

На правах рукописи

РИ НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ
УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА В КЛЕТКЕ *ESCHERICHIA COLI*
МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

03.01.09

Математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетических систем ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Хлебодарова Тамара Михайловна**
д.б.н., в.н.с., лаборатория молекулярно-генетических систем, ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Щербаков Дмитрий Юрьевич**
д.б.н., зав. лабораторией геносистематики, ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН, г. Иркутск

Козлов Константин Николаевич
к.б.н., ведущий научный сотрудник, Институт прикладной математики и механики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (ФГАОУ ВО «СПбПУ»)

Ведущее учреждение: Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, п. Кольцово

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2018 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Исследование взаимосвязи между структурно-функциональной организацией генных сетей и их динамическими свойствами является фундаментальной научной проблемой, а метод математического моделирования – наиболее адекватным подходом для ее решения. В настоящей работе метод математического моделирования использован для анализа механизмов функционирования нитритной респираторной системы в условиях анаэробного дыхания у *Escherichia coli*. Эта система представляет интерес с разных точек зрения. Во-первых, этот тип дыхания наиболее характерен для *E. coli* в естественных местах ее обитания в кишечнике млекопитающих и, в частности, человека. В кишечнике человека *E. coli* составляет менее одного процента от общей массы микробиома [Yang, Jobin, 2014], однако она играет важную роль в синтезе витаминов, переваривании пищи, а также в утилизации кислорода, который оказывает ингибирующее действие на рост полезных для человека бифидо- и лактобактерий [Bentley, Meganathan, 1982; Jones et al., 2011]. Предпочтительная активация этой респираторной системы у *E. coli* определяется возможностью поступления нитрата, как предшественника нитрита, с пищей, а также особенностями нитрата, как субстрата для дыхания, являющегося самым сильным акцептором электронов в цепи передачи электронов и наиболее выгодным с точки зрения продукции АТФ. Однако нитрит, который образуется в процессе утилизации нитрата, токсичен не только для бактериальных клеток, но и для клеток хозяина, а побочные продукты утилизации нитрита обладают мутагенным свойством [Weiss, 2006]. Все это подразумевает тесную взаимосвязь генетических систем, включенных в нитрат-ассоциированную цепь передачи электронов и нитритного метаболизма, динамические аспекты функционирования которой не исследованы.

Во-вторых, несмотря на токсичность нитрита, клетки *E. coli* могут расти на нитрите и использовать его в качестве источника электронов для синтеза АТФ. В связи с этим представляют интерес не только механизмы контроля внутриклеточного содержания нитрита, но и механизмы формирования цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите, которые до сих пор также не ясны.

И наконец, нитрат-нитритная респираторная система у *E. coli* и близких к ней видов бактерий играет определенную роль в патологических процессах, связанных как с воспалением, так и с развитием раковых опухолей [El-Mosalamy, 2012]. В связи

с этим изучение метаболических путей утилизации нитрата и нитрита бактерией *E. coli*, особенно в условиях, близких к естественным, представляет особый интерес.

Изучение процессов утилизации нитрита *E. coli* началось примерно в середине прошлого столетия [Cole 1968]. Однако, несмотря на многолетний период экспериментального исследования и кажущуюся простоту системы утилизации нитрита *E. coli*, степень ее изученности не вскрывает всех механизмов, лежащих в основе ее функционирования. В настоящей работе для исследования этой системы был применен метод математического моделирования, который позволяет выявлять скрытые регуляторные механизмы, управляющие поведением системы.

Цели и задачи диссертационной работы. Целью настоящей работы является изучение механизмов функционирования респираторной системы *E. coli* в условиях анаэробного дыхания на нитрите и исследование вклада отдельных компонентов этой системы в кинетику утилизации нитрита методами математического моделирования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать модель утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста культуры в проточном хемостате и адаптировать ее к экспериментальным данным по динамике экспрессии генов *nrfA*, *nirB* и *nirC*, кодирующих белки, входящие в состав ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит.
2. Исследовать вклад Nrf и NirB нитритредуктаз и транспортного белка NirC в кинетику утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в проточном хемостате.
3. Реконструировать структуру респираторной цепи в условиях дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате и разработать структурную модель формирования цепи передачи электронов от донора к акцептору.
4. Исследовать динамику функционирования модели утилизации нитрита, дополненную молекулярно-генетическими механизмами формирования протонного градиента, в условиях анаэробного дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.
5. Исследовать вклад мембранного потенциала в регуляцию активности респираторной Nrf нитритредуктазы в условиях стационарного роста и дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.

Научная новизна работы. Впервые разработана математическая модель утилизации нитрита клетками *E. coli*, учитывающая молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы периплазматической и цитоплазматической нитритредуктазы и транспортного белка NirC, которая позволила исследовать вклад различных компонентов этой системы в кинетику утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток.

В ходе выполнения исследования показано, что учет молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит, не позволяет описать экспериментально наблюдаемую кинетику утилизации нитрита в хемостате в области низких концентраций нитрита в среде (ниже 2 мМ) без дополнительных предположений.

Высказана гипотеза, что дополнительная нитрит-утилизирующая активность в области концентраций нитрита в среде менее 1 мМ может быть реализована за счет локального изменения концентрации периплазматической Nrf нитритредуктазы при переходе из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи.

Показано, что мембранный потенциал, независимо от сценария его формирования, является достаточным механизмом регуляции активности респираторной периплазматической Nrf редуктазы, обеспечивающим корректное описание кинетики утилизации нитрита в хемостате.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Теоретическая значимость работы обоснована тем, что впервые изучены динамические аспекты функционирования респираторной системы анаэробного дыхания на нитрите в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста клеток *E. coli* и выявлен новый механизм регуляции нитрит-утилизирующей активности при концентрациях субстрата, характерных для естественных мест обитания энтеробактерий. Показано, что этот механизм у *E. coli* связан с действием мембранного потенциала на секрецию субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и формированием активной формы фермента в периплазматическом пространстве клетки. Предполагается, что этот механизм может быть важен для других периплазматических ферментов, локальная активность которых в периплазме

зависит не только от скорости их синтеза в цитоплазме, но и от скорости секреции их компонентов в периплазму.

Теоретически показано, что механизм действия мембранного потенциала не зависит от сценария его формирования. Не исключено, что реализация конкретного сценария может быть связана с особенностями функционирования респираторных ферментов в конкретных условиях внешней среды, однако подтверждения этому с помощью экспериментальных методов пока нет. В целом результаты, полученные в ходе моделирования, дополняют имеющиеся представления о респираторной системе *E. coli*, использующей в качестве субстрата токсичные для клетки вещества, каковым является нитрит, и могут послужить основой для дальнейших экспериментальных исследований системы утилизации нитрита у *E. coli*.

Математические модели утилизации нитрита клетками *E. coli*, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы, подробно описаны в соответствующих публикациях, которые находятся в открытом доступе и могут быть использованы другими исследователями. Часть подмоделей, описывающих отдельные процессы в метаболическом пути утилизации нитрита, представлены в базе данных MAMMOTH [Kazantsev et al., 2017] и доступны на сайте <http://mammoth.biomodelsgroup.ru>.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих субъединицы респираторной и цитоплазматической нитритредуктазы у *E. coli*, позволяют объяснить наблюдаемую скорость утилизации нитрита в хемостате при концентрации субстрата в среде выше 2 мМ и не достаточны для объяснения таковой при концентрациях ниже 2 мМ.
2. Мембранный потенциал является достаточным механизмом регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli*, обеспечивающим необходимую скорость утилизации нитрита в хемостате при концентрации субстрата в среде ниже 2 мМ.

Апробация работы. Материалы настоящей работы были представлены на отчетной сессии Института цитологии и генетики СО РАН в 2017 году. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: 7-й, 10-й и 12-й Международных конференциях по биоинформатике регуляции и структуры генома\системной биологии (BGRS\SB 2010, 2016, 2018; Новосибирск), IV и V Международных конференциях «Математическая биология и биоинформатика»

(ICMBV 2012, 2014; Пущино), 9-й международной школе молодых ученых «Systems Biology and Bioinformatics» (2017, Ялта, Республика Крым, Россия).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, двух глав результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы (237 наименования). Материал изложен на 155 страницах и содержит 8 таблиц и 27 рисунков.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором лично.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них пять в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и восемь работ в сборниках тезисов конференций.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Т.М. Хлебодаровой и научному консультанту д.б.н. В.А. Лихошваю за помощь в работе и плодотворное обсуждение, а также к.б.н. С.А. Лашину и к.б.н. А.С. Розанову за ценные советы и замечания.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы посвящен анализу существующих данных о структурно-функциональных организациях цепей переноса электронов у *E. coli* с акцентом на организацию респираторной системы в условиях анаэробного дыхания на нитрате и нитрите. Подробно описана организация системы утилизации нитрита в клетке *E. coli*, состоящей из респираторной и ассимиляционной систем, а также описаны молекулярные механизмы регуляции генов, кодирующих ферменты утилизации и транспорта нитрита. Заключительная часть посвящена описанию существующих подходов к моделированию процессов клеточного дыхания и обзору существующих моделей респираторных систем как у прокариот, так и у эукариот.

Глава 2. Исследование механизмов регуляции скорости утилизации нитрита клетками *E. coli*

Глава 2 посвящена разработке и исследованию динамических свойств модели, которая описывает процессы утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*, культивируемой в глюкозо-лимитированных условиях хемостата. Было разработано два варианта модели: M1 (базовый) и M2 (расширенный). Модели были адаптированы к экспериментальным данным по динамике экспрессии *nrfA* и *nirB* генов, кодирующих структуру Nrf и NirB нитритредуктаз [Wang, Gunsalus, 2000].

Для верификации моделей были использованы экспериментальные данные по кинетике накопления нитрита в хемостате [Wang et al., 1999].

Раздел 2.1 описывает методы моделирования, расчета и анализа. Для описания процессов регуляции транскрипции оперонов, кодирующих субъединицы нитритредуктаз и транспортера, соответствующие подмодели были разработаны в терминах элементарных подсистем с использованием обобщенных функций Хилла [Likhoshvai, Ratushny, 2007]. Объединение подмоделей проходило на основе закона суммирования локальных скоростей. Моделирование процессов, протекающих в клетке *E. coli*, проводилось в предположении квазистационарности протекания элементарных процессов. При решении задачи Коши для системы обыкновенных дифференциальных уравнений был использован метод Гира, реализованный в пакетах Mathematica и STEP [Фадеев, Гайнова, 1994]. В качестве начальных условий для задачи Коши были взяты значения переменных в отсутствие добавленного нитрита, тем самым были воспроизведены условия эксперимента, приведенного в работе [Wang et al., 1999], по добавлению нитрита в хемостат, поддерживающего культивацию бактерий в среде без нитрита.

Раздел 2.2 посвящен разработке и анализу динамических свойств базовой модели M1. Модель M1 представляет собой систему из двух уравнений, описывающих динамику накопления нитрита в хемостате (u) и внутри клеток *E. coli* (w) в зависимости от концентрации подаваемого субстрата в хемостат (s):

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

где V – скорости утилизации нитрита, обозначения которых представлены в подписи к рис. 1, C – доля объема клеточной культуры к объему питательной среды.

Схема метаболических процессов, проходящих в *E. coli* при культивировании бактерий в хемостате, которые описаны в модели M1, представлены на рис. 1.

В модели M1 принято, что активности Nrf, NirB редуктаз и NirC транспортера в клетке пропорциональны относительной активности химерных белков NrfA- β -gal и NirB- β -gal, уровень синтеза которых определяется активностью *nrfAB* и *nirBCD* оперонов соответственно. Относительные активности этих оперонов были аппроксимированы обобщенными функциями Хилла m_{Nrf} и m_{Nir} , зависящими от текущей концентрации нитрита в хемостате (u). Результаты аппроксимации этими функциями экспериментальных данных по активности химерных белков NrfA- β -gal

и NirB-β-gal показаны на рис. 2. Значения параметров функций $m_{Nrf}(u)$ и $m_{Nir}(u)$ были оценены методом наименьших квадратов.

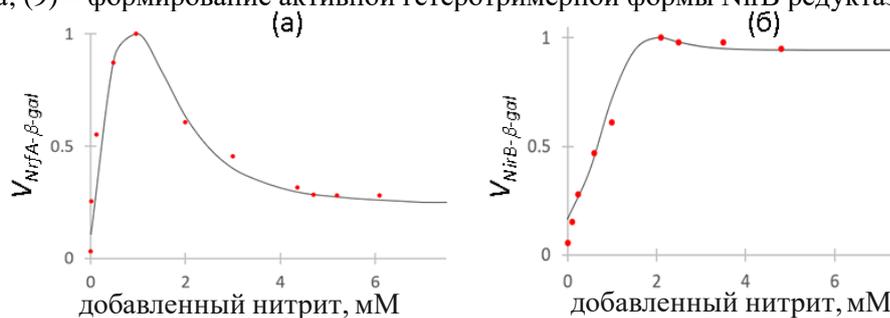
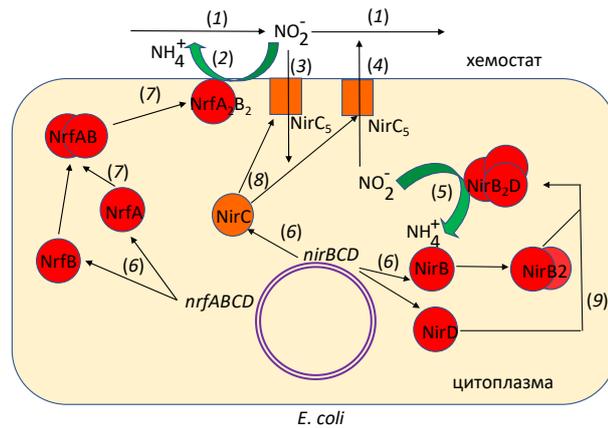


Рис. 2. Относительные концентрации белков NrfA-β-gal (а) и NirB-β-gal (б), значения которых приведены в работе [Wang, Gunsalus, 2000], в зависимости от концентрации нитрита в хемостате. Точки – экспериментальные данные, сплошная линия – теоретические расчеты. Ось абсцисс – концентрация нитрита в хемостате (мМ), ось ординат – относительная активность химерного белка. Концентрация нитрита в хемостате, использованная в качестве шкалы измерения по оси абсцисс, вычислена на основании данных работы [Wang, Gunsalus, 2000].

Скорости ферментативных реакций утилизации ($V_{Nrf}(u)$, $V_{NirB}(w)$) и транспорта ($V_{NirC,in}(u)$, $V_{NirC,out}(u,w)$) нитрита описаны с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Их оценка сделана на основании экспериментальных данных о механизмах реакций, контролируемых Nrf [Clarke et al., 2008; van Wonderen et al., 2008; Kemp et al., 2010] и NirB [Coleman et al., 1978a,б] редуктазами. Параметры транспорта были оценены при адаптации модели M1 к данным [Wang, Gunsalus, 2000]. Доля объема, занимаемого культурой *E. coli* в хемостате (параметр C), оценена на основании данных [Wang et al., 1999; Wright, Lockhart, 1965].

Результаты расчетов модели по оценке скоростей вне- и внутриклеточной утилизации нитрита Nrf и NirV редуктазами показаны на рис. 3а красной и черной кривыми соответственно. Видно, что при добавлении более 3 мМ нитрита в среду скорость внутриклеточной утилизации нитрита адекватно описывается активностью NirV редуктазы, сопряженной с активностью NirC транспортера, что согласуется с данными о механизмах регуляции транскрипции *nir* оперона, кодирующего субъединицы этих ферментов, в зависимости от концентрации нитрита [Harborne et al., 1992; Wang et al., 1999].

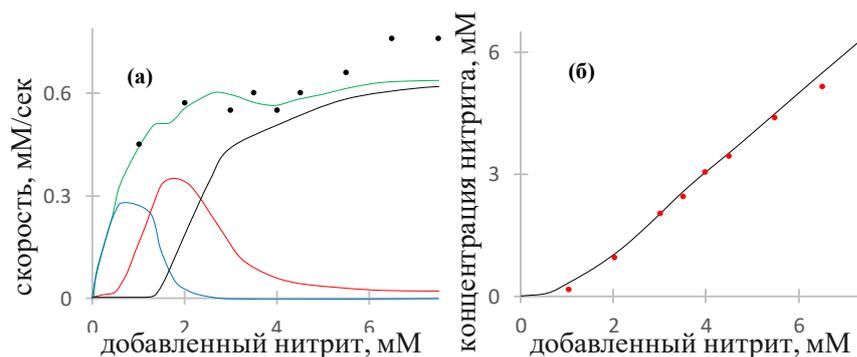


Рис. 3. (а) – зависимость скорости (V) утилизации нитрита от концентрации добавленного в хеостат нитрита. Точки – экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита популяцией клеток, вычисленные по данным, представленным в работе [Wang et al., 1999], кривые – расчет по модели: красная и черная – скорости утилизации нитрита Nrf и NirV редуктазами соответственно; синяя – дополнительная нитрит-утилизирующая активность V_{add} ; зеленая – общая скорость утилизации нитрита (совместное действие V_{nrf} , V_{nirV} и V_{add}). (б) – зависимость стационарной концентрации нитрита в хеостате от концентрации добавленного нитрита. Точки – экспериментальные данные [Wang et al., 1999]. Кривая – расчет по модели M1 с учетом V_{add} .

Что касается области, где концентрация нитрита составляет менее 2 мМ, то, как следует из результатов моделирования, в данной области кривая скорости утилизации нитрита, рассчитанная на основе генетических данных о механизмах регуляции экспрессии *nrf* оперона (рис. 3а, красная кривая) [Wang, Gunsalus, 2000], лежит существенно ниже таковой, рассчитанной на основе экспериментальных данных по кинетике утилизации нитрита в хеостате (рис. 3а, зеленая кривая) [Wang et al., 1999]. То есть простая оценка активности Nrf фермента по концентрации белка в цитоплазме клетки, основанная на активности химерного белка NrfA- β -gal [Wang, Gunsalus, 2000], которая была использована в модели M1, не позволяет корректно описать кинетику утилизации нитрита в хеостате при его концентрации в среде ниже 1 мМ. Согласно результатам моделирования, для корректного описания кинетики накопления нитрита в хеостате (рис. 3б) в данной области концентраций нитрита требуется дополнительная нитрит-утилизирующая активность (V_{add})

(рис. 3а, синяя кривая), которая сопоставима с максимальной скоростью функционирования Nrf фермента [Wang, Gunsalus, 2000].

Таким образом, модель M1 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 была высказана гипотеза о наличии дополнительных источников нитрит-утилизирующей активности в области 0–1 мМ нитрита. Некоторые косвенные данные позволили предположить, что они могут быть связаны со свойствами Nrf фермента как периплазматического белка, участвующего в формировании протонного градиента, каталитические свойства которого и скорость секреции в периплазму зависят от наличия электрического потенциала на мембране клетки [Daniels et al., 1981; van Wonderen et al., 2008; Price, Driessen, 2010], а величина мембранного потенциала зависит от концентрации нитрита [Motteram et al., 1981]. Следующий раздел посвящен проверке данной гипотезы.

Раздел 2.3 посвящен разработке и анализу динамических свойств математической модели M2 утилизации нитрита в хеостате, которая, в отличие от модели M1, является двухкомпарментной. В модели M2 процессы регуляции эффективности экспрессии *nrf* и *nir* оперонов описаны аналогично таковым в модели M1 и дополнительно реализованы следующие предположения: 1) Nrf фермент транспортируется из цитоплазмы в периплазму в виде мономеров, субъединиц NrfA и NrfB, синтез которых происходит в цитоплазме; 2) скорость транспорта субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму зависит от наличия и величины электрического потенциала на мембране клетки; 3) наличие мембранного потенциала обеспечивает сборку и правильную ориентацию фермента в пространстве периплазмы; 4) величина мембранного потенциала зависит от концентрации нитрита. Процесс формирования мембранного потенциала в зависимости от концентрации нитрита описан в модели M2 феноменологической функцией из класса обобщенных функций Хилла [Likhoshvai et al., 2007], которая была адаптирована к данным работы [Motteram et al., 1981].

В отличие от модели M1, в которой концентрации белковых комплексов рассматриваются в стационаре, в модели M2 процессы формирования белковых комплексов, ферментативные реакции, транспорт из цитоплазмы в периплазму, деградация белков и их комплексов описаны биохимическими неравновесными

реакциями. Модель состоит из 11 подсистем, которые собраны в итоговую модель на основе суммирования локальных скоростей элементарных процессов.

Итоговая система модели M2 состоит из 18 обыкновенных дифференциальных уравнений, которые описывают концентрации внеклеточного и внутриклеточного нитрита, а также концентрации субъединиц ферментов утилизации и транспорта нитрита и их активных комплексов в цитоплазме и периплазме.

Оценка параметров модели M2, дополнительных к модели M1, была сделана как на основе опубликованных данных, так и в процессе адаптации модели M2 к экспериментальным данным по кинетике накопления нитрита в хемостате [Wang et al., 1999]. Так, соотношение объема периплазмы к цитоплазме клетки *E. coli* было оценено по данным, опубликованным в работах [Wright, Lockhart, 1965; Stock et al., 1977; Graham et al., 1991;]. Скорости деградации внутриклеточных белков и их комплексов оценивались исходя из времени полужизни общего пула цитоплазматических белков *E. coli* [Mosteller et al., 1980], а периплазматических – исходя из данных, представленных в работе [Talmadge, Gilbert 1982]. Значения констант скоростей формирования комплексов NrfAB, NrfA₂B₂, NirC₅, NirB₂ и NirB₂D были оценены на основе косвенных данных по кинетике белок-белковых взаимодействий [Northrup, Erickson, 1992]. Значения констант скоростей диссоциации для димерной и тетрамерной форм Nrf редуктазы были определены из данных, представленных в работе [Clarke et al., 2007].

Результаты расчета модели M2, приведенные на рис. 4а показывают, что заложенные в модель механизмы и постулаты позволили достичь хорошей степени адаптации модели к экспериментальным данным по динамике накопления нитрита в хемостате. Рассчитанные по модели M2 скорости утилизации нитрита Nrf редуктазой без влияния и с учетом влияния мембранного потенциала (рис. 4б, красная штриховая и сплошная линии соответственно) на транспорт субъединиц подтверждают вывод, полученный на основе модели M1 о недостаточности активности Nrf нитритредуктазы, оцененной из данных по экспрессии *nrf* оперона [Wang et al., 1999] (рис. 4б, точка: 1 мМ добавленного нитрита).

В то же время, как следует из результатов моделирования, показанных на рис. 4б, учет влияния мембранного потенциала на секрецию Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму позволяет корректно описать экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита в хемостате при концентрации добавленного нитрита меньше 1 мМ (красная сплошная кривая).

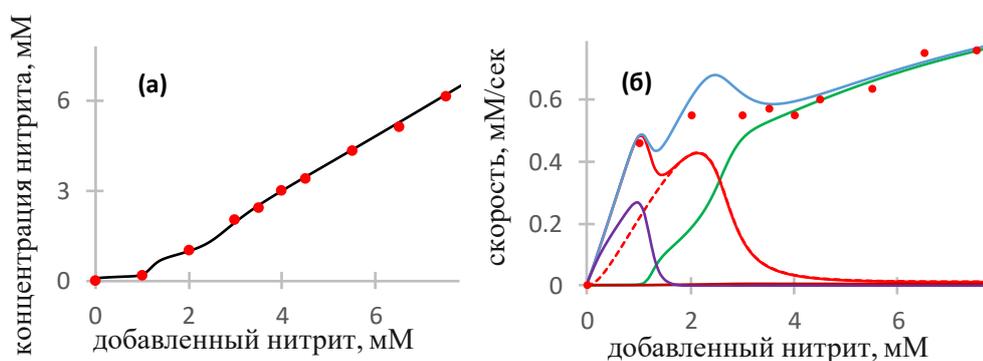


Рис. 4. (а) – зависимость стационарной концентрации нитрита в хемостате (мМ) от концентрации добавленного нитрита. Кривая – расчет по модели M2, точки – экспериментальные данные из работы [Wang et al., 1999]. (б) – вклад различных компонентов системы утилизации и транспорта нитрита в динамику его накопления в хемостате в зависимости от концентрации добавленного нитрита. Точки – экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита популяцией клеток, вычисленные по данным, представленным в работе [Wang et al., 1999]. Кривые – результаты расчетов по модели M2: красная сплошная – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой; зеленая – скорость утилизации нитрита NirB редуктазой; синяя – общая скорость утилизации нитрита клетками *E. coli*; красная пунктирная – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой, рассчитанная без учета влияния мембранного потенциала на скорость секреции белков NirA и NirB.

Таким образом, показано, что при низких концентрациях нитрита локальное изменение концентрации фермента при переходе из цитоплазмы в периплазматическое пространство клетки под действием мембранного потенциала достаточно для формирования более высокой активности Nrf редуктазы в периплазме, чем это можно было ожидать исходя из данных по уровню экспрессии *nrf* оперона [Wang et al., 1999].

Вместе с тем необходимо отметить, что представление мембранного потенциала в модели M2 в виде функции, зависящей от нитрита, по сути, объединяет в себе описание совокупности процессов влияния нитрита на концентрацию ферментов, участвующих в цепи переноса электронов, и процессов каталитической активности этих ферментов по переносу протонов через мембрану, но не раскрывает молекулярно-генетических механизмов его формирования. Поэтому для подтверждения выдвинутой гипотезы об участии мембранного потенциала в регуляции активности Nrf нитритредуктазы необходимо воспроизвести молекулярно-генетические механизмы его формирования в условиях дыхания на нитрите, которые пока до конца не ясны, и исследовать вклад мембранного потенциала в кинетику утилизации нитрита в хемостате. Этому посвящена глава 3.

Глава 3 Реконструкция молекулярно-генетических механизмов формирования мембранного потенциала в условиях роста клеток *E. coli* на нитрите

У *E. coli*, в условиях дыхания на нитрите, периплазматическая Nrf редуктаза является основным ферментом, который перерабатывает нитрит при концентрациях субстрата в среде ниже 2 мМ и участвует в формировании протонного градиента. В настоящий момент конкретных экспериментальных данных о структуре дыхательной цепи в условиях дыхания на нитрите нет. Известно, что донором электронов для Nrf редуктазы служит формат, который является продуктом гликолиза и у *E. coli* перерабатывается тремя форматдегидрогеназами: Fdh-H, Fdh-N, Fdh-O. Две из них, Fdh-N и Fdh-O, способны формировать цепь передачи электронов от формата к нитриту через механизм окислительно-восстановительной петли [Abou-Jaoudé et al., 1979]. Однако в условиях хемостата, как было показано [Wang et al., 2003], Fdh-N и Fdh-O ферменты практически не синтезируются, и значимой активностью обладает только Fdh-H форматдегидрогеназа. Это позволило предположить [Wang et al., 2003], что именно эта форматдегидрогеназа может обеспечивать респираторные процессы в условиях хемостата, однако механизм ее участия к настоящему моменту экспериментально не изучен. Известно, что 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 [Andrews et al., 1997; McDowall et al., 2014]. На основе имеющихся экспериментальных данных были рассмотрены два сценария формирования цепи передачи электронов с участием FHL-1 и FHL-2 комплексов, которые показаны на рис. 5.

В первом сценарии рассматривается опосредованное участие FHL-1 комплекса, поскольку он не способен напрямую связываться с хинонами и формировать респираторную цепь. Согласно этому сценарию, в результате сопряженной активности FHL-1 комплекса из формата в цитоплазме синтезируется молекулярный водород (H_2), который в отсутствие электронных акцепторов выводится из клетки и накапливается в среде. В респираторных условиях, в присутствии электронных акцепторов, этот водород может быть использован респираторной гидрогеназой Hyd-2 (рис. 5а).

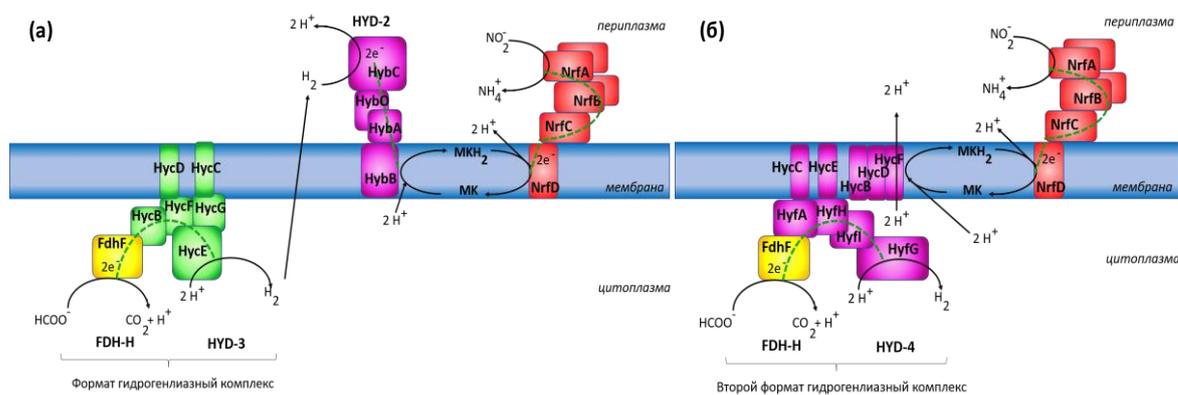


Рис. 5. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-1 (а) и FHL-2 (б) комплексов в условиях дыхания на нитрите. Зелеными пунктирными линиями показан возможный путь передачи электронов от формата через хиноны к нитриту.

Сценарий «2» (рис. 5б) предполагает участие FHL-2 форматдегидрогеназного комплекса за счет его способности связываться с хинонами и переносить протоны в периплазму через протон-транслоцирующий канал. Оба факта были предсказаны на основе гомологии с другими дыхательными ферментами [Andrews et al., 1997; Skibinski et al., 2002; Efremov, Sazanov, 2012]. По сути, оба сценария являются гипотетическими, поскольку экспериментально не были исследованы.

Для доказательства участия мембранного потенциала в регуляции активности респираторной Nrf редуктазы была создана математическая модель на базе модели M2, дополненная подсистемами, описывающими молекулярно-генетические и метаболические процессы формирования протонного градиента в условиях дыхания на нитрите согласно предложенным сценариям с участием FHL-1 и FHL-2 форматлиазных комплексов. В результате были созданы модели M2/3 (по сценарию 1) и M2/4 (по сценарию 2), состоящие из 38 и 36 уравнений соответственно.

В моделях M2/3 и M2/4 принято, что концентрация Fdh-H фермента в цитоплазме клетки пропорциональна относительной активности химерного белка FdhF-β-gal [Wang, Gunsalus, 2003]. Зависимость экспрессии *fdhF* оперона от концентрации нитрита описана аналогично таковой для *nrf* и *nir* оперонов и адаптирована к экспериментальным данным [Wang, Gunsalus, 2003].

В моделях M2/3 и M2/4 введен ряд предположений о негативной регуляции экспрессии оперонов *hyc*, *hyb* и *hyf*, кодирующих структуру гидрогеназ Hyd-3, Hyd-2 и Hyd-4. Эти предположения основаны на данных о негативном влиянии нитрата и/или нитрита на транскрипцию всех других оперонов, вовлеченных в нитрат-нитритную респираторную систему [Hopper et al., 1994, Richard et al., 1999], и единой

структуре двухкомпонентных регуляторных систем (NarL/NarQ и NarP/NarX), чувствительных как к нитрату, так и к нитриту.

В моделях M2/3 и M2/4 значение мембранного потенциала определялось не феноменологической функцией, как в модели M2, а введено через соотношение концентраций протонов в периплазме и цитоплазме. В условиях хемостата pH среды поддерживается постоянным и равным 6.5 [Wang et al., 1999], что и определяет концентрацию протонов в периплазме, равную $3 \cdot 10^{-4}$ 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.

Результаты численных расчетов моделей M2/3 и M2/4 показаны на рис. 6а и рис. 6б соответственно.

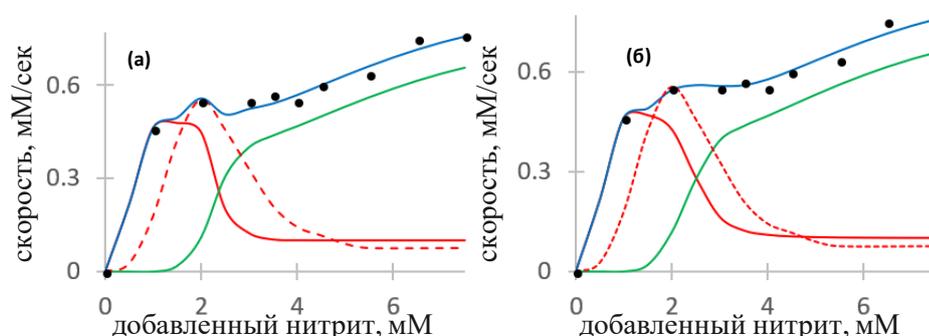


Рис. 6. Скорость переработки нитрита (мМ/сек) культурой клеток *E. coli* в зависимости от концентрации добавленного в хемостат нитрита (мМ), рассчитанная по моделям M2/3 (а) и M2/4 (б). Точки – скорость утилизации нитрита клетками *E. coli* в хемостате, рассчитанная по данным [Wang, Gunsalus, 2000]. Кривые – расчеты по модели: красная сплошная линия – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой; зеленая – скорость утилизации нитрита NirB редуктазой; голубая – общая скорость переработки нитрита; красная пунктирная – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой, рассчитанная по модели M1.

Из результатов моделирования, представленных на рис. 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 гипотезы о влиянии мембранного потенциала на скорость утилизации нитрита в области низких (~1 мМ) концентраций субстрата. Видно также, 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, было доказано, что включение конкретных молекулярно-генетических и метаболических процессов, ведущих к формированию мембранного потенциала, в модель утилизации нитрита позволяет корректно описать экспериментальные данные по кинетике его утилизации в хемостате.

В целом полученные данные подтверждают важную роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы при концентрациях нитрита в среде ≤ 1 мМ. Не исключено, что этот механизм имеет более широкое распространение и может быть важен для других периплазматических ферментов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана математическая модель (M1) утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитированных условиях хемостата, учитывающая механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит.
2. Показано, что учтенные в модели (M1) молекулярно-генетические и биохимические механизмы утилизации нитрита достаточны для адекватного описания экспериментально наблюдаемой динамики его накопления в хемостате при концентрациях добавленного в среду нитрита выше 2 мМ.
3. Установлено, что при концентрациях добавленного нитрита менее 2 мМ активность Nrf нитритредуктазы, прогнозируемая на основе молекулярно-генетических данных, обеспечивает только около 50% экспериментально наблюдаемой нитрит утилизирующей активности.
4. Предложена гипотеза, объясняющая возникновение дополнительной нитрит утилизирующей активности при концентрациях добавленного нитрита менее 2 мМ локальным повышением концентрации Nrf нитритредуктазы в периплазме при активизации перехода субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи.
5. На основе модели (M1) разработана двухкомпарментная математическая модель (M2) утилизации нитрита в хемостате, в которой дополнительно учтены процесс транспорта субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и зависимость его скорости от наличия и величины мембранного потенциала.

6. Показано, что учтенные в модели M2 данные по кинетике формирования мембранного потенциала в зависимости от концентрации нитрита достаточны для корректного описания динамики накопления нитрита в хемостате, что позволяет считать мембранный потенциал существенным компонентом в механизме регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli* при концентрациях добавленного нитрита в среде менее 1 мМ.
7. Реконструированы вероятные сценарии формирования электрического потенциала на мембране клеток *E. coli* в условиях дыхания на нитрите с участием форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2 и разработаны соответствующие модели. Показано, что модель (M2), сопряженная с процессами формирования мембранного потенциала, корректно воспроизводит динамику утилизации нитрита клетками *E. coli* в проточном хемостате независимо от сценария формирования потенциала, что дополнительно подтверждает важную роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи в журналах

1. Ри Н.А., Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Мембранный потенциал как механизм регуляции активности периплазматической нитритредуктазы: математическая модель // Матем. Биол. Биоинформ. – 2018. – Т. 13. – №2. – С. 238-269.
2. Kazantsev F., Akberdin I., Lashin S., Ree N., Timonov V., Ratushny A., Khlebodarova T., Likhoshvai V. MAMMOTh: A new database for curated mathematical models of biomolecular systems // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2018. – V. 16. – Article No. 1740010.
3. 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 1:7.
4. Ри Н.А., Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста // Матем. Биол. Биоинформ. – 2015. – Т.10. – №1. – С. 193-205.
5. Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., Ри Н.А., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков // Матем. Биол. Биоинформ. – 2013. – Т.8. – №1. – С. 276-294.

Материалы конференций

1. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. The mathematical modeling of nitrite metabolism regulation in *Escherichia coli* cell during nitrate respiration under anaerobic conditions. «The 7th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia), 2010, p. 242.
2. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Математическое моделирование метаболизма нитрита при культивировании клеток *Escherichia coli* в проточном хемостате. IV МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), 2012, с. 117-118.
3. Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Ермак Т.В., Ри Н.А. Компьютерное моделирование динамики функционирования молекулярно-генетических систем *Escherichia coli*. IV МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), 2012, с.108-109.
4. Akberdin I.R., Kazantsev F.V., Ree N.A. Modeling and analysis of dynamics of the gene networks: automatic generation and storage in a new database. «Международный микросимпозиум Syspatho», (Санкт-Петербург, Россия), 2012, с. 67-68.
5. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при микромолярных концентрациях субстрата в хемостате. Доклады V МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), 2014, с.114-115.
6. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Role of membrane potential in nitrite utilization by *Escherichia coli* cells under low substrate concentration: the mathematical model. «The 10th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia), 2016, p. 252.
7. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Membrane potential as a new factor, modulating periplasmic nitrite reductase activity. «Ninth International Young Scientists School Systems Biology and Bioinformatics». (Yalta, Republic of the Crimea, Russia), 2017, p.56-57.
8. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Mathematical model of membrane potential formation at *E. coli* growth on nitrite. «The 12th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia), 2018, p. 60.