

Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков

Хлебодарова Т.М.^{*1}, Когай В.В.³, Акбердин И.Р.^{1,2}, Ри Н.А.¹,
Фадеев С.И.^{2,3}, Лихошвай В.А.^{**1,2}

¹ ФГБУН Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академия наук, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия

³ ФГБУН Институт математики им. С.Л. Соболева, Сибирское отделение Российской академия наук, Новосибирск, 630090, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследования модели, описывающей утилизацию нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в проточном хемостате. Модель учитывает динамику экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру ферментов, метаболизирующих и транспортирующих нитрит. Показано, что адаптированная к экспериментальным данным модель описывает кинетику накопления нитрита в хемостате в области миллимолярных концентраций добавленного в хемостат субстрата без дополнительных предположений. В данной области, согласно модели, поддерживается постоянная внутриклеточная концентрация нитрита, не зависящая от его концентрации в ростовой среде. Для описания кинетики накопления нитрита в хемостате в области микромолярных концентраций добавленного нитрита требуется введение в модель дополнительного предположения о наличии более высокого уровня активности NrfA нитритредуктазы, чем это следует из генетических исследований.

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

ВВЕДЕНИЕ

В условиях анаэробного дыхания *E. coli* использует в цепи переноса электронов различные электронные акцепторы, в том числе и нитрит. Учитывая высокую токсичность нитрита для клетки, регуляция экспрессии генов, включенных в нитрит-ассоциированную цепь передачи электронов, тесно связана с генами нитритного метаболизма. Основными компонентами этой системы являются нитритредуктазы NrfA (EC 1.7.2.2) и NirV (EC 1.7.1.4). Эти ферменты имеют различную клеточную локализацию и метаболическую роль. NrfA нитритредуктаза связана с цитоплазматической мембраной и является респираторным ферментом. Она участвует в формировании протонного градиента и использует нитрит в качестве электронного акцептора. NirV нитритредуктаза локализована в цитоплазме и ее основной ролью, по-видимому, является детоксикация избыточного нитрита в клетке [1]. Уровень активности обеих нитритредуктаз в клетке зависит от концентрации нитрита в среде. Оба фермента метаболизируют нитрит до аммония, однако, при низких концентрациях

*tamara@bionet.nsc.ru

**likho@bionet.nsc.ru

индукторов более эффективна NrfA нитритредуктаза, при промежуточных – обе, а при высоких – исключительно NirB [2]. Механизмы, благодаря которым в условиях дыхания на нитрите достигается наиболее оптимальное для клетки сочетание активностей NrfA и NirB нитритредуктаз, обеспечиваются дифференциальной экспрессией генов, кодирующих структуру этих нитритредуктаз, и определяются транскрипционными факторами (ТФ) NarL и NarP, активное состояние которых зависит от NarX и NarQ киназ, чувствительных к присутствию в среде нитрита. Взаимодействие ТФ NarL и NarP с регуляторными областями генов *nrfA* и *nirB* и характер воздействия зависят от концентрации индуктора и специфичности связывания этих факторов с тем или иным сайтом. Так, динамика активности гена *nrfA*, в отличие от гена *nirB*, определяется наличием двух сайтов ТФ NarL в структуре его промотора – высокоаффинного и низкоаффинного. Наличие высокоаффинного сайта ТФ NarL позволяет активировать экспрессию гена *nrfA* и, следовательно, систему метаболизма нитрита при низкой концентрации индуктора. Наличие низкоаффинного сайта ТФ NarL в области ТАТА-бокса при высоких концентрациях нитрита приводит к репрессии гена *nrfA* и переключению на другую, более эффективную в плане утилизации нитрита, метаболическую систему [2].

В условиях анаэробного дыхания на нитрите важная роль принадлежит транспортной системе, благодаря которой также контролируется содержание нитрита в клетке. В настоящее время известно три транспортных белка, NarK, NarU и NirC, которые участвуют в транспорте нитрита через цитоплазматическую мембрану [3, 4], однако существенно более высокой активностью в отношении нитрита обладает белок NirC [4]. Расположение гена *nirC*, кодирующего структуру этого белка, в одном опероне с геном *nirB*, свидетельствует о тесной связи внутриклеточной системы утилизации нитрита NirB нитритредуктазой с системой его импорта и экспорта из клетки при высоких концентрациях субстрата. Сопряженный синтез NirC и NirB белков предполагает их равнозначный вклад в контроль внутриклеточного содержания нитрита, однако конкретных данных о взаимоотношении этих систем, определяющих динамику накопления и утилизации нитрита в клетке и его экспорта из клетки до сих пор нет.

Существующие качественные и количественные данные о механизмах регуляции экспрессии генов *nrfA*, *nirB* и *nirC* [2] позволили разработать математическую модель утилизации нитрита в клетке *E. coli* и исследовать роль NirB и NrfA редуктаз и транспортного белка NirC в контроле внутриклеточного содержания нитрита.

1. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli*

Схема процессов, влияющих на концентрацию нитрита в хемостате и внутри клетки, представлены на рис. 1.

Динамика накопления нитрита в хемостате в зависимости от подаваемой концентрации субстрата в условиях сбалансированного роста культуры приведена в работе [5, рис. 4].

Математическая модель, описывающая процессы (a)–(f), представлена автономной системой уравнений:

$$\begin{cases} u' = k_{flow}s + CV_{NirC,out}(u, w) - C(V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u)) - k_{flow}u, \\ w' = V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u, w) - V_{NirB}(u, w) - k_{flow}w. \end{cases} \quad (1)$$

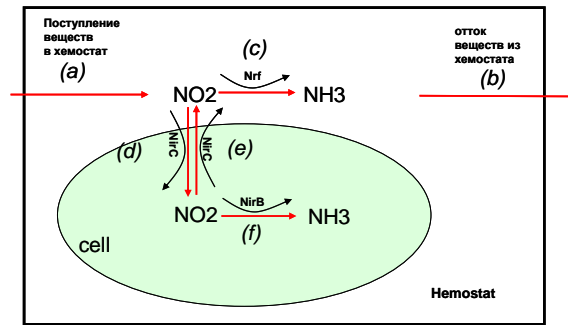


Рис. 1. Диаграмма процессов, протекающих в хемостате при утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*. (a) – поступление нитрита в хемостат с постоянной скоростью; (b) – вывод нитрита из хемостата с постоянной скоростью; (c) – переработка внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической NrfA нитритредуктазой; (d) – транспорт внеклеточного нитрита в клетку транспортным белком NirC; (e) – экспорт нитрита из клетки в хемостат NirC транспортером; (f) – утилизация внутриклеточного нитрита цитоплазматической NirB нитритредуктазой.

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 клеточной культуры в хемостате, s – концентрация нитрита, которая устанавливается в пустом хемостате (далее, добавленный нитрит), $V_{Nrf}(u)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита нитритредуктазой NrfA, $V_{nirB}(w)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита нитритредуктазой NirB, $V_{nirC,in}(u)$ – скорость импорта индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита в клетку белком транспортером NirC, $V_{nirC,out}(u, w)$ – скорость транспорта (экспорта) индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита из клетки белком NirC. В модели воспроизводятся условия культивирования клеток *E. coli* в проточном хемостате на нитрите, которые обеспечивают фиксированную уровнем потребления глюкозы постоянную скорость роста и плотность культуры [5].

Модель основывается на следующих предположениях:

1) Внеклеточный нитрит метаболизируется периплазматической формат-зависимой нитритредуктазой NrfA до аммония в соответствии со следующей стехиометрической схемой: $\text{NO}_2^- + 6e^- + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$. Кинетика этой реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен согласно имеющимся кинетическим данным [6–8].

2) Предполагается, что в физиологических условиях NrfA функционирует в составе гетеротетрамерного комплекса NrfA₂–NrfB₂ [9, 10]. В клетке *E. coli* эти белки находятся примерно в равном количестве [11]. Гены, кодирующие структуру NrfA и NrfB субъединиц фермента, находятся в одном опероне.

3) Внутриклеточный нитрит утилизируется цитоплазматической НАДН-зависимой NirB нитритредуктазой до аммония в соответствии со следующей стехиометрической формулой: $\text{NO}_2^- + 3\text{NADH} + 5\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$. Кинетика этой реакции также описывается уравнением Михаэлиса-Ментен согласно кинетическим данным [12–13]. Предполагается, что в физиологических условиях NirB нитритредуктаза функционирует в составе гетеротримерного комплекса NirB₂NirD [14]. Гены, кодирующие структуру NirB и NirD субъединиц фермента, находятся в одном опероне.

4) Транспорт нитрита в клетку осуществляется белком NirC, который, как недавно показано, обладает в отношении импорта нитрита и его последующей утилизации NirB редуктазой на порядок более высокой активностью, нежели NarU и NarK транспортеры

[4]. Что касается экспорта нитрита из клетки, то в этом процессе участвуют все три транспортера [4], однако их вклад в условиях дыхания на нитрите не определен. В модели экспорт нитрита из клетки осуществляется только NirC транспортером.

5) Поскольку ген, кодирующий структуру белка NirC, находится в одном опероне с геном *nirB*, то динамика его экспрессии в зависимости от концентрации нитрита аналогична динамике гена *nirB* [2, рис. 3]. Учитывается также, что уровень трансляции NirC белка в присутствии миллимолярных концентраций нитрита более чем в пять раз превышает таковой для NirB [14].

2. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ

Оценку параметров модели проводили на основании известных экспериментальных данных по динамике роста культуры клеток *E. coli* в глюкозо-лимитирующих условиях проточного хемостата, кинетике утилизации нитрита нитритредуктазами NrfA и NirB, а также параметров транспорта нитрита белком NirC [3–5, 8–10, 12, 15–18]. Оценка ряда неизвестных параметров приведена ниже.

2.1. Вывод скорости ферментативной реакции, катализируемой периплазматической NrfA нитритредуктазой

Для оценки скоростей утилизации нитрита клетками *E. coli* и его транспорта мы использовали экспериментальные данные работ Ванга с коллегами [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2000], в которых исследована интенсивность синтеза белков, кодируемых оперонами *nrfABCD* и *nirBDC*, в зависимости от концентрации подаваемого в хемостат нитрита [2, рис. 3, 4], и приведены данные о накоплении нитрита в хемостате в условиях сбалансированного роста культуры клеток [5, рис. 4]. На рис. 2 эти данные для *nrf* (слева) и *nir* (справа) оперонов сведены в единый график.

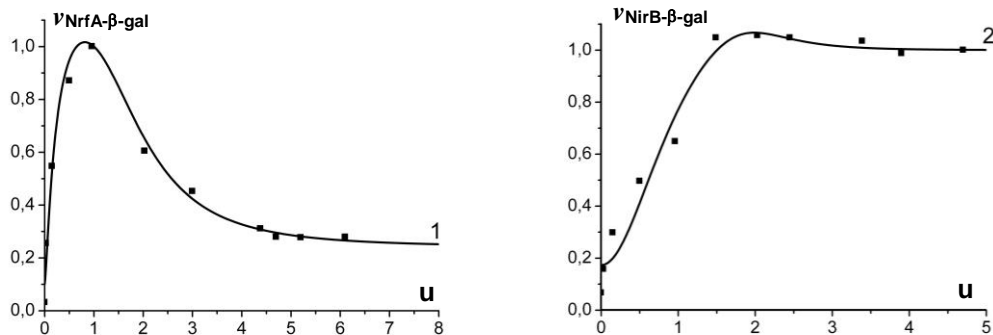


Рис. 2. Относительные активности химерных белков NrfA-β-gal (график слева) и NirB-β-gal (график справа), измеренные в работе [5] (точки), и аппроксимирующие их теоретические кривые $m_{Nrf}(u)$ (кривая 1) и $m_{Nir}(u)$ (кривая 2). Ось абсцисс – концентрация нитрита (*u*) в хемостате (мМ), ось ординат (слева) – относительная активность химерного белка NrfA-β-gal, (справа) – относительная активность химерного белка NirB-β-gal. Концентрация нитрита в хемостате, использованная в качестве шкалы измерения по оси абсцисс, вычислена на основании данных работы [5, рис. 4].

Мы предположили, что при конкретной концентрации *u* нитрита в хемостате относительное количество мономеров белков NrfA и NrfB в клетке, составляющих субъединицы фермента NrfA, пропорциональны относительной активности химерного белка NrfA-β-gal, представленной точками на левом графике рис. 2. Для представления теоретической кривой $m_{Nrf}(u)$ на левом графике рис. 2, где *u* – текущая концентрация нитрита в хемостате, мы использовали обобщенную функцию Хилла:

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

Значения параметров $m_{Nrf}(u)$ были оценены методом наименьших квадратов. Оптимальные значения представлены в табл. 1.

Концентрацию активной формы NrfA фермента оценивали, исходя из биохимической модели [9, 10].



Отсюда следует система дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{da}{dt} = \frac{db}{dt} = (k_1^-c - k_1^+ab), \\ \frac{dc}{dt} = -(k_1^-c - k_1^+ab) + 2(k_2^-d - k_2^+c^2), \\ \frac{dd}{dt} = -(k_2^-d - k_2^+c^2). \end{cases}$$

Здесь a, b – внутриклеточные концентрации свободных белков-мономеров NrfA и NrfB, c – внутриклеточная концентрация комплекса NrfAB, d – внутриклеточная концентрация активной гетеротетрамерной формы фермента NrfA, k_1^+, k_2^+ и k_1^-, k_2^- – константы прямой и обратной реакций, соответственно. Для определения стационарных значений a, c и d получаем систему алгебраических уравнений

$$ab = k_1c, c^2 = k_2d, a + c + 2d = a_0, b + c + 2d = b_0, \quad (4)$$

где $k_1 = \frac{k_1^-}{k_1^+}$ и $k_2 = \frac{k_2^-}{k_2^+}$ – константы диссоциации,

$$a_0 = C_{NrfA,max} m_{Nrf}(u), b_0 = C_{NrfB,max} m_{Nrf}(u) \quad (5)$$

– концентрации белков NrfA и NrfB, с учетом их вхождения во все комплексы. Согласно принятому выше предположению данные концентрации пропорциональны относительной активности химерного белка NrfA- β -gal, аппроксимированной в модели функцией (2), $C_{NrfA,max}, C_{NrfB,max}$ – коэффициенты пропорциональности.

В физиологической области система (4) имеет единственное решение

$$c(u) = -\frac{k_2}{4} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_2^2}{4} + \frac{2b_1}{3} + \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} + \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_2^2}{2} + \frac{4b_1}{3} - \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} - \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}} + \frac{8c_1 - 4k_2b_1 - k_2^3}{4\sqrt{\frac{k_2^2}{4} + \frac{2b_1}{3} + \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} + \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}}}, \quad (6)$$

$$d(u) = c(u) / k_2, a(u) = a_0 - c(u) - 2d(u), b(u) = b_0 - c(u) - 2d(u),$$

где

$$b_1 = \left[(a_0 + b_0) + \frac{k_1}{2} - \frac{k_2}{2} \right] \frac{k_2}{2}, \quad c_1 = \frac{k_2^2}{2} (a_0 + b_0), \quad d_1 = \frac{k_2^2}{4} a_0 b_0,$$

$$R = \sqrt[3]{2} (b_1^2 + 12d_1 + 3k_2 c_1),$$

$$Q = \sqrt{(27c_1^2 - 2b_1^3 + 72b_1 d_1 - 9k_2 b_1 c_1 + 27k_2^2 d_1)^2 - 4(b_1^2 + 12d_1 + 3k_2 c_1)^3},$$

$$P = Q - 2b_1^3 + 27c_1^2 + 72b_1 d_1 - 9k_2 b_1 c_1 + 27k_2^2 d_1.$$

В результате для скорости переработки внеклеточного нитрита индивидуальной клеткой, вычисляемой по формуле Михаэлиса-Ментен, которая описывает механизм реакции, катализируемой периплазматической NirA нитритредуктазой [6–8] имеем выражение:

$$V_{Nrf}(u) = kcat_{Nrf} \frac{u \cdot d(u)}{Km_{Nrf} + u}. \quad (7)$$

Значения параметров $k_1 = Kd_{NrfAB}$, $k_2 = Kd_{NrfA_2B_2}$, $kcat_{Nrf}$, Km_{Nrf} взяты из литературы [6, 8, 9].

2.2. Вывод скорости ферментативной реакции, катализируемой цитоплазматической нитритредуктазой

Аналогично, мы предположили, что относительные количества белков-мономеров, составляющих субъединицы ферментов NirB и NirC, пропорциональны активности белка NirB-β-gal, представленной точками на правом графике рис. 2. Ее мы аппроксимировали обобщенной функцией

$$m_{Nir}(u) = \frac{\delta_{nir,0} + \delta_{nir,1} \left(\frac{u}{K_{nir1}} \right)^{h_{nir1}} + \delta_{nir,2} \left(\frac{u}{K_{nir2}} \right)^{h_{nir2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nir1}} \right)^{h_{nir1}} + \left(\frac{u}{K_{nir2}} \right)^{h_{nir2}}}. \quad (8)$$

Значения параметров функции (8) оценены методом наименьших квадратов (табл. 1).

Для подсчета концентрации цитоплазматической нитритредуктазы NirB использована биохимическая модель



Отсюда следует система дифференциальных уравнений,

$$\begin{cases} \frac{de}{dt} = 2(k_3^- f - k_3^+ e), \\ \frac{df}{dt} = -(k_3^- f - k_3^+ e) + (k_4^- h - k_4^+ fg), \\ \frac{dh}{dt} = -(k_4^- h - k_4^+ fg), \end{cases}$$

стационарное решение которой определяется из системы алгебраических уравнений

$$e^2 = k_3 f, \quad fg = k_4 h, \quad e + 2f + 2h = e_0, \quad g + h = g_0. \quad (10)$$

Здесь $k_3 = \frac{k_3^-}{k_3^+}$ и $k_4 = \frac{k_4^-}{k_4^+}$ – константы диссоциации,

$$e_0 = C_{NirB,max} m_{Nir}(u), \quad g_0 = C_{NirD,max} m_{Nir}(u) \quad (11)$$

– внутриклеточные концентрации белков NirB и NirD, с учетом их вхождения во все комплексы, $C_{NirB,max}, C_{NirD,max}$ – коэффициенты пропорциональности концентрации белков NirB и NirD относительной активности химерного белка NirB-β-gal, аппроксимированной в модели функцией (8), e, g – внутриклеточные концентрации свободных форм белков-мономеров NirB и NirD, f – внутриклеточная концентрация димера NirB₂, h – внутриклеточная концентрация цитоплазматической нитритредуктазы, которой является тример NirB₂D. Концентрация цитоплазматической нитритредуктазы, вычисляется из (10) по формуле

$$h(u) = \frac{1}{4}A + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{1}{4}A^2 - \frac{1}{4}K + \frac{1}{12}K + S + U} + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{1}{2}A^2 - \frac{1}{3}K - S - U + \frac{-(-A)^3 - 2M - AK}{4\sqrt{\frac{1}{4}A^2 - \frac{1}{6}K + S + U}}}, \quad (12)$$

где

$$\begin{aligned} A &= e_0 + 2g_0 + 2k_4, \quad K = e_0^2 + 8e_0g_0 + 4g_0^2 + 4e_0k_4 + 8g_0k_4 + 4k_4^2, \\ M &= -2e_0^2g_0 - 4e_0g_0^2 - 4e_0g_0k_4 - k_3k_4, \quad T = 48e_0^2g_0^2 + 12AM + K^2, \\ W &= \sqrt{-4T^3 + (432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3)^2}, \\ U &= \frac{1}{12^3\sqrt{2}}\sqrt[3]{432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3 + W}, \\ S &= \frac{T}{6^3\sqrt{4(432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3 + W)}}. \end{aligned}$$

В результате механизм реакции, осуществляемый цитоплазматической NirB нитритредуктазой, также описывается уравнением Михаэлиса-Ментен [12, 13]:

$$V_{NirB}(u, w) = kcat_{NirB_2D} \frac{w \cdot h(u)}{Km_{NirB_2D} + w} \quad (13)$$

Значения параметров $C_{NirB,max}, C_{NirD,max}, k_3 = Kd_{NirB_2}, k_4 = Kd_{NirB_2D}, kcat_{NirB_2D}, Km_{NirB_2D}$, использованные в расчетах приведены в табл. 1.

2.3. Вывод скоростей реакций транспорта, осуществляемых NirC белком

Структура каталитически активной формы NirC транспортера *E.coli* не известна. Мы полагаем, что она аналогична структуре NirC *Salmonella typhimurium*, так как эти белки относятся к одному семейству [19]. Поэтому, в модели принято, что NirC является пентамером. В соответствии с этим его концентрацию вычисляли по формуле

$$C_{NirC}(u) = C_{NirC,max} \frac{(m_{Nir}(u))^5}{(Kd_{NirC})^4 + 5(m_{Nir}(u))^4} \quad (14)$$

Механизмы импорта и экспорта нитрита NirC транспортером также не известны, поэтому скорость импорта нитрита из хемостата в клетку мы описали простейшей формулой

$$V_{NirC,in}(u) = kin_{NirC} \frac{u \cdot h(u)}{Km_{NirC,in} + u}, \quad (15)$$

а скорость экспорта нитрита из клетки в хемостат – формулой

$$V_{NirC,out}(u, w) = kout_{NirC} \frac{w \cdot h(u)}{Km_{NirC,out} + w}. \quad (16)$$

Значения параметров $C_{NirC,max}$, kin_{NirC} , $Km_{NirC,in}$, $kout_{NirC}$, $Km_{NirC,out}$, использованные в расчетах, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Список параметров модели

Параметр	Название параметра	Значение параметра ^a	Формула	Источники оценки значения
k_{flow}	Константа скорости протока в хемостате	$1.65 \cdot 10^{-4}$ мМ/сек	(1)	[5]
$\delta_{nrf,0}$	Параметры обобщенной функции (2), аппроксимирующей данные экспериментов, представленных на рис. 2, и отражающих активность экспрессии <i>nrf</i> -оперона в зависимости от установившейся концентрации нитрита в хемостате	50	(2)	[5]
$\delta_{nrf,1}$		60		
$K_{nrf,1}$		0.36 мМ		
$h_{nrf,1}$		1.3		
$\delta_{nrf,2}$		0.16		
$K_{nrf,2}$		1.7 мМ		
$h_{nrf,2}$		3.0		
$C_{NrfA,max}$	Максимальная концентрация белка NrfA в клетке	0.0076 мМ	(3),(4)	[10, 11, 16]
$C_{NrfB,max}$	Максимальная концентрация белка NrfB в клетке	0.0076 мМ		[11]
$k_1 \equiv Kd_{NrfAB}$	Константа диссоциации реакции формирования димера NrfAB	0.0004 мМ	(5),(6)	[9]
$k_2 \equiv Kd_{NrfA_2B_2}$	Константа диссоциации реакции формирования тетрамера NrfA ₂ B ₂	0.004 мМ		[9]
$kcat_{Nrf}$	Каталитическая константа периплазматической нитритредуктазы NrfA	770 сек ⁻¹	(7)	[8]
Km_{Nrf}	Константа Михаэлиса нитритредуктазы NrfA для нитрита	0.03 мМ		[6]
$\delta_{nir,0}$	Параметры обобщенной функции (8), аппроксимирующей данные экспериментов, представленных на рис. 2 и отражающих активность экспрессии <i>nir</i> -оперона в зависимости от установившейся концентрации нитрита в хемостате	2.3	(8)	[5]
$\delta_{nir,1}$		18		
K_{nir1}		1.0 мМ		
h_{nir1}		2.0		
$\delta_{nir,2}$		13,2		
K_{nir2}		1.7 мМ		
h_{nir2}		8.3		

$C_{NirB,max}$	Максимальная концентрация белка NirB в клетке	0.015 мМ	(11)	[15]
$C_{NirD,max}$	Максимальная концентрация белка NirD в клетке	0.015 мМ		
$k_3 \equiv Kd_{NirB_2}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования димера NirB ₂	0.025 мМ	(9)	[*] ^b
$k_4 \equiv Kd_{NirB_2D}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера NirB ₂ D	0.025 мМ		
$kcat_{NirB_2D}$	Каталитическая константа фермента NirB	1100.0 sec ⁻¹	(13)	[12]
Km_{NirB_2D}	Константа Михаэлиса фермента NirB	0.006 мМ		
$C_{NirC,max}$	Максимальная концентрация белка NirC в клетке	0.017, 0.027 мМ	(14)	[*] ^b
Kd_{NirC}	Константа диссоциации реакции формирования пентамера NirC	0.03 мМ	(14)	
kin_{NirC}	Каталитическая константа скорости импорта нитрита в клетку белком NirC	800 сек ⁻¹	(15)	
$Km_{NirC,in}$	Константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в клетку белком NirC	0.008 мМ		
$kout_{NirC}$	Каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	10, 800 сек ⁻¹	(16)	
$Km_{NirC,out}$	Константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	0.008, 0.03 мМ		
C	Относительная доля объема клеточной культуры в хемостате	0.0003	(1)	[5, 18]

^a – мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

^b – значение константы подобрано в результате численных экспериментов.

2.4. Оценка доли объема, занимаемого культурой *E. coli* в хемостате

Оценка доли объема, занимаемого культурой *E. coli* в хемостате, проведена на основании данных работы [5], согласно которым при фиксированной концентрации глюкозы (2.25 мМ) в среде и постоянной скорости ее поступления в хемостат, скорость роста клеток задана и постоянна. Длительность клеточного цикла при этом составляет 70 мин. Исходя из этого, параметр C в модели (1) принят также постоянным. Учитывая выше описанные параметры развития культуры в хемостате [5] и скорость потребления глюкозы культурой клеток в аналогичных лимитирующих условиях [18], мы оценили интервал, в котором может изменяться значение параметра C : $0.0001 \leq C \leq 0.002$. При анализе модели использовано значение $C = 0.0003$ (табл. 1).

3. АНАЛИЗ ПОТОКОВ В ХЕМОСТАТЕ

Как указывалось выше, моделирование процессов транспорта и утилизации нитрита проводили при заданных параметрах накопления нитрита в проточном хемостате в условиях сбалансированного роста культуры клеток *E. coli*. Данные по накоплению нитрита в зависимости от подаваемой в хемостат концентрации субстрата в этих условиях представлены в работе [5, рис. 4]. Они позволяют при заданном объеме клеточной культуры вычислить абсолютную скорость потребления нитрита культурой

клеток и провести анализ потоков ее составляющих. Результаты моделирования при заданных параметрах модели (1) (табл. 1) приведены ниже.

3.1. Оценка максимальной скорости переработки внеклеточного нитрита периплазматической нитритредуктазой

На рис. 3 точками представлены результаты вычисления абсолютной скорости потребления нитрита культурой клеток при фиксированных значениях добавленного в хемостат нитрита и заданном объеме клеточной культуры $C = 0.0003$ по экспериментальным данным работы [5]. Для наглядности эти данные мы аппроксимировали кривой 1.

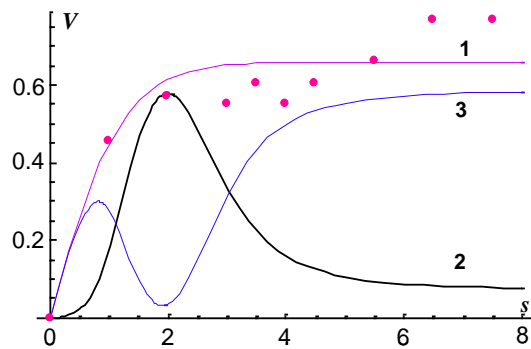


Рис. 3. Скорость потребления нитрита индивидуальной клеткой. Кривая 1 – аппроксимация экспериментальных точек функцией $1.2(1 - \exp(-0.6u)) / (1 + \exp(-0.6u))$; кривая 2 – абсолютная скорость утилизации нитрита NrfA нитритредуктазой, рассчитанная по модели (2)–(7) при $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 8.5 \mu\text{M}$, $\delta_{nrf,0} = 4.5$ и значениях остальных параметров из табл.1; кривая 3 – скорость внутриклеточного потребления нитрита индивидуальной клеткой, рассчитанная как разность кривых 1 и 2. Ось абсцисс – s , концентрация добавленного нитрита (мМ), ось ординат – V , скорость потребления нитрита (мМ/сек).

Видно, что с повышением концентрации добавленного в хемостат нитрита скорость потребления нитрита клетками монотонно растет и при концентрации добавленного нитрита выше 2 мМ достигает значений 0.5–0.8 мМ/сек (см. точки и ход аппроксимирующей их кривой 1, рис. 3). Известно, что данное потребление складывается из нескольких потоков, одним из которых является процесс утилизации внеклеточного нитрита нитритредуктазой NrfA. Максимальная активность этого фермента, согласно генетическим данным [2], наблюдается при концентрации 2 мМ добавленного нитрита. Исходя из этого, видим, что максимальная скорость переработки нитрита данным ферментом не может быть выше 0.55 мМ/сек (точка (2, 0.55) на рис. 3).

Для расчета скорости утилизации нитрита NrfA нитритредуктазой, осуществляемую индивидуальной клеткой при разных концентрациях добавленного нитрита, используем модель (2)–(7). Значения всех параметров, входящих в данные формулы, кроме параметров $C_{NrfA,max}$ и $C_{NrfB,max}$, известны из литературных источников или оценены ранее (табл. 1). Оценим значения параметров $C_{NrfA,max}$ и $C_{NrfB,max}$. Предположим, что белки NrfA и NrfB нарабатываются в эквимольных количествах, т. е. $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max}$, а скорость переработки нитрита ферментом NrfA культурой клеток, культивируемых в хемостате при концентрации добавленного нитрита 2 мМ, равна 0.55 мМ/сек. В результате находим, что $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 8.5 \mu\text{M}$. Данная оценка по порядку соответствует независимым измерениям, проведенным в работе [16].

В итоге, по формулам (2)–(7) вычисляем скорость утилизации нитрита NrfA нитритредуктазой, осуществляемую индивидуальной клеткой, при разных концентрациях добавленного нитрита (кривая 2, рис. 3). В частности, рассчитанная скорость утилизации нитрита NrfA нитритредуктазой при 1 мМ добавленного нитрита

равна 0.11 мМ/сек, что существенно ниже оценки 0.45 мМ/сек, полученной из данных экспериментов (точка (1,0.45) на рис. 3).

Если приблизить экспериментальные данные кривой 1, то скорость внутриклеточного потребления нитрита клеткой можно представить кривой 3 (рис. 3), которая имеет два максимума – в области малых (< 1мМ) и больших (> 3мМ) значений концентраций добавленного нитрита, и относительно низкую скорость переработки в промежуточном интервале.

Наличие высокой скорости переработки нитрита клеткой при высоких (> 3мМ) концентрациях добавленного нитрита (кривая 3, рис. 3) можно легко объяснить экспериментально известной высокой активностью системы транспорта нитрита в клетку, обеспечиваемой активностью NirC транспортера, и его последующей утилизацией нитритредуктазой NirB, структура которых кодируется генами, входящими в единый оперон *nirBDC* [14]. Однако наличие высокой скорости транспорта нитрита в клетку и его переработки внутри клетки при низких (< 1мМ) концентрациях добавленного нитрита объяснить значительно сложнее, поскольку в этих условиях уровень экспрессии *nirBDC* оперона незначителен [2].

Таким образом, если при расчетах активности функционирования NrfA нитритредуктазы исходить из генетических данных, представленных в работе [2], то, согласно модели, внутриклеточная динамика утилизации нитрита будет иметь локальный, труднообъяснимый максимум в области малых концентраций добавленного нитрита.

3.2. Оценка скоростей внутри и внеклеточной утилизации нитрита

Анализ, проведенный в предыдущем разделе, показал, что если считать относительные количества белков-мономеров в клетке, составляющих субъединицы NrfA фермента, пропорциональными относительной активности химерного белка NrfA-β-gal [2], то динамика транспорта нитрита в клетку и его внутриклеточной утилизации в области малых концентраций добавленного нитрита имеет сложный труднообъяснимый характер. Очевидно, что трудности в интерпретации полученных результатов исчезнут, если удастся избавиться от пика в малых областях концентраций добавленного нитрита.

Для того чтобы выяснить условия, при которых локальный пик отсутствует или становится незначительным, мы проверили две возможности. В первом случае высота локального пика переработки нитрита клеткой в области малых концентраций субстрата, уменьшалась путем снижения содержания периплазматической NrfA нитритредуктазы в клетке (рис. 4).

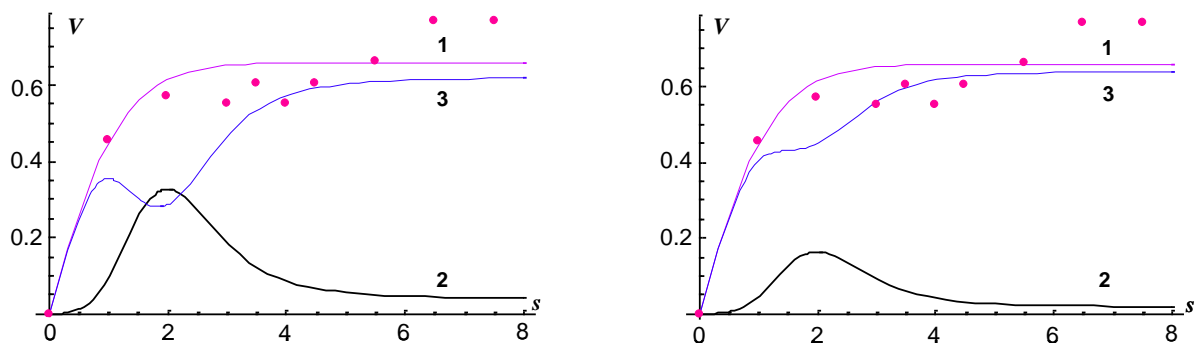


Рис. 4. Потребление нитрита индивидуальной клеткой при разных скоростях синтеза белков, составляющих структуру фермента NrfA. Смысл точек, кривых и осей на каждом графике аналогичен рис. 3. Левый график рассчитан при $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 6.0 \mu\text{M}$, $\delta_{nrf,0} = 4.5$, правый при $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 4.0 \mu\text{M}$, $\delta_{nrf,0} = 4.5$. Остальные параметры взяты из табл. 1.

Как и ожидалось, при уменьшении эффективности работы суммарного пула молекул NrfA фермента локальный максимум и минимумы сближаются, но при этом абсолютная скорость переработки нитрита внутри клетки возрастает (кривые 2,а и 2,б на рис. 4). Приведенные расчеты показывают, что в принципе локальный пик можно преобразовать в «полочку», которую можно объяснить наличием конститутивной активности систем транспорта нитрита в клетку и утилизации его цитоплазматической нитритредуктазой NirV. Но чтобы добиться этого, необходимо предполагать, что при малых концентрациях нитрита активность NrfA фермента пренебрежимо мала по сравнению с активностью NirV нитритредуктазы. А это маловероятно, так как известно, что данный фермент при малых концентрациях нитрита является его основным «переработчиком» [2].

Во втором случае мы предположили, что при малых концентрациях добавленного нитрита (< 1 мМ) количество, а, следовательно, и активность периплазматической NrfA нитритредуктазы выше той, что прогнозируется из генетических исследований [2], и которая использована для расчетов, приведенных на рис. 3 и 4.

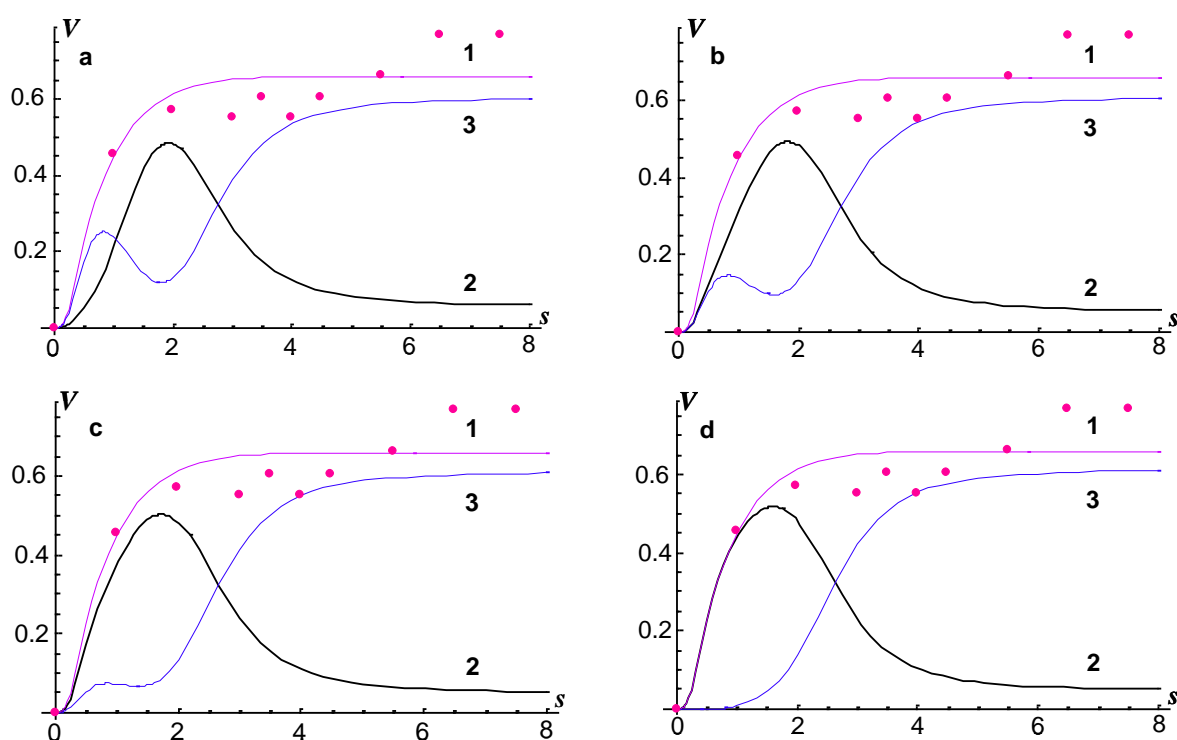


Рис. 5. Потребление нитрита индивидуальной клеткой при разных активностях фермента NrfA. Смысл точек, кривых и осей на каждом графике аналогичен рис. 3. График (а) рассчитан при $\delta_{nrf,0} = 15.0$, график (b) – $\delta_{nrf,0} = 30.0$, график (c) – $\delta_{nrf,0} = 40.0$, график (d) – $\delta_{nrf,0} = 50.0$. Для всех расчетов $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 7.6 \mu\text{M}$, значения остальных параметров приведены в табл. 1.

Серия из четырех расчетов, реализующих данное предположение, показана на рис. 5. Расчеты слева направо проведены при разных базовых уровнях периплазматического фермента в клетке в отсутствии нитрита: 16%, 45%, 67% и 86% от максимального уровня, который наблюдается при индукции нитритом. Можно отметить, что кривые, отражающие скорость внутриклеточного потребления нитрита при концентрациях добавленного нитрита больше 1.5 мМ, практически не отличаются друг от друга. Это не является удивительным, так как активность периплазматической нитритредуктазы в этой области быстро подавляется (кривые 2). Однако при малых значениях концентрации добавленного нитрита (до 1.5 мМ) по мере увеличения начального количества фермента (т. е. двигаясь от первого графика к четвертому)

наблюдается существенное изменение вида кривой скорости. Сначала она имеет четко выраженный пик (график 1), при втором расчете она заметно уплощается, для расчета 3 превращается практически в идеальную «полочку», а в расчете 4 полностью исчезает. Видно, что при этом третий и четвертый расчеты соответствуют качественному поведению кривой активности цитоплазматической NirB нитритредуктазы в ответ на нитрит, прогнозируемой из генетических экспериментов [2, рис. 3].

Таким образом, согласно расчетам модели, предположение о наличии высокого количества NrfA белка в клетке в отсутствие нитрита позволяет получить вид кривой переработки нитрита внутри клетки соответствующей экспериментальным данным.

3.3. Анализ потоков транспорта нитрита в клетку и его экспорта из клетки

В модели, согласно экспериментальным данным [4], транспорт нитрита в клетку осуществляет белок NirC. Поступающий в клетку нитрит частично утилизируется цитоплазматической NirB нитритредуктазой до аммония, а избыток снова выводится из клетки NirC транспортером. Подобная схема движения нитрита вполне соответствует биологической целесообразности, так как высокие концентрации нитрита в клетке обладают токсическим действием, и поэтому он не должен в ней накапливаться.

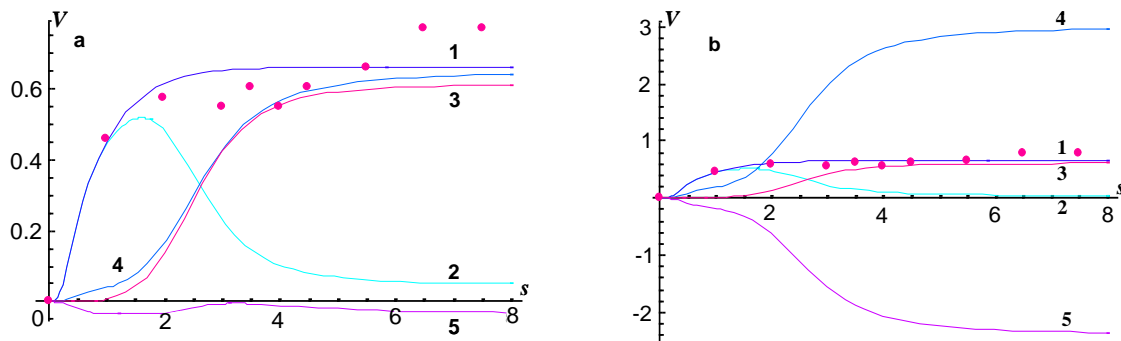


Рис. 6. Скорость утилизации нитрита периплазматической NrfA и цитоплазматической NirB редуктазами, а также скорости его импорта в клетку и экспорта из клетки NirC-транспортером. Точки, кривые 1, 2, 3 и оси графиков по смыслу идентичны аналогичным объектам на рис. 3. Кривая 4 – скорость транспорта нитрита в клетку, рассчитанная по модели (8), (14), (15); кривая 5 – скорость транспорта нитрита из клетки, рассчитанная как разность кривых 4 и 3. На графике (a) расчеты проведены с параметрами $\delta_{nrf,0} = 50$, $C_{NrfA,max} = 7.6 \mu\text{M}$, $\delta_{nir,0} = 1.2$; $kcat_{NirCin} = 130 \text{ sec}^{-1}$; на графике (b) – с параметрами $\delta_{nrf,0} = 50$, $C_{NrfA,max} = 7.6 \mu\text{M}$, $\delta_{nir,0} = 1.2$; $kcat_{NirCin} = 600 \text{ sec}^{-1}$, остальные параметры взяты из табл. 1.

Для вычисления скорости транспорта NirC нитрита в клетку мы использовали модель (8), (14), (15), а экспортную активность вычисляли как разницу скорости транспорта нитрита в клетку и скорости его утилизации внутри клетки. Так как прямых данных о скорости импорта нитрита в клетку в условиях хемостата нет, то мы оценили минимально возможную максимальную скорость транспорта нитрита в клетку, которая может быть реализована при 8 мМ добавленного нитрита. На рис. 6,а представлены расчеты, соответствующие данному варианту. В данном расчете максимальная скорость транспорта нитрита из хемостата в клетку составляет, примерно, 0.65 мМ/сек (рис. 6,а, кривая 4 в точке 8 мМ концентрации добавленного нитрита). Данное значение является минимальным, при котором скорость импорта нитрита остается выше скорости его внутриклеточной переработки на всем интервале изменения концентрации добавленного нитрита в хемостат. При этом кривая скорости транспорта нитрита в клетку на всем интервале изменения остается близкой к кривой скорости его потребления внутри клетки (рис. 6,а, кривые 4 и 3). Т. е. при данном значении

максимальной скорости поступления нитрита в клетку он весь потребляется, и отток нитрита из клетки практически отсутствует (рис. 6,а, кривая 5, отклонением от нуля данной кривой можно пренебречь).

Очевидно, что в реальной ситуации скорость транспорта нитрита в клетку не обязана совпадать со скоростью ее внутриклеточного потребления. Нельзя исключить, что в некоторых случаях она может быть значительно выше. В этом случае излишек должен экспортироваться из клетки. Конкретный расчет, в котором максимальная скорость транспорта нитрита в клетку принята равной 3 мМ/сек, приведен на рис. 6,б (кривая 4). В этом случае на всем интервале изменения концентрации добавленного нитрита прогнозируется ненулевой отток нитрита из клетки в хемостат (рис. 6,б, кривая 5). Важным наблюдением, которое следует из рис. 6,б, является то, что качественно кривая экспорта 5 соответствует виду экспериментально измеренной кривой активности химерного белка NirB- β -gal, приведенной на рис. 3 работы [2]. Данное соответствие хорошо согласуется с тем, что гены, кодирующие белки NirB, NirC и NirD, входят в состав единого оперона.

3.4. Моделирование потоков утилизации внутриклеточного нитрита и его экспорта из клетки

В предыдущих разделах 3.1–3.3 были проанализированы потоки утилизации и транспорта нитрита, которые формируются клеткой, при разных количествах добавляемого в хемостат нитрита (s). Скорость утилизации внеклеточного нитрита мы описывали моделью (2)–(7), а скорость импорта нитрита в клетку – моделью (8), (14), (15).

Мы показали, что для того чтобы описать потребление нитрита культурой клеток в хемостате в соответствии с данными экспериментов [5], необходимо предположить, что в области малых концентраций добавленного нитрита (менее 1.0 мМ) клетка имеет уровень относительной активности периплазматической NrfA редуктазы значительно выше той, которая прогнозируется из данных по активности химерного белка NrfA- β -gal [5]. Исходя из этого предположения, мы смогли оценить абсолютную скорость утилизации внутриклеточного нитрита, которую реализует клетка при разных концентрациях добавленного нитрита (кривые 3 на рис. 5,с,д). Оказалось, что прогнозируемая кривая скорости переработки нитрита внутри клетки качественно соответствует экспериментальной кривой активности химерного белка NirB- β -gal. Далее мы предположили, что основной транспорт нитрита внутрь клетки (импорт) осуществляет белок NirC и его активность также пропорциональна экспериментальной кривой активности химерного белка NirB- β -gal. Сформулированное выше предположение позволило оценить скорость экспорта нитрита из клетки при различных скоростях его транспорта в клетку. Оказалось, что качественное поведение кривой скорости экспорта нитрита также пропорционально активности химерного белка NirB- β -gal. Это позволило нам связать функцию экспорта нитрита с белком NirC. Это предположение является вполне оправданным, так как экспортная активность для данного транспортера показана в 2009 году [4].

В пользу адекватности принятых в модели предположений свидетельствует и то, что подобие кривых эффективности работы системы импорта/экспорта нитрита и его внутриклеточной утилизации согласуется с вхождением генов, кодирующих структуру NirB редуктазы и NirC транспортера в единый *nir* оперон [14].

Особенность анализа потоков в разделах 3.1–3.3 состояла в том, что скорости утилизации внутриклеточного нитрита и его экспорта из клетки оценивались как остаточные потоки, а не вычислялись по формулам (8)–(13) и (8), (14), (16), так как для этого необходимо знать внутриклеточную концентрацию нитрита. К нашему удивлению, оказалось, что данные по концентрации нитрита в клетке практически

отсутствуют. Есть одиночные указания, что в условиях анаэробного роста культуры клеток *E. coli* на 20 мМ нитрате, когда концентрация нитрита в ростовой среде достигает 5 мМ, в клетке он находится в следовых количествах, менее 0.1 мМ [3]. Поэтому мы приняли, что концентрация нитрита в клетке, культивируемой в хемостате на всем интервале изменения концентрации добавленного нитрита ($0 \leq s \leq 8$ мМ), должна быть того же порядка или ниже.

Для расчета концентраций нитрита в хемостате (u) и внутри клетки (w), и скоростей его утилизации и транспорта, устанавливающихся в стационаре при различных значениях концентрации добавленного нитрита в хемостат мы использовали модель (1)–(16) с нулевыми правыми частями системы (1). Принимая во внимание выражение скорости экспорта нитрита из клетки в хемостат (16), легко заметить, что из первого уравнения (1) следует явная зависимость w от u . Это позволяет преобразовать второе уравнение (1), после исключения w , в нелинейное уравнение относительно u . Таким образом, стационарное значение u определяется как корень этого уравнения, а вместе с этим и стационарное значение w .

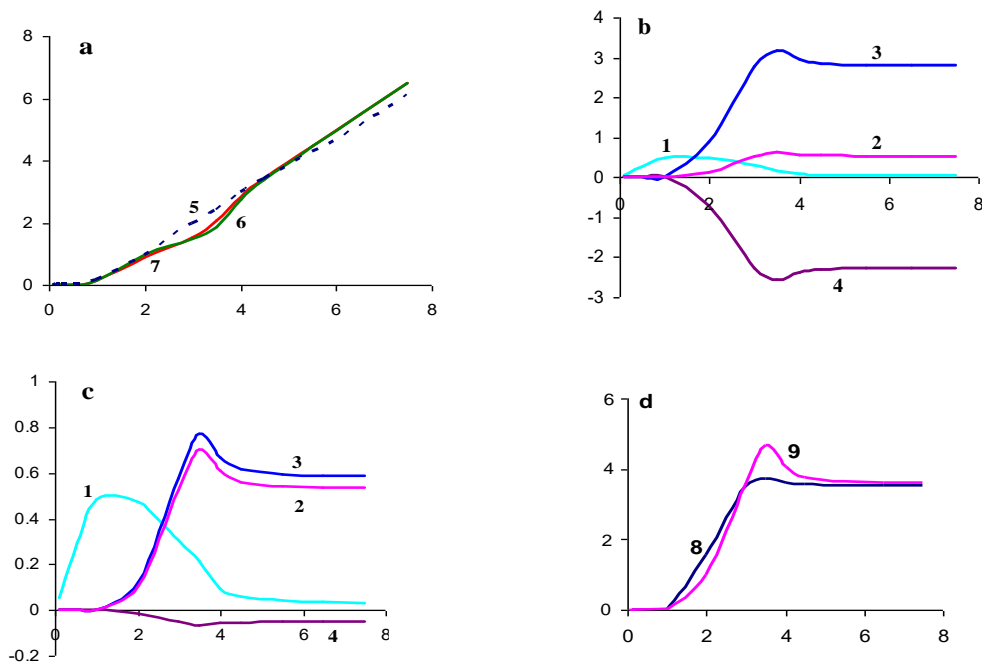


Рис. 7. Параметры утилизации и транспорта нитрита, реализуемые в хемостате при различных концентрациях добавленного нитрита. Расчеты проведены по модели (1)–(16). Кривые 1–4 идентичны по смыслу кривым 2–5 на рис. 6, соответственно; кривая 5 (синяя, пунктирная) – установившаяся концентрация нитрита в хемостате (экспериментальные данные) из [5]); кривые 6–7 – установившиеся концентрации нитрита в хемостате, рассчитанные по модели. Кривая 6 на графике (a), кривые на графике (b) и кривая 8 на графике (d) рассчитаны по модели (1)–(16) с параметрами $C_{NirC,max} = 0.005$ мМ, $k_{outNirC} = 1200$ sec⁻¹, $K_{mNirCout} = 0.0175$ мМ, Кривая 7 на графике (a), кривые на графике (c) и кривая 9 на графике (d) рассчитаны по модели (1)–(16) с параметрами $C_{NirC,max} = 0.001$ мМ, $k_{outNirC} = 100$ sec⁻¹, $K_{mNirCout} = 0.03$ мМ, остальные параметры указаны в табл. 1. Оси абсцисс – концентрация добавленного нитрита (мМ), ось ординат на графике (a) – концентрация нитрита в хемостате (мМ), на графиках (b), (c) – скорость потребления нитрита (мМ/сек) и на (d) – концентрация нитрита внутри клетки (µМ).

Мы рассмотрели два варианта модели (1)–(16). В первом параметрическом варианте (рис. 7,a,c) воспроизведены условия, реализованные на рис. 6,a: стационарная скорость импорта нитрита из хемостата в клетку (кривая 3, рис. 7,c) примерно совпадает со скоростью его внутриклеточной утилизации (кривая 2, рис. 7,c). В результате внутри

клетки практически отсутствует избыточный нитрит и его скорость экспорта близка к нулю (кривая 4, рис. 7,с).

Во втором параметрическом варианте (рис. 7,а,б) реализованы условия рис. 6,б: скорость импорта нитрита (кривая 3, рис. 7,б) примерно в пять раз превосходит скорость его внутриклеточной утилизации (кривая 2, рис. 7,б). В данном варианте имеется существенный избыток нитрита в клетке, который выводится из клетки с высокой скоростью (кривая 4, рис. 7,б). Обе модели воспроизводят кривые установившейся концентрации нитрита (u) в хемостате (кривые 5, 6, рис. 7,а) в соответствии с экспериментальными данными [5]. Что касается внутриклеточного нитрита, то его концентрация не превышает границы 5 μM на всем интервале изменения добавленного нитрита (рис. 7,д) и выходит на плато при $s > 4$ мМ.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы представляем модель утилизации нитрита клетками *E. coli*, в которой воспроизведены анаэробные, глюкозо-лимитирующие условия культивирования в проточном хемостате на нитрите. В сбалансированных условиях, которые устанавливаются примерно через 8 часов после смены среды, клетки около 50 часов [18] растут с постоянной скоростью, обеспечивая длительность клеточного цикла равной примерно 70 минут [5].

Модель адаптирована к экспериментальным данным по динамике накопления нитрита в хемостате и динамике экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру NrfA и NirB редуктаз, утилизирующих нитрит, и NirC транспортера нитрита в зависимости от концентрации добавленного нитрита [2, 5]. В модели принято, что концентрации белков, являющихся субъединицами ферментов NirB редуктазы и транспортера нитрита NirC пропорциональны активности химерного белка NirB- β -gal на всем интервале изменения концентрации добавленного нитрита, а активность периплазматической NrfA редуктазы соответствует кривой активности химерного белка NrfA- β -gal на интервале концентраций добавленного нитрита от 2 мМ и выше.

В то же время из модели следует, что согласие с экспериментальными данными по динамике накопления нитрита в хемостате и активности цитоплазматической нитритредуктазы NirB и транспортного белка NirC достигается в предположении о наличии высокого уровня активности фермента NrfA в клетке при низких количествах нитрита в среде, которые устанавливаются в хемостате при концентрациях добавленного нитрита меньше 1 мМ. Данное следствие модели вступает в конфликт с данными о том, что эффективность экспрессии *nrf* оперона в отсутствие нитрита составляет примерно 3% от максимального уровня его индукции [1, 2]. Возникает вопрос о механизме поддержания высокой активности данного фермента на фоне его низкой скорости синтеза при низких концентрациях нитрита. Одним из вариантов объяснения является предположение, что при невысоком уровне синтеза белка, его значительное количество в клетке поддерживается за счет высокой стабильности. Для периплазматических белков, каковым является NrfA редуктаза, такая возможность существует. Так, показано, что гетерологичные белки, синтезированные в клетке *E. coli* и транспортированные в периплазму, более чем в 10 раз стабильнее тех, которые локализованы в цитоплазме [20]. Поэтому количество NrfA белка в клетке, оцененное по активности химерного белка NrfA- β -gal, содержащего лишь первые 9 аминокислот NrfA белка [2], может не соответствовать действительности. К сожалению, экспериментальных данных о стабильности NrfA белка и его количестве в клетке при низких концентрациях нитрита или в его отсутствие мы не обнаружили. Другая возможность может заключаться в зависимости параметров ферментативной активности NrfA от концентрации нитрита в среде, о чем свидетельствуют данные работ [7, 17]. Нельзя также исключать возможность существования неизвестной

нитритредуктазы, которая была бы активна только в области малых концентраций нитрита. Последнее вполне допустимо моделью, но этот вариант мы в работе не рассматриваем, поскольку претендентов на эту роль пока нет.

Анализ потоков показал, что в пространстве имеющихся экспериментальных данных скорость экспорта нитрита из клетки остается свободным параметром модели, который может варьироваться в широких пределах. В приведенных на рис. 7, *b* расчетах максимальная скорость импорта нитрита примерно равна 3 мМ/сек, а на рис. 7, *c* – ~ 0.8 мМ/сек. В отсутствие данных о каталитической активности этого белка в условиях дыхания на нитрите в хемостате оба варианта вполне допустимы.

Экспериментально показано, что в анаэробных условиях нестационарного роста клеток на 20 мМ нитрате, при которых концентрация нитрита в среде достигает 4–5 мМ, скорость импорта нитрита в клетку NirC транспортером составляет 0.3–0.4 мМ/сек [3, 4]. В условиях нестационарного роста на нитрите скорость его транспорта в клетку может достигать 2 мМ/сек [21]. Первым данным больше отвечают расчеты, приведенные на рис. 6, *a* и 7, *c*, а вторым – расчеты, приведенные на рис. 6, *b* и 7, *b*.

Что касается экспорта нитрита из клетки, то при низкой скорости импорта нитрита, модель демонстрирует его слабый обратный поток. Если же скорость импорта нитрита превышает возможности клетки по его утилизации, то скорость обратного потока резко возрастает. В его реализации, как показано, могут участвовать три транспортера: NirC, NarK и NarU [4]. Однако их вклад в условиях дыхания на нитрите не определен. Мы, в модели, ограничились учетом функции только NirC белка. Основанием для этого являются данные, что в условиях проточного хемостата при заданной скорости роста клеток (0.6 h^{-1}) вклад NarU транспортера в экспорт нитрита незначителен [21, 22]. Что касается NarK транспортера, то нельзя отрицать возможности его участия в экспорте нитрита из клетки, в силу высокого базового уровня экспрессии *narK* гена [23]. Но мы в модели его не учитываем, поскольку он, в первую очередь, функционирует как сопряженный нитрат/нитритный транспортер [4, 21, 24].

В модели параметры транспортной активности NirC белка, необходимые для согласования потоков нитрита в клетку и из нее, могут значительно варьировать. К сожалению, отсутствие экспериментальных данных относительно параметров каталитической активности NirC транспортера *E. coli* не может быть компенсировано недавно появившимися данными для NirC транспортера *Salmonella typhimurium* [25], в силу наличия больших различий в субстратной специфичности между NirC белками *E. coli* и *S. typhimurium*. NirC *E. coli* является исключительно транспортером нитрита [3], а NirC *S. typhimurium* может транспортировать и нитрит, и нитрат, и протоны, причем наиболее характерной для него является нитрит/ H^+ транспортная активность [25].

Что касается динамики внутриклеточного нитрита, то модель допускает поддержание его как на высоком, так и на низком уровне, однако низкая концентрация больше соответствует экспериментальным данным [3]. При этом из модели следует, что его концентрация в клетке устанавливается на постоянном уровне при высоких концентрациях добавленного нитрита. Этот результат вполне соответствует представлению, что нитрит токсичен для клетки, и она выработала механизмы поддержания его концентрации на низком физиологическом уровне, экспортируя его излишки из клетки в среду.

Следует также отметить, что предсказываемая моделью динамика изменения концентрации внутриклеточного нитрита не позволяет ему выступать в качестве регулятора эффективности экспрессии оперонов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих нитрит. Этот факт согласуется с известными механизмами индукции генов нитритного метаболизма внеклеточным нитритом через сенсорные киназы NarX и NarQ, локализованные в мембране клетки, и транскрипционные факторы NarL и NarP [26].

В заключение еще раз подчеркнем, что разработанная модель утилизации нитрита в условиях проточного хемостата, при адаптации к имеющимся экспериментальным данным в области высоких концентраций добавленного нитрита не требует привлечения дополнительных гипотез. Но для того, чтобы адаптировать модель к данным экспериментов в области низких концентраций добавленного нитрита, требуется предполагать изначально высокую активность переработки нитрита клеткой. Она может быть реализована либо за счет высокой активности NrfA фермента в области низких концентраций нитрита, либо за счет повышенной стабильности белков NrfA и NrfB, либо за счет наличия дополнительного фермента, активного только в этой области концентраций. Какое из данных предположений верно, можно проверить только экспериментально.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 13-01-00344), Программ Президиума СО РАН (интеграционный проект №80) и РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект 6.6), и гранта НШ-5278.2012.4. Авторы благодарны Татьяне Лихошвай (Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany) за информационную поддержку работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. P. 349–354.
2. 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.
3. Clegg S., Yu F., Griffiths L., Cole J.A. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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. № 12. P. 3789–3799.
7. van Wonderen J.H., Burlat B., Richardson D.J., 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lockwood C., Butt J.N., Clarke T.A., Richardson D.J. Molecular interactions between multiheme cytochromes: probing the protein-protein interactions between pentahaem cytochromes of a nitrite reductase complex. *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 263–268.

11. Clarke T.A., Dennison V., Seward H.E., Burlat B., Cole J.A., Hemmings A.M., Richardson D.J. Purification and spectropotentiometric characterization of *Escherichia coli* NrfB, a decaheme homodimer that transfers electrons to the decaheme periplasmic nitrite reductase complex. *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 41333–41339.
12. Coleman K.J., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Activation of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 1978. V. 175. P. 495–499.
13. 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.
14. Harborne N.R., Griffiths L., Busby S.J., Cole J.A. Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon. *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. P. 2805–2813.
15. Coleman K.J., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* 1978. V. 175. P. 483–493.
16. 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.
17. Angove H.C., Cole J.A., Richardson D.J., Butt J.N. Protein film voltammetry reveals distinctive fingerprints of nitrite and hydroxylamine reduction by a cytochrome C nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 23374–23381.
18. Wright D.N., Lockhart W.R. Environmental control of cell composition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1965. V. 89. P. 1026–1031.
19. Lü W., Schwarzer N.J., Du J., Gerbig-Smentek E., Andrade S.L., Einsle O. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 18395–18400.
20. Talmadge K., Gilbert W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V.79. P. 1830–1833.
21. Jia W., Cole J.A. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 2005. V. 33. P. 159–161.
22. Clegg S.J., Jia W., Cole J.A. Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. *Microbiology.* 2006. V. 152. P. 2091–2100.
23. Kolesnikow T., Schröder I., Gunsalus R.P. Regulation of narK gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum. *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 7104–7111.
24. DeMoss J.A., Hsu P.Y. NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 3303–3310.
25. 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.
26. Cavicchioli R., Chiang R.C., Kalman L.V., Gunsalus R.P. Role of the periplasmic domain of the *Escherichia coli* NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation. *Mol. Microbiol.* 1996. V. 21. P. 901–911.

Материал поступил в редакцию 30.05.2013, опубликован 18.06.2013.