 cer ⁻¹	
$K_{dis,NirC_5u} = K_{M,Nir}$	константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в	0.5 мМ	
Cin	клетку белком NirC		
k _{cat,NirCout}	каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	800 cek^{-1}	[*] ^B
k _{cat,NirCin}	каталитическая константа скорости импорта нитрита из клетки белком NirC	100 cek^{-1}	
$K_{dis,NirC_5^w}$	константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	0.5 мМ	
С	относительный объем клеточной массы в хемостате	0.0003	[12]

^а, ^в см. в таблице 1 Приложения 3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simon J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002. V. 26. № 3. P. 285–309.

РИ и др.

- Simon J., Klotz M.G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1827. № 2. P. 114–135. doi: 10.1016/j.bbabio.2012.07.005
- 3. Page L., Griffiths L., Cole J.A. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria. *Arch. Microbiol.* 1990. V. 154. № 4. P. 349–354.
- 4. Cole J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 136. № 1. P. 1–11.
- 5. Abaibou H., Pommier J., Benoit S., Giordano G., Mandrand-Berthelot M.A. Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. J. Bacteriol. 1995. V. 177. № 24. P. 7141–7149.
- 6. Wang H., Gunsalus R.P. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP. J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 17. P. 5076–5085.
- 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.
- 8. Darwin A., Tormay P, Page L, Griffiths L, Cole J. Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12. *J. Gen Microbiol.* 1993. V. 139. № 8. P. 1829–1840.
- 9. 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.
- 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. *Математическая биология и биоинформатика*. 2013. Т. 8. № 1. С. 276–294. doi: 10.17537/2013.8.276
- 11. Ри Н.А., Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста. *Математическая биология и биоинформатика*. 2015. Т. 10. № 1. С. 193–205. doi: <u>10.17537/2015.10.193</u>
- Khlebodarova T.M., Ree N.A., Likhoshvai V.A. On the control mechanisms of the nitrite level in Escherichia coli cells: the mathematical model. *BMC Microbiol*. 2016. V. 16. Suppl 1. Article No 7. doi: 10.1186/s12866-015-0619-x
- Hakobyan M., Sargsyan H., Bagramyan K. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli*. *Biophys. Chem.* 2005. V. 115. P. 55–61.
- 14. Andrews S.C., Berks B.C., McClay J., Ambler A., Quail M.A., Golby P. Guest J.R.A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate-hydrogenlyase system. *Microbiology*. 1997. V. 143. P. 3633–3647.
- 15. 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. № 17. P. 5303–5308.
- McDowall J.S., Murphy B.J., Haumann M., Palmer T., Armstrong F.A., Sargent F. Bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 38. P. 3948–3956.
- Sargent F. The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli*. Adv. Microb. Physiol. 2016. V. 68. P. 433–507. doi: <u>10.1073/pnas.1407927111</u>

- 18. Noguchi K., Riggins D.P., Eldahan K.C., Kitko R.D., Slonczewski J.L. Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2010. V. 5. № 4. Article No e10132. doi: 10.1371/journal.pone.0010132
- 19. Rossmann R., Sawers G., Böck A. Mechanism of regulation of the formatehydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol.* 1991. V. 5. № 11. P. 2807–2814.
- 20. Tseng C.P., Hansen A.K., Cotter P., Gunsalus R.P. Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons *frdABCD*, *dmsABC*, and *narGHJI* of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 21. P. 6599–6605.
- Pinske C., Jaroschinsky M., Linek S., Kelly C.L., Sargent F., Sawers R.G. Physiology and bioenergetics of [NiFe]-hydrogenase 2-catalyzed H2-consuming and H2-producing reactions in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2015. V. 197. № 2. P. 296–306. doi: <u>10.1128/JB.02335-14</u>
- 22. Ballantine S.P., Boxer D.H. Isolation and characterization of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli. Eur. J. Biochem.* 1986. V. 156. № 2. P. 277–284.
- Francis K., Patel P., Wendt J.C., Shanmugam K.T. Purification and characterization of two forms of hydrogenase isoenzyme 1 from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 10. P. 5750–5757.
- Lukey M.J., Parkin A., Roessler M.M., Murphy B.J., Harmer J., Palmer T., Sargent F., Armstrong F.A. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 6. P. 3928–2938. doi: <u>10.1074/jbc.M109.067751</u>
- 25. Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A. H2 consumption by *Escherichia coli* coupled via hydrogenase 1 or hydrogenase 2 to different terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 202. № 1. P. 121–124.
- 26. Efremov R.G., Sazanov L.A. The coupling mechanism of respiratory complex I a structural and evolutionary perspective. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1817. № 10. P. 1785–1795. doi: 10.1016/j.bbabio.2012.02.015
- 27. Gwyer J.D., Richardson D.J., Butt J.N. Inhibiting *Escherichia coli* cytochrome c nitrite reductase: voltammetry reveals an enzyme equipped for action despite the chemical challenges it may face *in vivo*. *Biochem. Soc. Trans.* 2006. Pt. 1. P. 133–135.
- 28. Pinske C., Sargent F. Exploring the directionality of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase: a membrane-bound enzyme capable of fixing carbon dioxide to organic acid. *Microbiologyopen*. 2016. V. 5. № 5. P. 721–737. doi: 10.1002/mbo3.365
- Skibinski D.A., Golby P., Chang Y.S., Sargent F., Hoffman R., Harper R., Guest J.R., Attwood M.M., Berks B.C., Andrews S.C. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhIA and HyfR. *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 23. P. 6642–6653.
- 30. Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F0F1-ATPase, in H2 production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. *FEBS Lett.* 2002. V. 516. № 1–3. P. 172–178.
- 31. Mnatsakanyan N., Bagramyan K., Trchounian A. Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell. Biochem. Biophys.* 2004. V. 41. № 3. P. 357–366.
- 32. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized Hill function method for modeling molecular processes. J. Bioinform. Comput. Biol. 2007. P. 521–531.
- 33. Sawers R.G. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 2005. V. 33. P. 42–46.

- 34. Kaiser M., Sawers G. Nitrate repression of the *Escherichia coli pfl* operon is mediated by the dual sensors NarQ and NarX and the dual regulators NarL and NarP. J. *Bacteriol.* 1995. V. 177. № 13. P. 3647–3655.
- 35. Sawers R. G. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1994. V. 66. P. 57–88.
- 36. Hopper S., Babst M., Schlensog V., Fischer H.M., Hennecke H., Böck A. Regulated expression *in vitro* of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 30. P. 19597–19604.
- Richard D.J., Sawers G., Sargent F., McWalter L., Boxer D.H. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe]hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli. Microbiology*. 1999. V. 145. P. 2903– 2912.
- 38. Kasimoglu E., Park S.J., Malek J., Tseng C.P., Gunsalus R.P. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atp1BEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 19. P. 5563–5567.
- Wiedenmann A., Dimroth P., von Ballmoos C. Deltapsi and DeltapH are equivalent driving forces for proton transport through isolated F(0) complexes of ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1777. № 10. P. 1301–1310. doi: 10.1016/j.bbabio.2008.06.008
- 40. Bremer H., Dennis P.P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell at different exponential growth rates. *EcoSal. Plus.* 2008. V. 3. № 1. doi: 10.1128/ecosal.5.2.3
- 41. Unden G., Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1320. № 3. P. 217–234.
- 42. Outten C.E., O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*. 2001. V. 292. № 5526. P. 2488–2492.
- 43. Axley M.J., Grahame D.A. Kinetics for formate dehydrogenase of *Escherichia coli* formate-hydrogenlyase. J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 21. P. 13731–13736.
- 44. Etzold C., Deckers-Hebestreit G., Altendorf K. Turnover number of *Escherichia coli* F0F1 ATP synthase for ATP synthesis in membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 243. № 1–2. P. 336–343.
- 45. Maeda T., Sanchez-Torres V., Wood T.K. *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. № 5. P. 1035–1042.
- 46. Leonhartsberger S., Korsa I., Böck A. The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 4. № 3. P. 269–276.
- 47. Wilks J.C., Slonczewski J.L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 15. P. 5601–5607.
- 48. Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Müller M., Wu L.F. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 19. P. 13223–13228.
- 49. 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.
- 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.

- Price C.E., Driessen A.J.M. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1803. № 6. P. 748–766. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.019
- Jones S.A., Chowdhury F.Z., Fabich A.J., Anderson A., Schreiner D.M., House A.L., Autieri S.M., Leatham M.P., Lins J.J., Jorgensen M., Cohen P.S., Conway T. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 10. P. 4891–4899. doi: 10.1128/IAI.05395-11
- 53. Stewart V., Lu Y., Darwin A.J. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 5. P. 1314–1323.
- Aldridge C., Storm A., Cline K., Dabney-Smith C. The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport. J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 41. P. 34752–34763. doi: 10.1074/jbc.M112.385666
- 55. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*. 2004. V. 304. № 5668. P. 253–257.
- 56. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014. P. 38–48. doi: <u>10.1016/j.mib.2014.09.008</u>
- 57. Sawers R.G., Jamieson D.J., Higgins C.F., Boxer D.H. Characterization and physiological roles of membrane-bound hydrogenase isoenzymes from *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 398–404.
- 58. 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 solutionstate interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA. *Biochem J.* 2007. V. 406. P. 19–30.
- 59. Graham L.L., Harris R., Villiger W., Beveridge T.J. Freeze-substitution of gramnegative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles. *J Bacteriol*. 1991.V. 173. P. 1623–1633.
- 60. Talmadge K., Gilbert W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 1830–1833.
- 61. Kemp G.L., Clarke T.A., Marritt S.J., Lockwood C., Poock S.R., Hemmings A.M. 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.
- 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.

Рукопись поступила в редакцию 25.05.2018. Дата опубликования 30.06.2018.