



# **Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования**

**РИ НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

научный руководитель д.б.н., в.н.с. ХЛЕБОДАРОВА Т.М.

**специальность математическая биология,  
биоинформатика (03.01.09)**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

# СИСТЕМА УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА БАКТЕРИЕЙ *E. coli*

Работа посвящена исследованию динамических аспектов функционирования молекулярно-генетической системы утилизации нитрита бактерией *E. coli*.

## Актуальность

- Нитрит - часть нитратной респираторной системы. Нитрат является наиболее энергетически выгодным акцептором электронов, в связи с чем дыхание на нитрате предпочтительно в присутствии субстрата.
- 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.
- Несмотря на токсичность нитрита, клетки *E. coli* растут в условиях культивирования на нитрите и используют его для синтеза АТФ, хотя и с меньшей эффективностью, чем нитрат
- 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

# СХЕМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА БАКТЕРИЕЙ *E. coli*

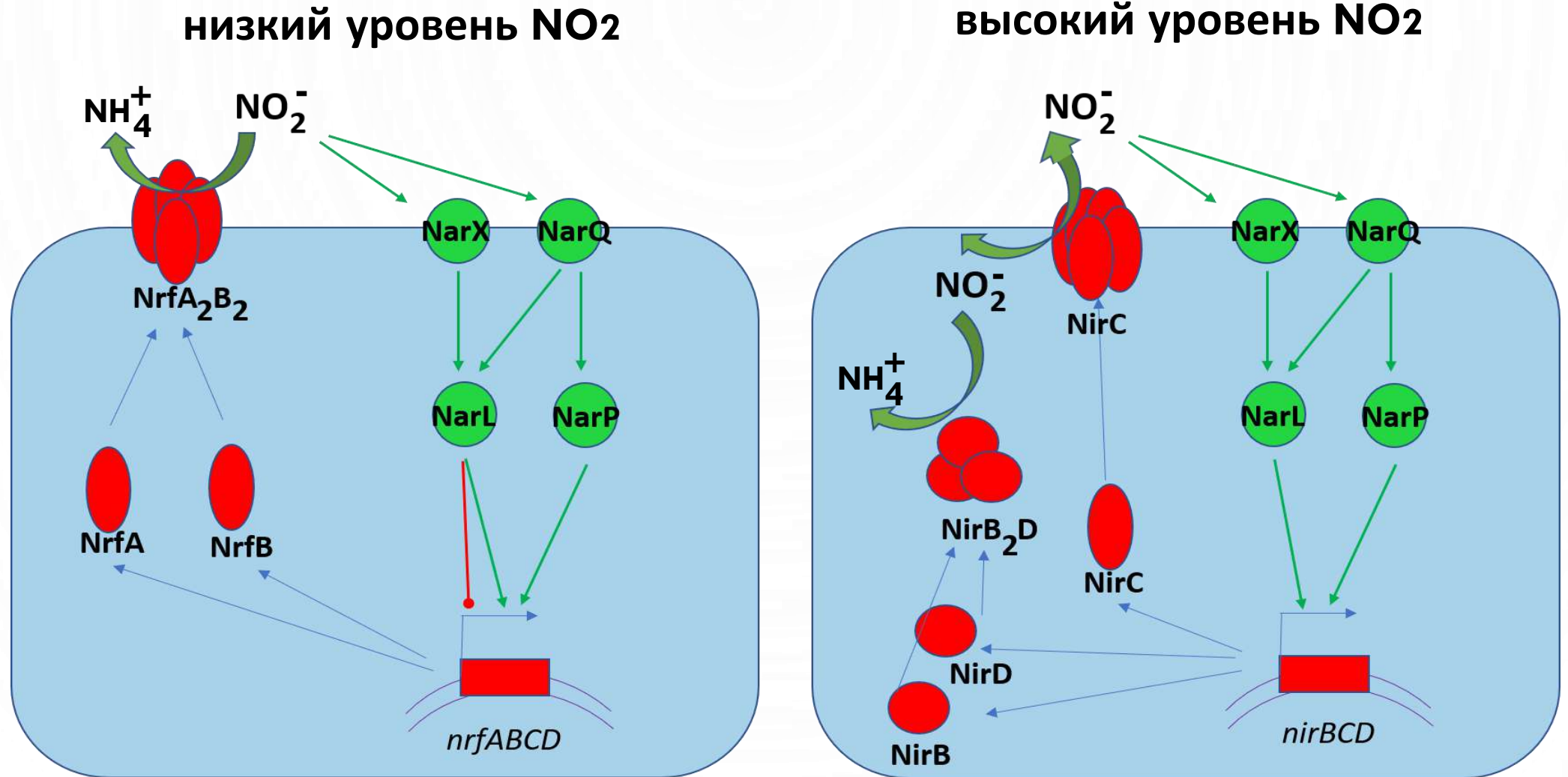
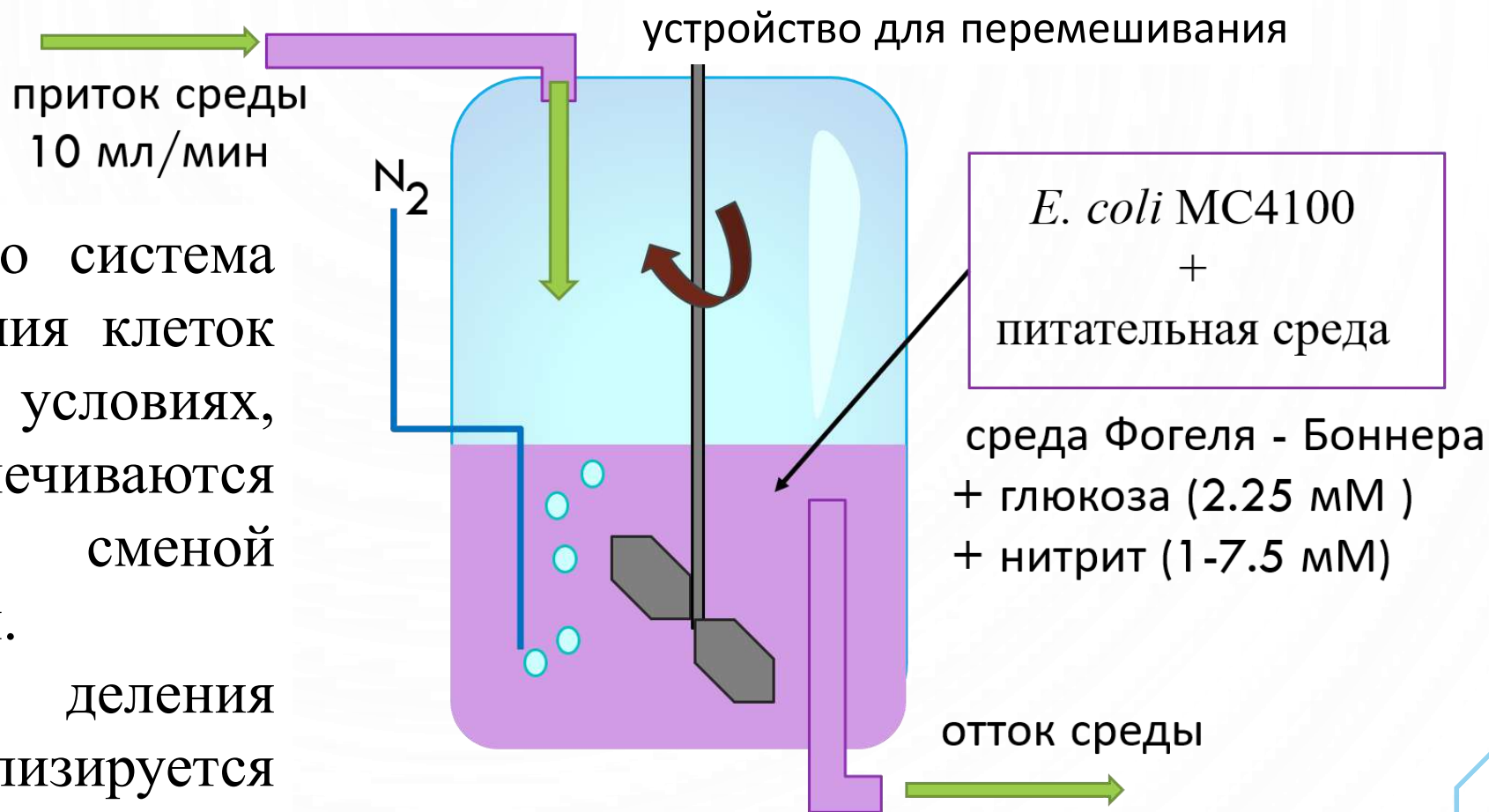


Схема построена на основании существующих экспериментальных данных

# СХЕМА РАБОТЫ ХЕМОСТАТА

Хемостат – это система для культивирования клеток в стационарных условиях, которые обеспечиваются постоянной сменой питательной среды.

Скорость деления бактерий стабилизируется низким уровнем глюкозы в среде.



На схеме показаны условия проведения экспериментов в работе [Wang et al., 1999]

## Цель

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.

## 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.

## Задачи

5. 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.

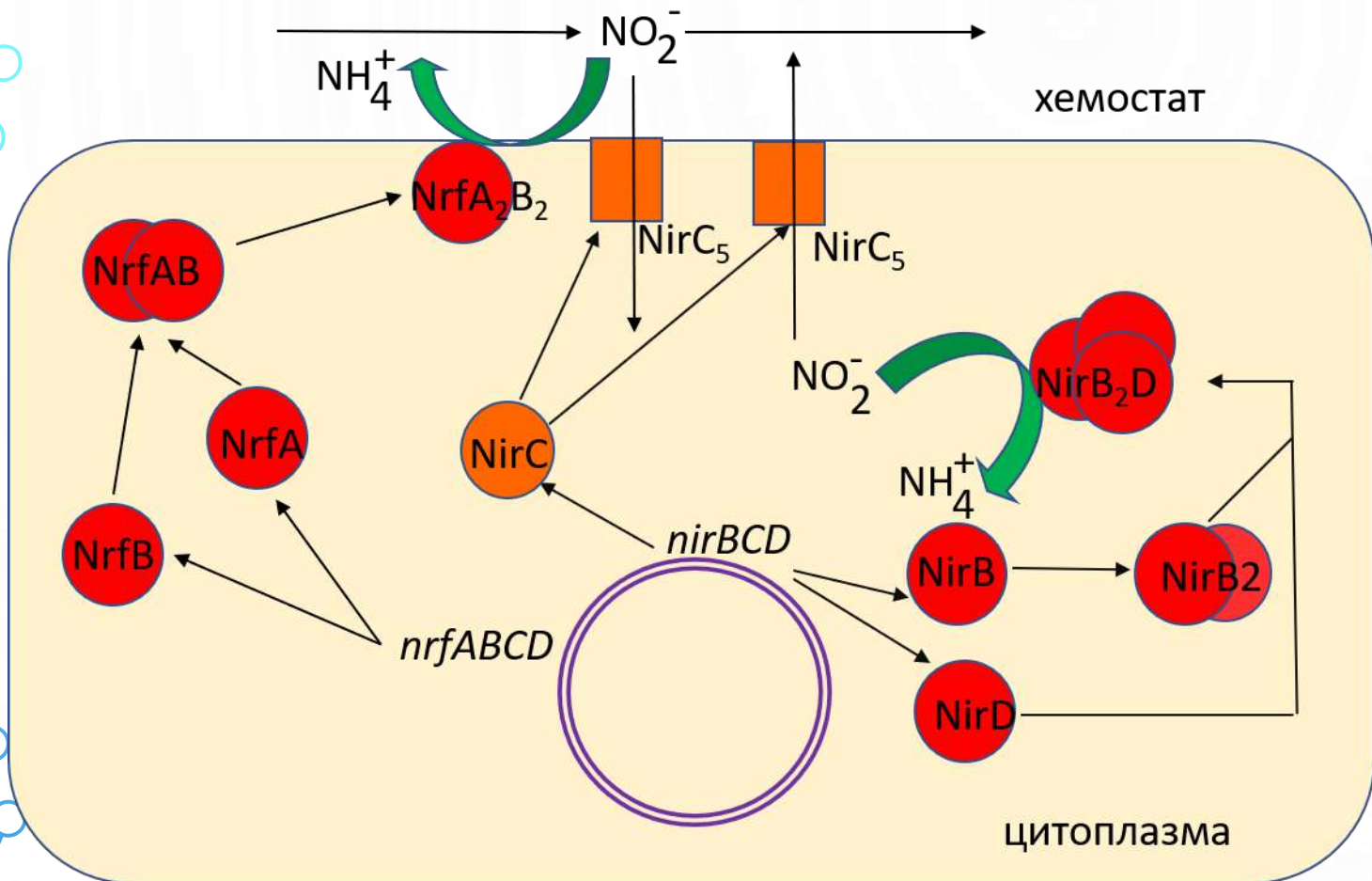
6. Исследовать вклад мембранного потенциала в регуляцию активности респираторной Nrf нитритредуктазы в условиях стационарного роста и дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.

# ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

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



# СХЕМА ПРОЦЕССОВ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli* (M1)



## Основные принципы M1

1. Нитрит поступает и выходит из системы хемостата с постоянной скоростью.
2. Концентрации белков, нарабатываемых с одного оперона, равны ( $\text{NrfA}=\text{NrfB}$ ,  $\text{NirB}=\text{NirD}$ )
3. Импорт и экспорт нитрита происходит за счет NirC транспортера

# МОДЕЛЬ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli* (M1)

$$\begin{cases} u' = k_{flow}s + CV_{NirC,out}(u, w) - C(V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u)) - k_{flow}u, \\ w' = V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u, w) - V_{NirB}(u, w) - k_{flow}w \\ u[0] = u_0 \\ w[0] = w_0 \end{cases}$$

$V_{Nrf}(u)$  – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой

$V_{NirB}(u, w)$  – скорость утилизации нитрита NirB редуктазой

$V_{NirC,in}(u)$  – скорость импорта нитрита NirC транспортером

$V_{NirC,out}(u, w)$  – скорость экспорта нитрита NirC транспортером

$u$  – концентрация нитрита в хемостате

$w$  – внутриклеточная концентрация нитрита

$s$  – концентрация добавленного нитрита

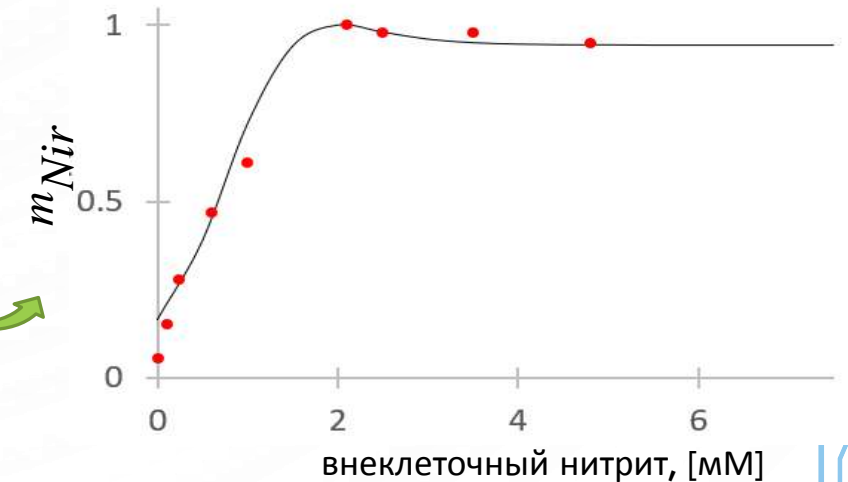
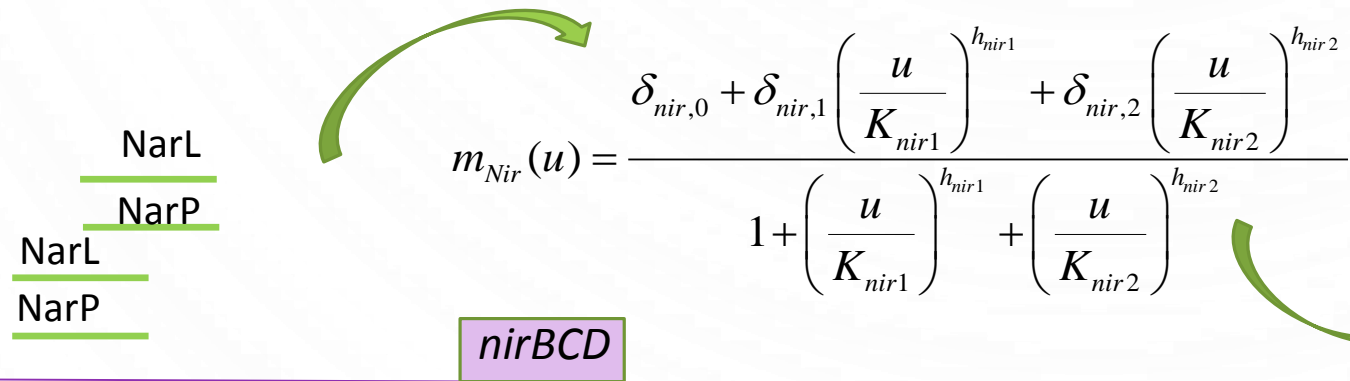
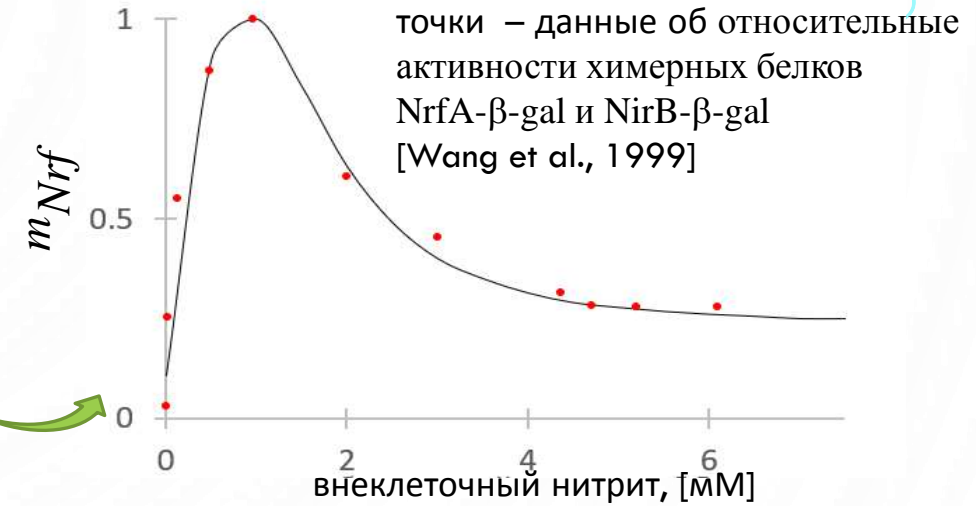
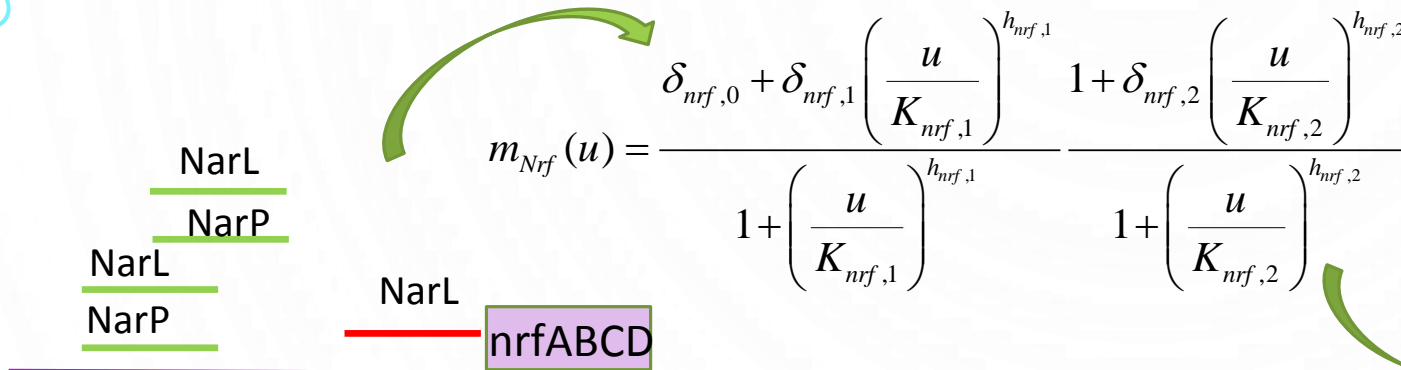
$k_{flow}$  – скорость протока субстратов

$C$  – доля объема клеток в хемостате

Скорости, которые устанавливаются при достижении системой равновесия представляют из себя функции, сложным образом зависящие от уровня экспрессии оперонов *nrf* и *nir*

# МОДЕЛЬ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli* (M1)

Адаптация подсистемы влияния нитрита на уровень экспрессии оперонов *nrf* и *nir*



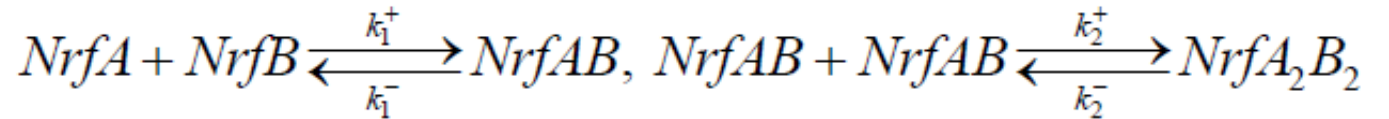
Расчеты модели проводились в пакете Mathematica и STEP

# СКОРОСТЬ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА NRf НИТРИТРЕДУКТАЗОЙ

механизм реакции описывался уравнением Михаэлиса-Ментен

Структура активной формы фермента

$$V_{Nr_f}(u) = k_{cat_{Nr_f}} \frac{u \cdot d(u)}{K m_{Nr_f} + u}$$



$$d(u) = c(u) / k_2$$

$d$  – внутриклеточная концентрация активной гетеротетрамерной формы фермента  $Nr_fA_2B_2$

$c$  – внутриклеточная концентрация комплекса  $Nr_fAB$

$a, b$  – внутриклеточные концентрации свободных белков-мономеров  $Nr_fA$  и  $Nr_fB$

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

$k_1^+, k_2^+$  и  $k_1^-, k_2^-$  – константы прямых и обратных реакций

$$-\frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_2^2}{2} + \frac{4b_1}{3} - \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} - \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt{2}}} + \frac{8c_1 - 4k_2b_1 - k_2^3}{4\sqrt{\frac{k_2^2}{4} + \frac{2b_1}{3} + \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} + \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt{2}}}}$$

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

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

$$R = \sqrt[3]{2} (b_1^2 + 12d_1 + 3k_2c_1),$$

$$Q = \sqrt{(27c_1^2 - 2b_1^3 + 72b_1d_1 - 9k_2b_1c_1 + 27k_2^2d_1)^2 - 4(b_1^2 + 12d_1 + 3k_2c_1)^3},$$

$$P = Q - 2b_1^3 + 27c_1^2 + 72b_1d_1 - 9k_2b_1c_1 + 27k_2^2d_1.$$

$$a_0 = C_{Nr_fA, \max} m_{Nr_f}(u), \quad b_0 = C_{Nr_fB, \max} m_{Nr_f}(u)$$

Использование уравнение Михаэлис-Ментен основано на данных из работы [Clarke et al., 2008]

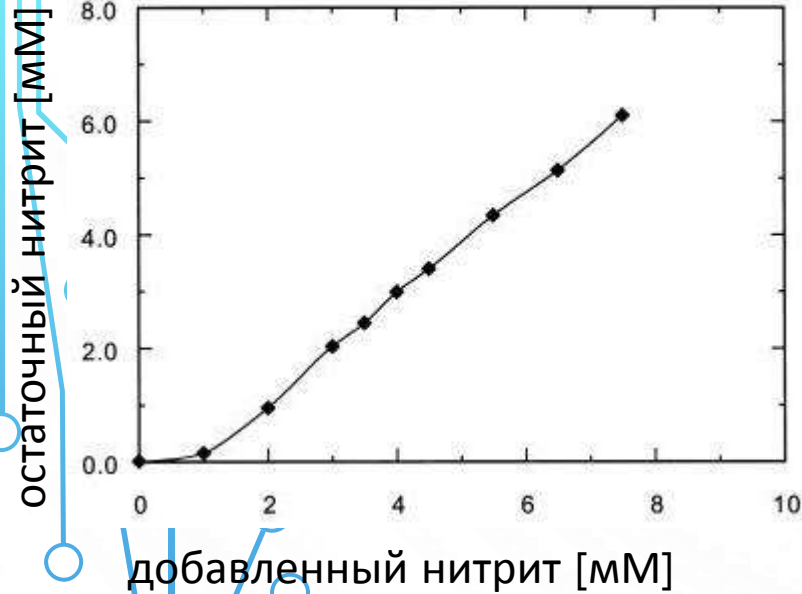
# РАСЧЕТ СКОРОСТИ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА В ХЕМОСТАТЕ

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Sept. 1999, p. 5303-5308  
0021-9193/99/\$04.00+0  
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 181, No. 17

The *napF* and *narG* Nitrate Reductase Operons in *Escherichia coli* Are Differentially Expressed in Response to Submicromolar Concentrations of Nitrate but Not Nitrite

HENIAN WANG, CHING-PING TSENG,<sup>†</sup> AND ROBERT P. GUNSALUS\*



$$\frac{du}{dt} = k_{flow} \cdot s - k_{flow} \cdot u - C \cdot V_{общ}$$

В стационарных условиях

$$k_{flow} \cdot (s - u) - C \cdot V_{общ} = 0$$

$$V_{общ} = \frac{k_{flow} \cdot (s - u)}{C}$$

$u$  – концентрация нитрита в хемотрате

$s$  – концентрация добавленного нитрита

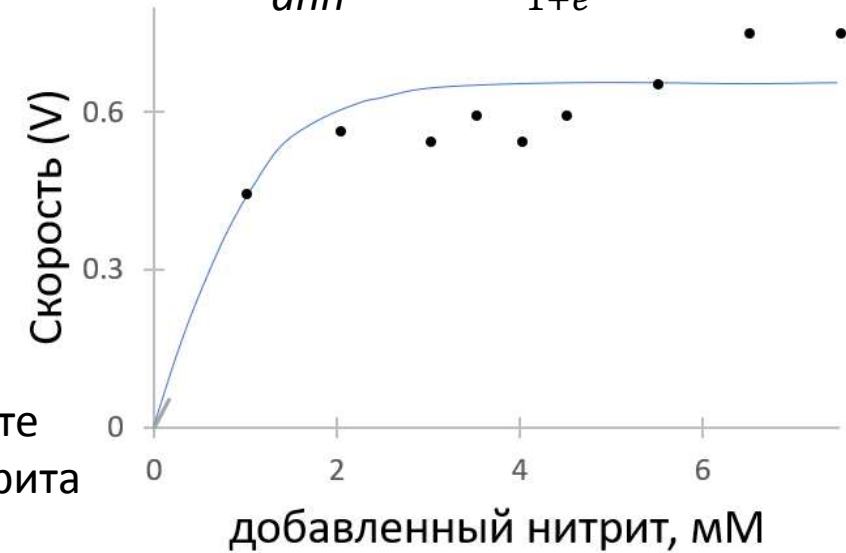
$k_{flow}$  – скорость протока субстратов

$C$  – доля объема клеток в хемотрате

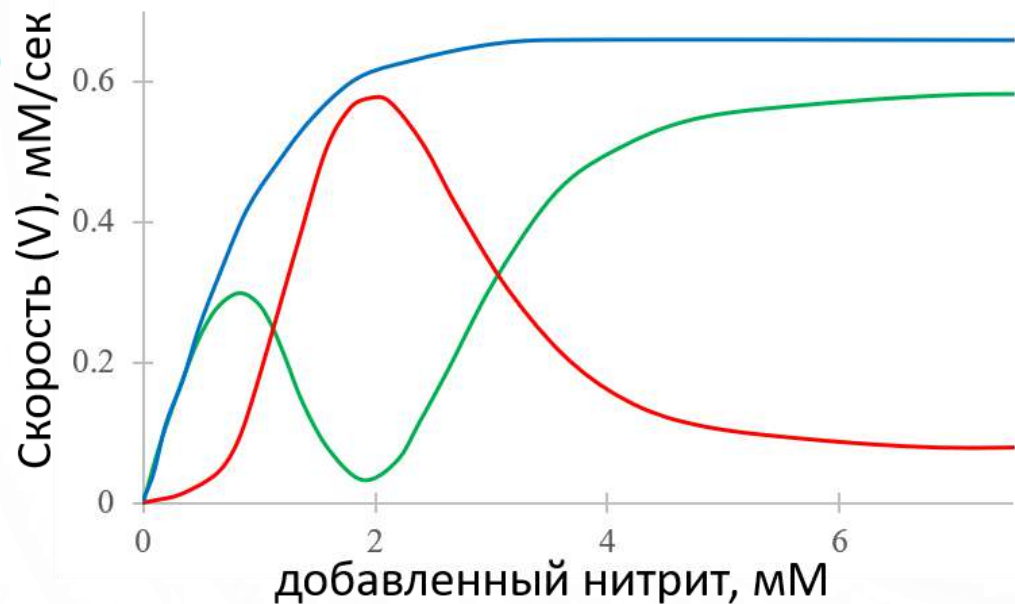
$V_{общ}$  – общая скорость утилизации нитрита

Аппроксимация  
экспериментальных данных  
обобщенной функцией

$$V_{апп} = 0.66 \cdot \frac{(1 - e^{-1.6u})}{1 + e^{-1.6u}}$$



# РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ МОДЕЛИ M1

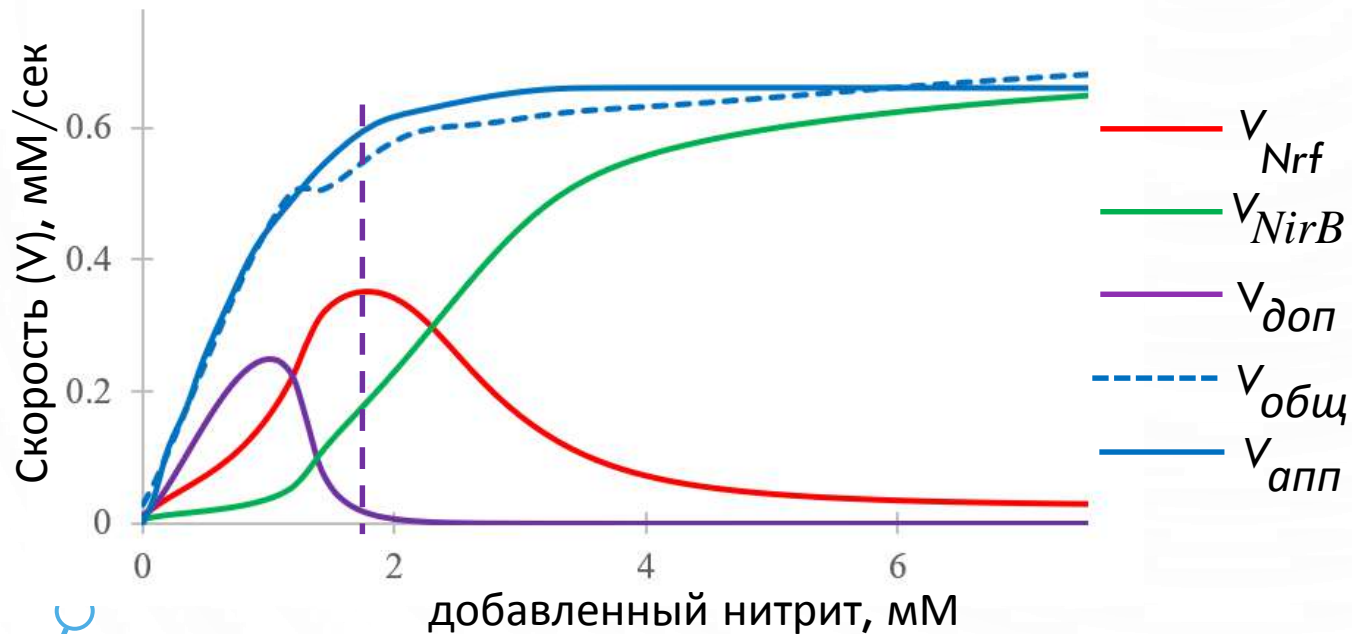


- $V_{Nrf}$  – скорость утилизации нитрита *Nrf*
- $V_{ост}$  – остаточная скорость утилизации нитрита
- $V_{апп}$  – аппроксимация экспериментальных точек

1. Была рассчитана скорость утилизации нитрита *Nrf* нитритредуктазой ( $V_{Nrf}$ ) при 2 мМ добавленного нитрита.
2. Рассчитаны значения скорости  $V_{Nrf}$  для остальных концентраций добавленного субстрата.
3. Рассчитана остаточная скорость утилизации нитрита клетками *E. coli* ( $V_{апп} - V_{Nrf}$ ).
4. Наличие высокой скорости переработки нитрита клетками при высоких (>2мМ) концентрациях добавленного нитрита можно объяснить экспериментально известной высокой активностью системы транспорта и детоксикации нитрита.

# РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА (M1)

## Стационарные скорости утилизации нитрита в хемостате



$V_{Nrf}$  – скорость утилизации нитрита *Nrf*

$V_{NirB}$  – скорость утилизации нитрита *NirB*

$V_{доп}$  – дополнительная скорость утилизации нитрита

$V_{общ}$  – общая скорость утилизации нитрита

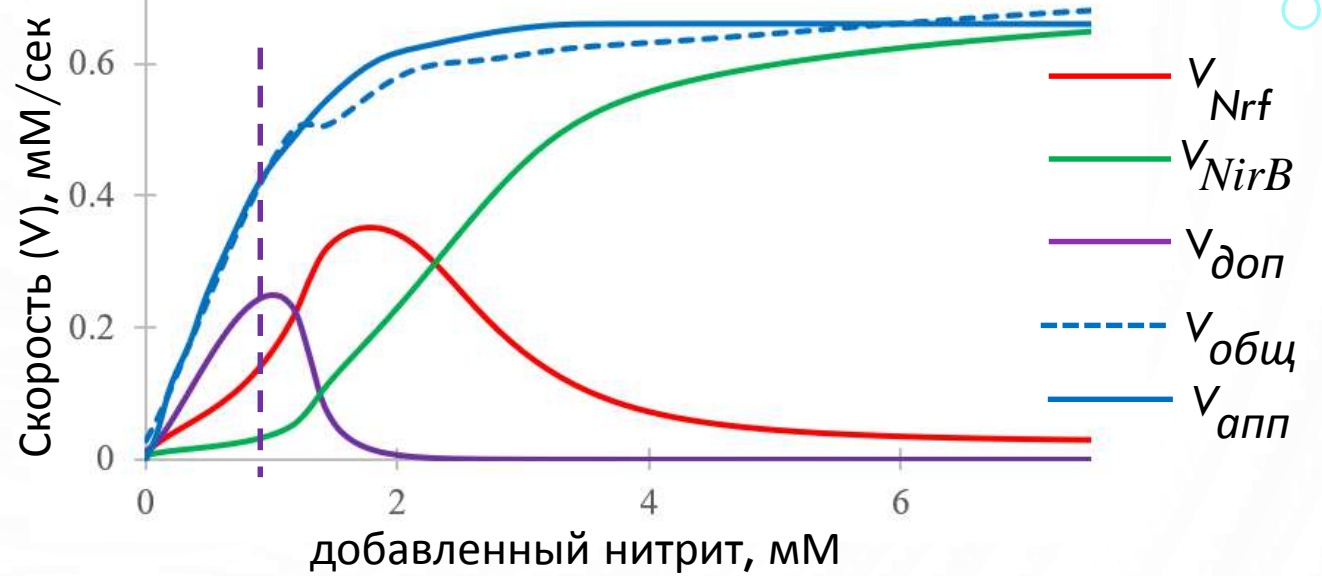
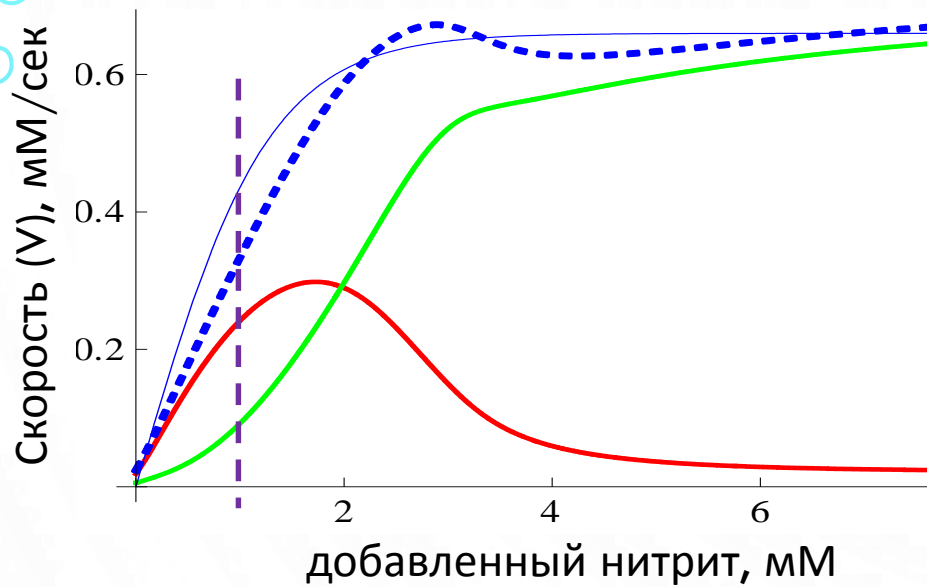
$$V_{общ} = V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u, w)$$

$V_{апп}$  – аппроксимация экспериментальных точек

Активность *Nrf* нитритредуктазы обеспечивает только ~50% наблюдаемой активности переработки нитрита в клетке при низких концентрациях нитрита в среде

# РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА (M1)

## Стационарные скорости утилизации нитрита в хеостате



$V_{Nrf}$  – скорость утилизации нитрита *Nrf*

$V_{NirB}$  – скорость утилизации нитрита *NirB*

$V_{доп}$  – дополнительная скорость утилизации нитрита

$V_{общ}$  – общая скорость утилизации нитрита

$$V_{общ} = V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u, w)$$

$V_{апп}$  – аппроксимация экспериментальных точек

Активность *Nrf* нитритредуктазы обеспечивает только ~50% наблюдаемой активности переработки нитрита в клетке при низких концентрациях нитрита в среде



# ГИПОТЕЗЫ О ПРИРОДЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ НИТРИТ-УТИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

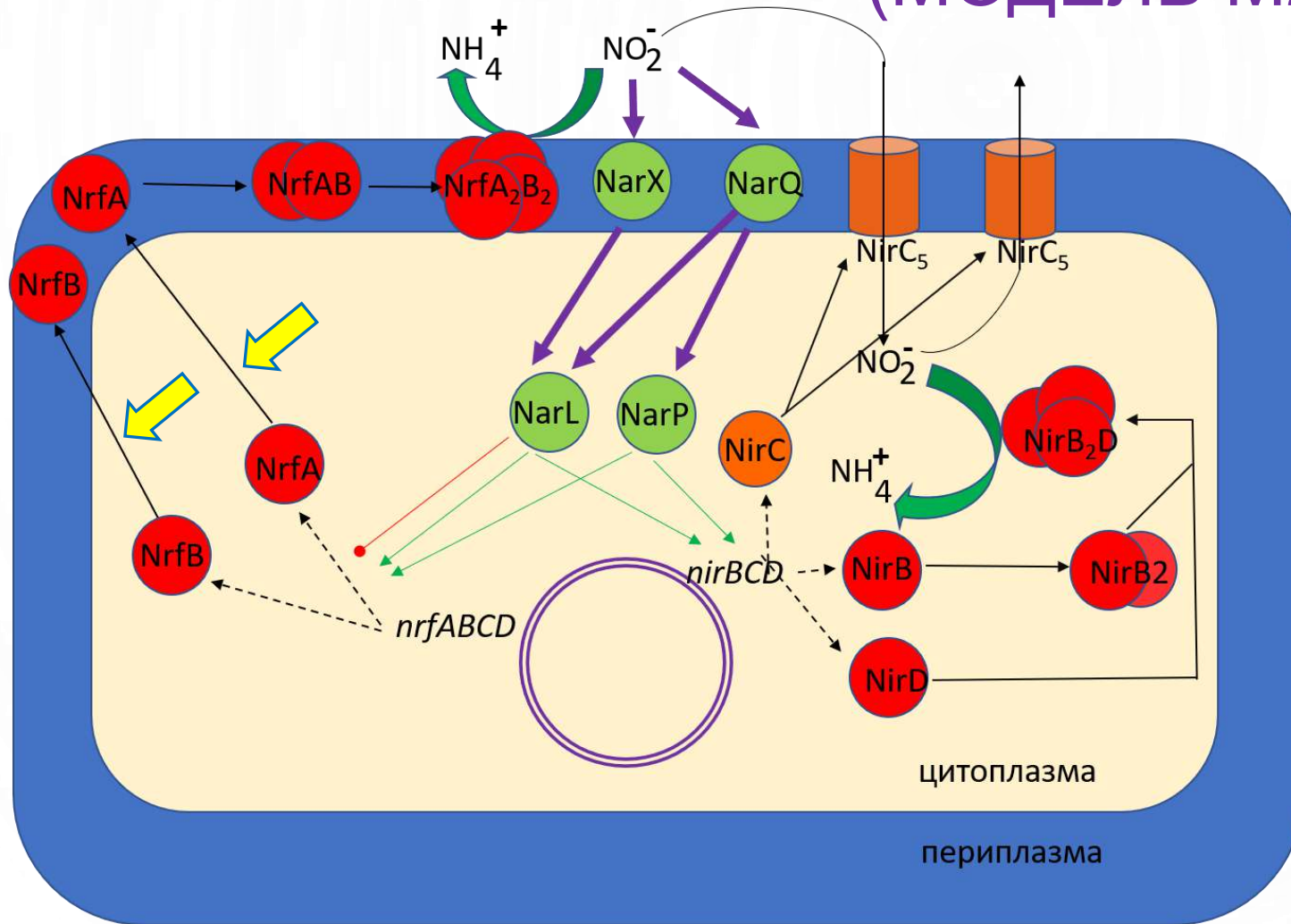


- субъединицы Nrf редуктазы синтезируются в цитоплазме, а сборка активной формы фермента происходит в периплазме, объем которой почти в пять раз меньше, чем объем цитоплазмы.
- механизмы секреции периплазматических ферментов зависят от наличия мембранного потенциала.
- формирование мембранного потенциала зависит от концентрации нитрита, достигая максимума в области 0.1–1 мМ нитрита и снижаясь после добавления нитрита.
- мембранный потенциал влияет на каталитические свойства Nrf редуктазы.

# РАБОЧАЯ ГИПОТЕЗА О ПРИРОДЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ НИТРИТ-УТИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

Дополнительная нитрит-утилизирующая активность в области микромолярных концентраций нитрита в среде возникает за счет локального повышения концентрации Nrf нитритредуктазы в периплазме при активизации перехода его субъединиц из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала

# СХЕМА УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli* (МОДЕЛЬ M2)



## Основные отличия от M1

1. Наличие периплазматического компартмента
2. Описание реакций как отдельных подсистем
3. Влияние мембранного потенциала на транспорт NrfA и NrfB белков из цитоплазмы в периплазму

# ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИ M2

## подсистема синтеза

$$\begin{cases} \frac{dNrfA_c}{dt} = k_{S_{Nrf,A_c}} \cdot m_{Nrf}(u), \\ \frac{dNrfB_c}{dt} = k_{S_{Nrf,B_c}} \cdot m_{Nrf}(u). \end{cases}$$

## подсистема транспорта

$$\begin{cases} \frac{dNrfA_c}{dt} = -(k_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfA_c - k_{Nrf,pc} \cdot NrfA), \\ \frac{dNrfB_c}{dt} = -(k_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfB_c - k_{Nrf,pc} \cdot NrfB), \\ \frac{dNrfA}{dt} = \delta_{peripl} (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfA_c - k_{Nrf,pc} \cdot NrfA), \\ \frac{dNrfB}{dt} = \delta_{peripl} (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfB_c - k_{Nrf,pc} \cdot NrfB). \end{cases}$$

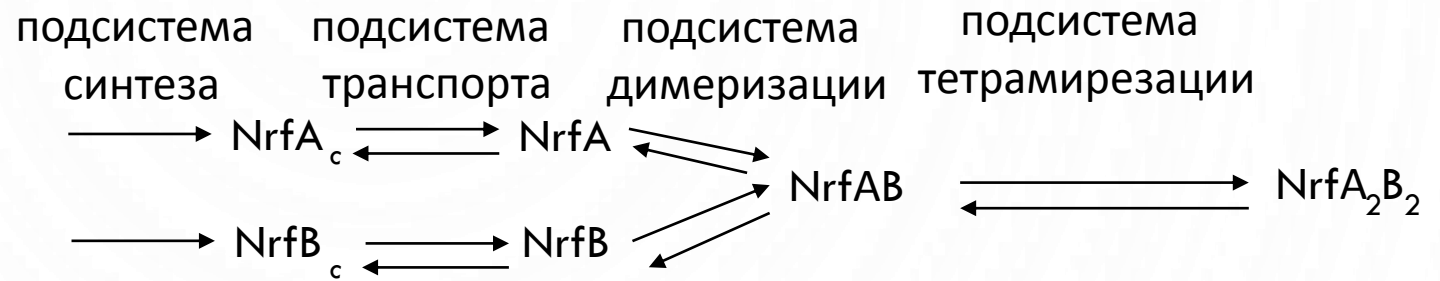
## подсистема димеризации

$$\begin{cases} \frac{dNrfA}{dt} = k_{dis,AB} (NrfAB - K_{dis,AB}^{-1} NrfA \cdot NrfB), \\ \frac{dNrfB}{dt} = k_{dis,AB} (NrfAB - K_{dis,AB}^{-1} NrfA \cdot NrfB) \end{cases}$$

## подсистема тетрамирзации

$$\frac{dNrfA_2B_2}{dt} = -k_{dis,A_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,A_2B_2}^{-1} NrfAB^2)$$

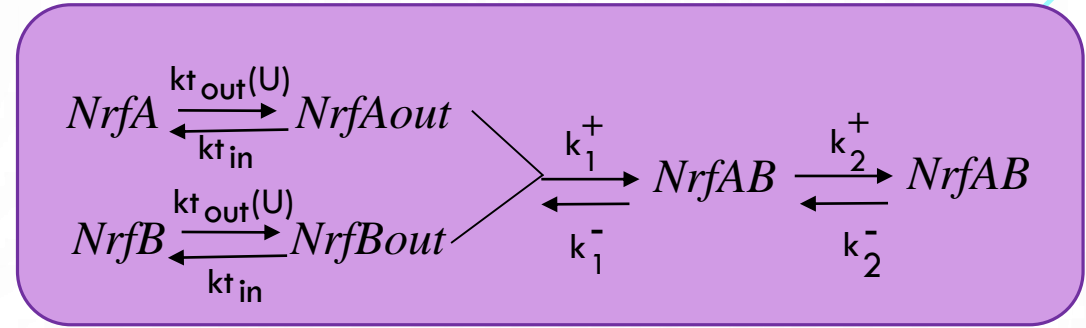
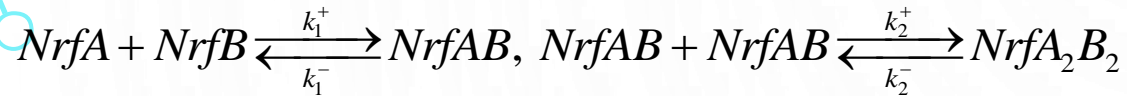
Модель M2 разработана в терминах подсистем, описывающих биохимические процессы



ОДУ записано на основе закона локального суммирования скоростей

$$\begin{aligned} \frac{dNrfA_c}{dt} &= k_{S_{Nrf}} m_{Nrf}(u) - (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) NrfA_c - k_{Nrf,pc} NrfA) - (k_{d,NrfA_c} + k_{flow}) NrfA_c, \\ \frac{dNrfB_c}{dt} &= k_{S_{Nrf}} m_{Nrf}(u) - (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) NrfB_c - k_{Nrf,pc} NrfB) - (k_{d,NrfB_c} + k_{flow}) NrfB_c, \\ \frac{dNrfA}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) NrfA_c - k_{Nrf,pc} NrfA) \\ &\quad + k_{form,NrfAB} (K_{dis,NrfAB} NrfAB - NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) NrfA, \\ \frac{dNrfB}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (k_{Nrf,cp,U}(U(s)) NrfB_c - k_{Nrf,pc} NrfB) \\ &\quad + k_{form,NrfAB} (K_{dis,NrfAB} NrfAB - NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfB} + k_{flow}) NrfB, \\ \frac{dNrfAB}{dt} &= 2k_{dis,NrfA_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2) \\ &\quad - k_{dis,NrfAB} (NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfAB} + k_{flow}) NrfAB, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= k_{dis,NrfA_2B_2,u} (NrfA_2B_2 u - K_{dis,NrfA_2B_2,u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u) + k_{cat,NrfA_2B_2,u} NrfA_2B_2 u - \\ &\quad - k_{dis,NrfA_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2) - (k_{d,NrfA_2B_2} + k_{flow}) NrfA_2B_2, \end{aligned}$$

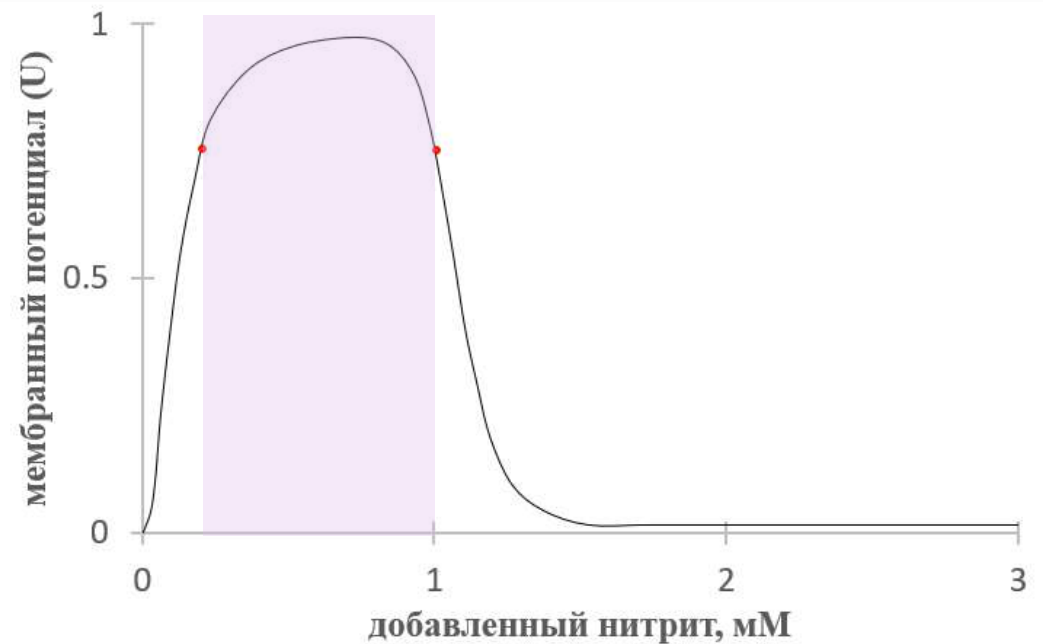
# МОДЕЛЬ УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА КЛЕТКАМИ *E. coli* (M2)



$$k_{t\text{ out}}(U) = k_{t\text{ out}} \cdot (1 + k \cdot U(s))$$

$$U(s) = \frac{\left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}} + \delta \cdot \left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}{1 + \left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}} + \left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}$$

$U(s)$  – функция, описывающая относительную величину мембранного потенциала в зависимости от концентрации добавленного нитрита ( $s$ )



точки – экспериментальные данные из работы [Motteram et al., 1981].  
 $d_U=0.25$ ;  $\delta=0.05$  mM;  $K_{pmf,1}=0.15$  mM;  $h_{pmf,1}=2$ ;  $K_{pmf,2}=0.93$  mM;  
 $h_{pmf,2}=13.5$

# УРАВНЕНИЯ МОДЕЛИ M2

**18 уравнений**, которые описывают динамику накопления нитрита в хемостате и внутри клеток, синтез субъединиц ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит, секрецию субъединиц Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, сборку активных комплексов ферментов и их деградацию, а также процессы утилизации нитрита периплазматической и цитоплазматической нитритредуктазами и его транспорта в клетку и из клетки.

Расчеты модели проводились в пакете Mathematica

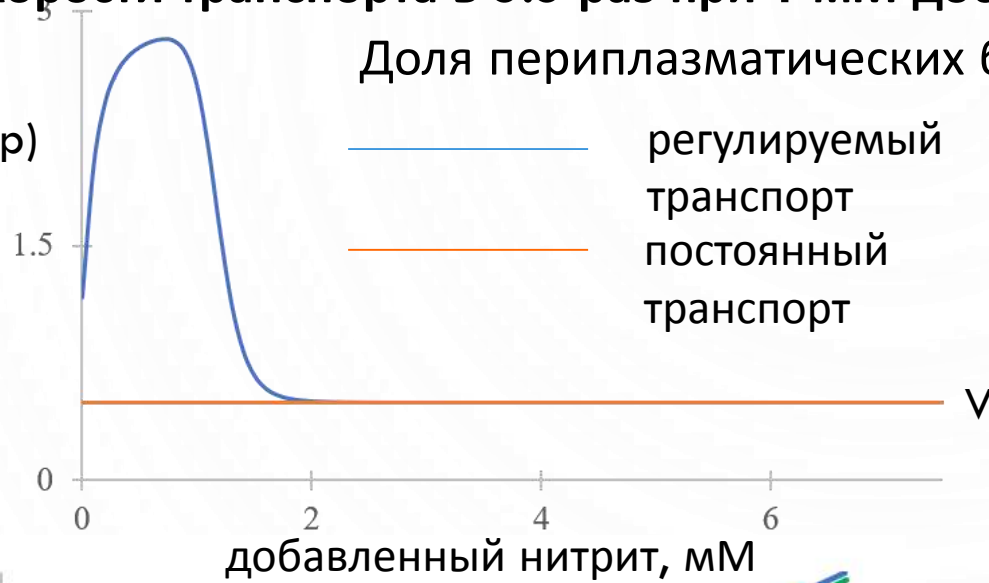
$$\begin{aligned} \frac{du}{dt} &= k_{flow}(s-u) + C \cdot \left[ k_{dis,NrfA_2B_2u} \left( NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u \right) + \right. \\ &\quad \left. + k_{dis,NirC_5} \left( NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-1} NirC_5 \times u \right) + k_{cat,NirCout} NirC_5 w \right], \\ \frac{dw}{dt} &= k_{cat,NirCin} NirC_5 u + k_{dis,NirC_5w} \left( NirC_5 w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w \right) + \\ &\quad + k_{dis,NirB_2Dw} \left( NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w \right) - k_{flow} \cdot w, \\ \frac{dNirC}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + 5k_{dis,NirC_5} \left( NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-4} NirC_5 \right) - (k_{d,NirC} + k_{flow}) NirC, \\ \frac{dNirC_5}{dt} &= k_{cat,NirCin} NirC_5 u + k_{cat,NirCout} NirC_5 w - k_{dis,NirC_5} \left( NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-4} NirC_5 \right) - \\ &\quad - k_{dis,NirC_5u} \left( NirC_5 u - K_{dis,NirC_5u}^{-1} NirC_5 \times u \right) - k_{dis,NirC_5w} \left( NirC_5 w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w \right) - (k_{d,NirC_5} + k_{flow}) NirC_5, \\ \frac{dNirC_5u}{dt} &= -k_{dis,NirC_5u} \left( NirC_5u - K_{dis,NirC_5u}^{-1} NirC_5 \times u \right) - (k_{cat,NirCin} + k_{flow}) NirC_5u, \\ \frac{dNirC_5w}{dt} &= -k_{dis,NirC_5w} \left( NirC_5w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w \right) - (k_{cat,NirCout} + k_{flow}) NirC_5w, \\ \frac{dNirB}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + 2k_{dis,NirB_2} \left( NirB_2 - K_{dis,NirB_2}^{-1} NirB_2 \right) - (k_{d,NirB} + k_{flow}) NirB, \\ \frac{dNirD}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + k_{dis,NirB_2D} \left( NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD \right) - (k_{d,NirD} + k_{flow}) NirD, \\ \frac{dNirB_2}{dt} &= k_{dis,NirB_2} \left( NirB_2 - K_{dis,NirB_2}^{-1} NirB_2 \right) + \\ &\quad + k_{dis,NirB_2D} \left( NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD \right) - (k_{d,NirB_2} + k_{flow}) NirB_2, \\ \frac{dNirB_2D}{dt} &= -k_{dis,NirB_2D} \left( NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD \right) + k_{cat,NirB} NirB_2Dw + \\ &\quad + k_{dis,NirB_2Dw} \left( NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w \right) - (k_{d,NirB_2D} + k_{flow}) NirB_2D, \\ \frac{dNirB_2Dw}{dt} &= -k_{dis,NirB_2Dw} \left( NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w \right) - (k_{cat,NirB} + k_{flow}) NirB_2Dw, \\ \frac{dNrfA_c}{dt} &= ks_{Nrf} m_{Nrf}(u) - (kt_{Nrf,sp,U}(U(s))NrfA_c - kt_{Nrf,pc}NrfA) - (k_{d,NrfA} + k_{flow})NrfA_c, \\ \frac{dNrfB_c}{dt} &= ks_{Nrf} m_{Nrf}(u) - (kt_{Nrf,sp,U}(U(s))NrfB_c - kt_{Nrf,pc}NrfB) - (k_{d,NrfB} + k_{flow})NrfB_c, \\ \frac{dNrfA}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (kt_{Nrf,sp,U}(U(s))NrfA_c - kt_{Nrf,pc}NrfA) \\ &\quad + k_{form,NrfAB} \left( K_{dis,NrfAB}NrfAB - NrfA \cdot NrfB \right) - (k_{d,NrfA} + k_{flow})NrfA, \\ \frac{dNrfB}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (kt_{Nrf,sp,U}(U(s))NrfB_c - kt_{Nrf,pc}NrfB) \\ &\quad + k_{form,NrfAB} \left( K_{dis,NrfAB}NrfAB - NrfA \cdot NrfB \right) - (k_{d,NrfB} + k_{flow})NrfB, \\ \frac{dNrfAB}{dt} &= 2k_{dis,NrfA_2B_2} \left( NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2 \right) \\ &\quad - k_{dis,NrfAB} \left( NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} NrfA \cdot NrfB \right) - (k_{d,NrfAB} + k_{flow})NrfAB, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= k_{dis,NrfA_2B_2u} \left( NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u \right) + k_{cat,NrfA_2B_2u} NrfA_2B_2u - \\ &\quad - k_{dis,NrfA_2B_2} \left( NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2 \right) - (k_{d,NrfA_2B_2} + k_{flow})NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2u}{dt} &= -k_{dis,NrfA_2B_2u} \left( NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u \right) - (k_{cat,NrfA_2B_2u} + k_{flow})NrfA_2B_2u. \end{aligned}$$

# РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ МОДЕЛИ M2

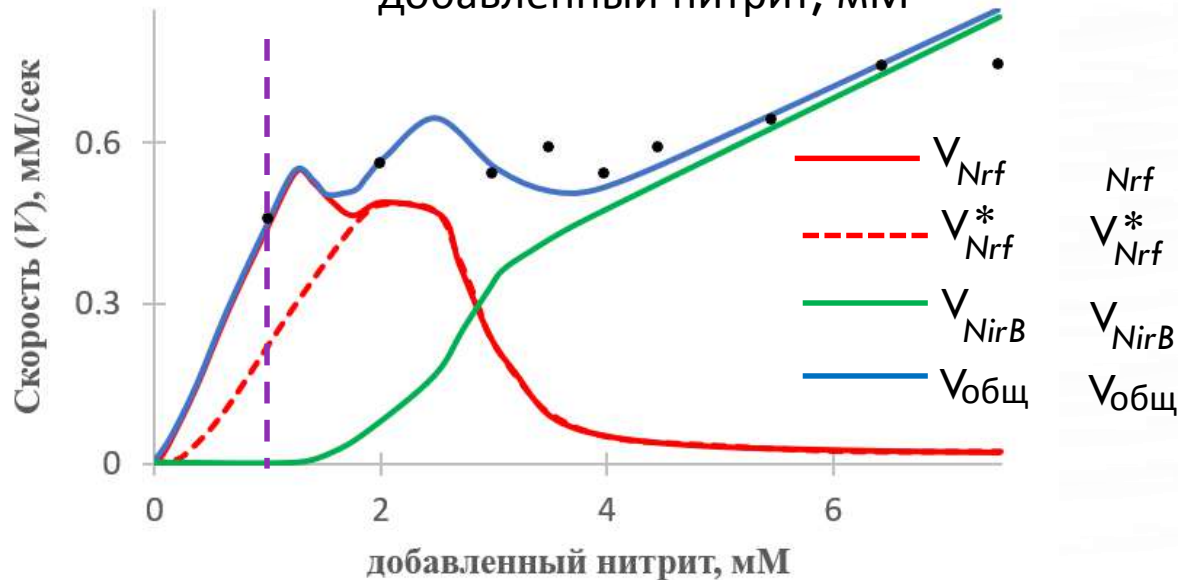
Повышение скорости транспорта в 5.5 раз при 1 мМ добавленного нитрита

$$100\% \frac{Nrfprp}{(Nrfc+Nrfprp)}$$

Доля периплазматических белков

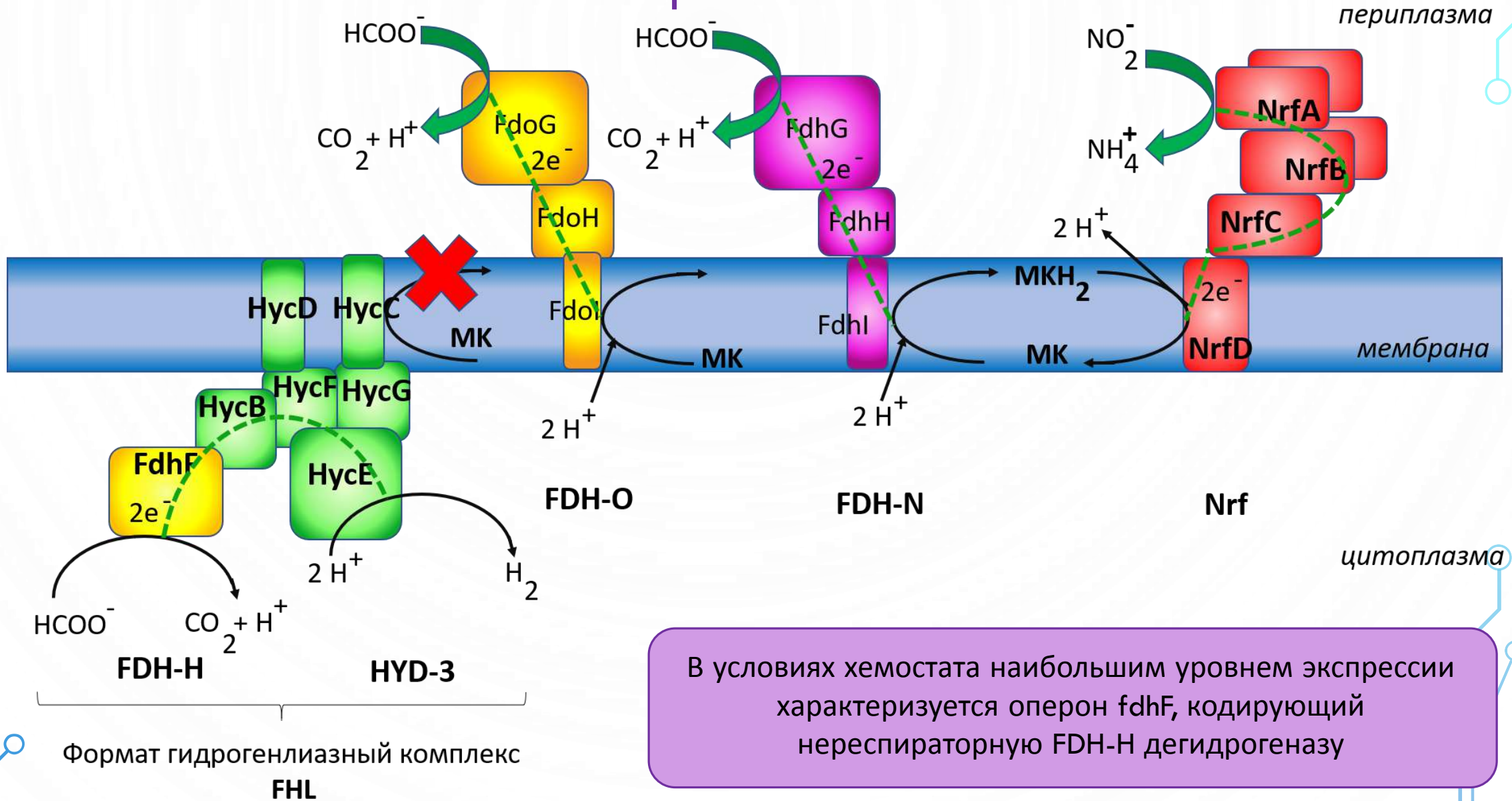


мембранный потенциал является достаточным механизмом для локального повышения концентрации Nrf редуктазы при переходе ее субъединиц из цитоплазмы в периплазму



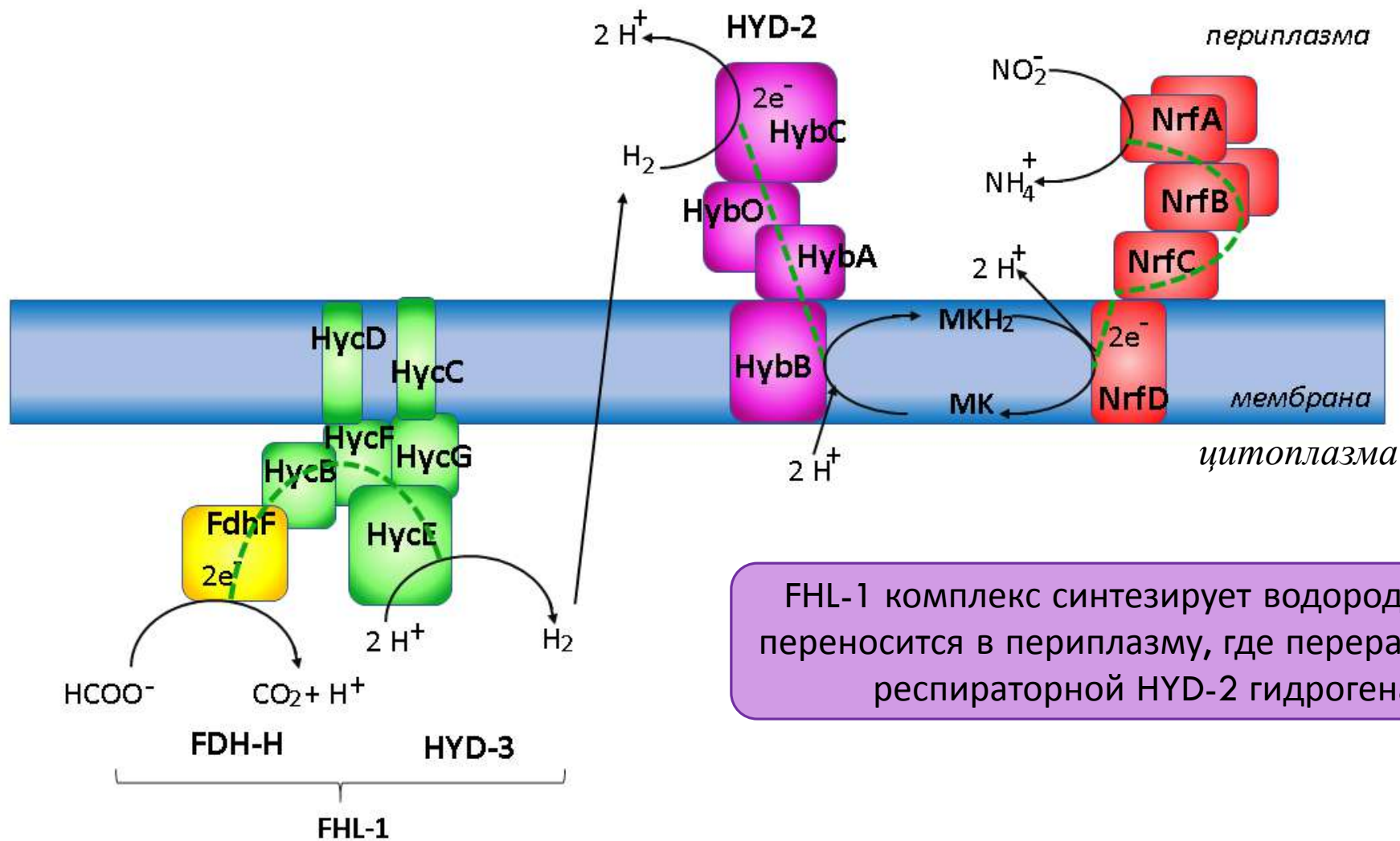
- $Nrf$  - скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой (модель M2)
- $V_{Nrf}^*$  - скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой (модель M1)
- $V_{NirB}$  - скорость утилизации нитрита NirB редуктазой (модель M2)
- $V_{общ}$  - общая скорость утилизации нитрита (модель M2)

# ЭЛЕКТРОННАЯ ЦЕПЬ С НИТРИТОМ В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА

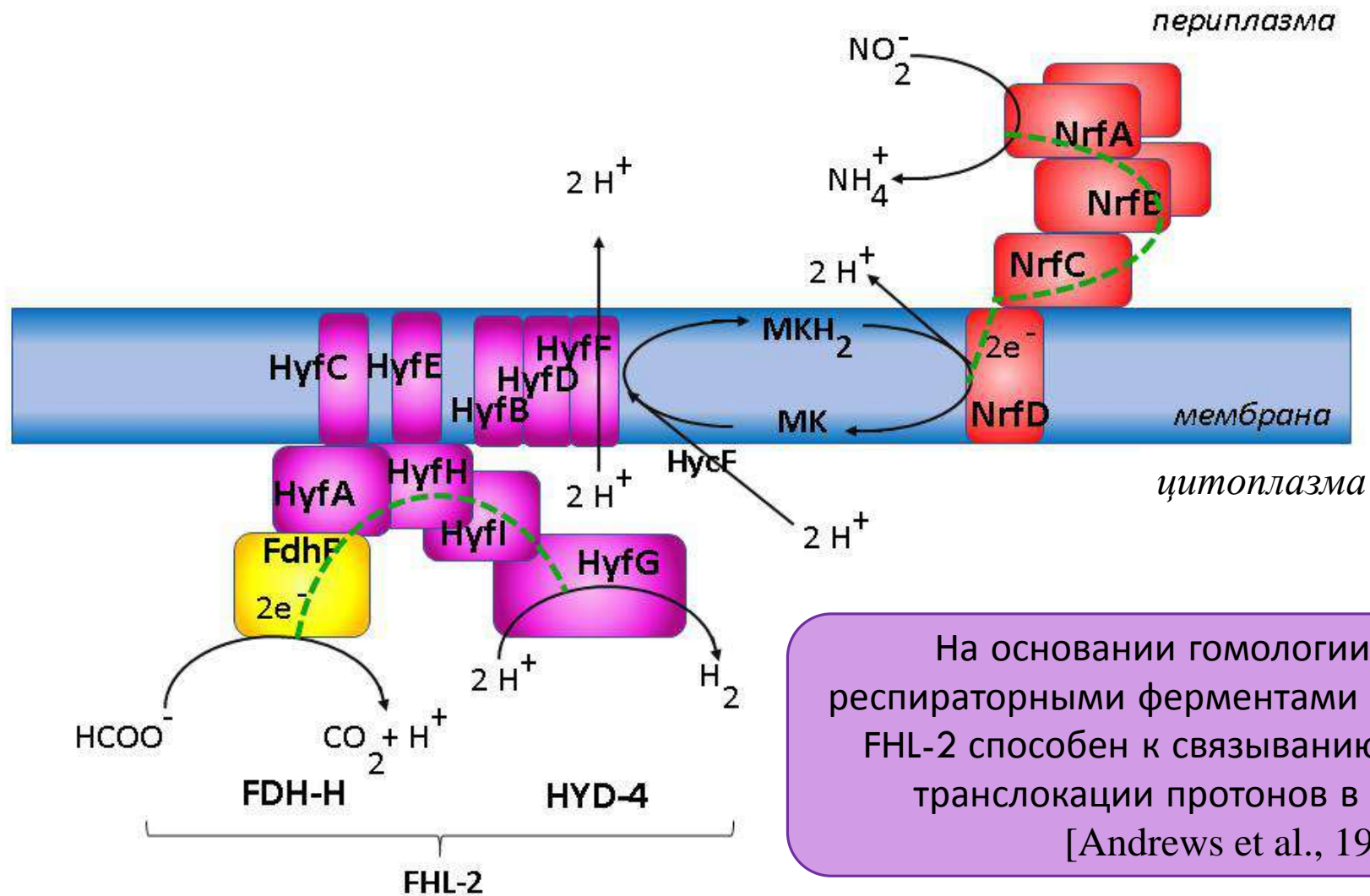




# СХЕМА ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ ЦЕПИ ПЕРЕДАЧИ ЭЛЕКТРОНОВ С УЧАСТИЕМ FHL-1 КОМПЛЕКСА



# СХЕМА ГИПОТЕТИЧЕСКОЙ ЦЕПИ ПЕРЕДАЧИ ЭЛЕКТРОНОВ С УЧАСТИЕМ FHL-2 КОМПЛЕКСА



На основании гомологии с другими респираторными ферментами предсказано, что FHL-2 способен к связыванию с хинонами и транслокации протонов в периплазму [Andrews et al., 1997]

# УРАВНЕНИЯ РАСШИРЕННОЙ МОДЕЛИ M2 ПО СЦЕНАРИЯМ 1 И 2

$$\begin{aligned} \frac{dFdhF}{dt} &= k_{S_{FdhF}} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL1} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FdhF, \\ \frac{dHyd_3}{dt} &= k_{S_{Hyd_3}} \cdot m_{Hyd_3} - V_{form,FHL} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot Hyd_3, \\ \frac{dFHL1}{dt} &= V_{form,FHL1} + V_{FHL1,util} - V_{form,FRM,FHL1} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL1, \\ \frac{dFHL1FRM}{dt} &= V_{form,FRM,FHL1} - V_{form,H,FRM,FHL1} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL1FRM, \\ \frac{dFHL1HFRM}{dt} &= V_{form,H,FRM,FHL1} - V_{FHL1,util} - k_{flow} \cdot FHL1HFRM, \\ \frac{dFRM}{dt} &= k_{S_{FRM}}(u) - k_{flow} \cdot FRM - V_{form,FRM,FHL1}, \\ \frac{dHyd_{2c}}{dt} &= k_{S_{Hyd_{2c}}} \cdot m_{Hyd_{2c}} - (k_{t_{out}}(PMF) \cdot Hyd_{2c} - k_{t_{in}} \cdot Hyd_2) - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2c}, \\ \frac{dHyd_2}{dt} &= -k_{peripl} \cdot (k_{t_{out}}(PMF) \cdot Hyd_{2c} - k_{t_{in}} \cdot Hyd_2) - V_{form,Hyd_2} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Hyd_2, \\ \frac{dHyd_{2cmp}}{dt} &= V_{form,Hyd_2} - V_{form,Hyd_2,H_2} + V_{util,Hyd_2} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2cmp}, \\ \frac{dHyd_2H_2}{dt} &= V_{form,Hyd_2,H_2} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2, \\ \frac{dHyd_2H_2DMK}{dt} &= V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2DMK, \\ \frac{dHyd_2H_2DMKH}{dt} &= V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2DMKH, \\ \frac{dHyd_2H_2DMKH_2}{dt} &= V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} - V_{util,Hyd_2} - k_{flow} \cdot Hyd_2H_2DMKH_2, \\ \frac{dH_{in}}{dt} &= k_{S_{H_{in}}} - (4) \cdot H_{in} + V_{atp} - V_{form,H,FRM,FHL1}, \\ \frac{dH_2}{dt} &= k_{peripl} \cdot V_{FHL1,util} - V_{form,Hyd_2,H_2} - (k_{flow} + k_{H_2,out}) \cdot H_2, \\ \frac{dDMK}{dt} &= -V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} + 3 \cdot V_{Nrf,util} - k_{flow} \cdot DMK, \\ \frac{dDMKH_2}{dt} &= k_{S_{DMKH_2}} + V_{util,Hyd_2} - 3 \cdot V_{form,DMK,H,NO_2,Nrf} - k_{flow} \cdot DMKH_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= V_{form,Nrf} + V_{Nrf,util} - V_{form,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfu}{dt} &= V_{form,H,u,Nrf} - V_{form,DMK,H,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Nrfu, \\ \frac{dNrfHu}{dt} &= V_{form,H,u,Nrf} - V_{form,DMK,H,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot NrfHu, \\ \frac{dNrfDMKHu}{dt} &= V_{form,DMK,H,u,Nrf} - V_{Nrf,util} - k_{flow} \cdot NrfDMKHu. \end{aligned}$$

Уравнение, описывающее динамику изменения концентрации комплекса Nrf и нитрита из модели M2 заменено на следующее:

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

20 уравнений,  
(сценарий 1)  
или 18 уравнений  
(сценарий 2)  
+  
18 уравнений M2

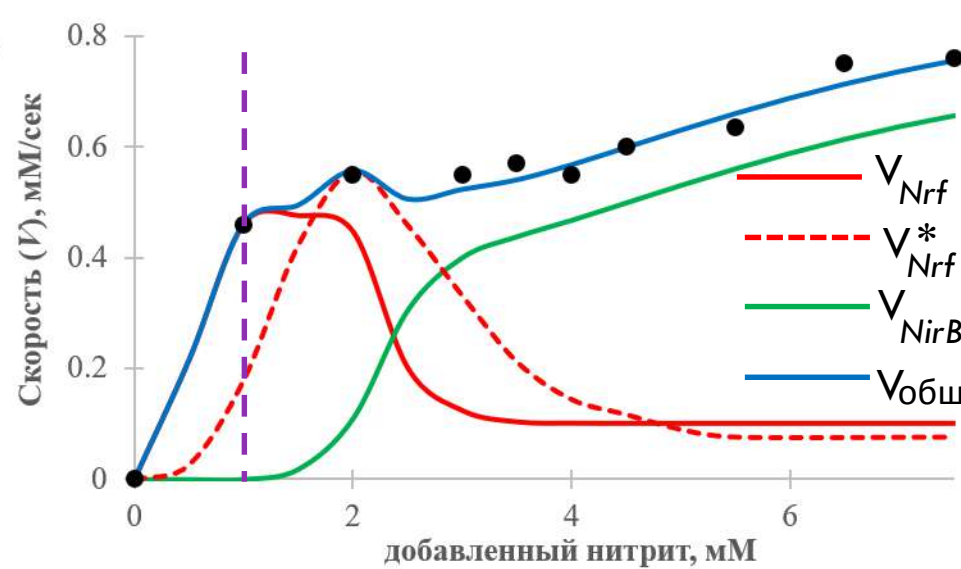
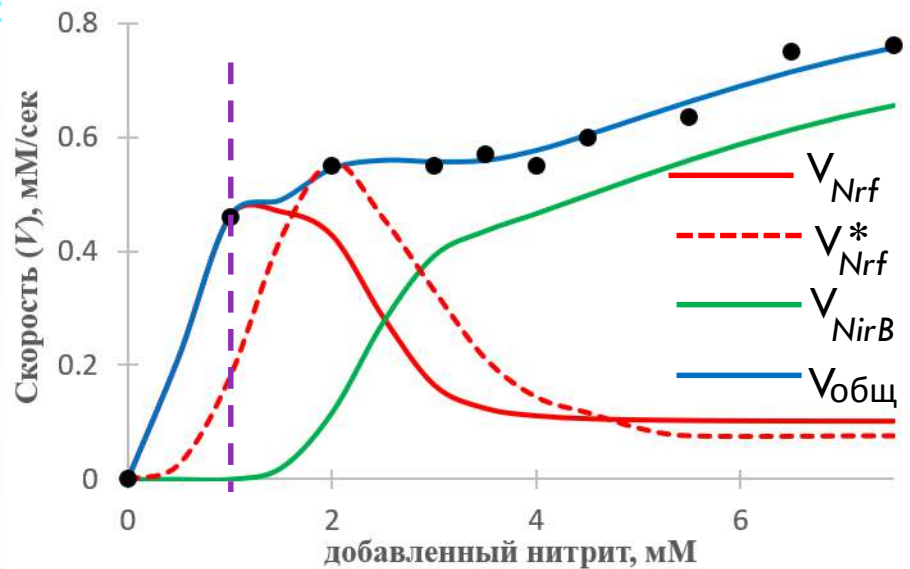
$$\begin{aligned} \frac{dFdhF}{dt} &= k_{S_{FdhF}} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FdhF, \\ \frac{dHyd_4}{dt} &= k_{S_{Hyd_4}} \cdot m_{Hyd_4} - V_{form,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot Hyd_4, \\ \frac{dFHL2}{dt} &= V_{form,FHL2} + V_{FHL2,util} - V_{form,FRM,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2, \\ \frac{dFHL2FRM}{dt} &= V_{form,FRM,FHL2} - V_{form,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM, \\ \frac{dFHL2FRM_2}{dt} &= V_{form,FRM,FHL2} - V_{form,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM_2, \\ \frac{dFHL2HFRM_2}{dt} &= V_{form,H,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2HFRM_2, \\ \frac{dFHL2H_2FRM_2}{dt} &= V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2H_2FRM_2, \\ \frac{dFHL2H_3FRM_2}{dt} &= V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_2, \\ \frac{dFHL2H_4FRM_2}{dt} &= V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d_{cyt}} + k_{flow}) \cdot FHL2H_4FRM_2, \\ \frac{dFHL2DMKH_4FRM_2}{dt} &= V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{FHL2,util} - k_{flow} \cdot FHL2DMKH_4FRM_2, \\ \frac{dFRM}{dt} &= k_{S_{FRM}}(u) - k_{flow} \cdot FRM - 2 \cdot V_{form,FRM,FHL}, \\ \frac{dH_{in}}{dt} &= k_{S_{H_{in}}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{atp} - 4 \cdot V_{form,H,FRM,FHL}, \\ \frac{dDMK}{dt} &= -V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} + 3 \cdot V_{Nrf,util} - k_{flow} \cdot DMK, \\ \frac{dDMKH_2}{dt} &= k_{S_{DMKH_2}} + V_{util,Hyd_2} - 3 \cdot V_{form,DMK,H,NO_2,Nrf} - k_{flow} \cdot DMKH_2, \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= V_{form,Nrf} + V_{Nrf,util} - V_{form,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\ \frac{dNrfu}{dt} &= V_{form,u,Nrf} - V_{form,H,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot Nrfu, \\ \frac{dNrfHu}{dt} &= V_{form,H,u,Nrf} - V_{form,DMK,H,u,Nrf} - (k_{d_{prp}} + k_{flow}) \cdot NrfHu, \\ \frac{dNrfDMKHu}{dt} &= V_{form,DMK,H,u,Nrf} - V_{Nrf,util} - k_{flow} \cdot NrfDMKHu. \end{aligned}$$

Расчеты модели проводились в пакете STEP [Фадеев, Гайнова 1994]

# РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ МОДЕЛИ, УЧИТЫВАЮЩЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛА

сценарий 1 (с FHL-1 ферментом)

сценарий 2 (с FHL-2 ферментом)



- $V_{Nrf}$  - скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой (модель M2)
- $V_{Nrf}^*$  - скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой (модель M1)
- $V_{NirB}$  - скорость утилизации нитрита NirB редуктазой (модель M2)
- $V_{общ}$  - общая скорость утилизации нитрита (модель M2)

оба сценария равноценны с точки зрения формирования мембранного потенциала, что позволяет предположить возможность их реализации при различных условиях культивирования клеток

# 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. Методами компьютерного анализа показано, учтенные в модели (M1) молекулярно-генетические и ферментативные механизмы достаточны для адекватного воспроизводства экспериментально-наблюдаемой динамики накопления нитрита в хемостате при в области концентрации добавленного нитрита  $<1$  мМ.
3. Установлено, что в области микромолярных концентраций добавленного нитрита, прогнозируемая на основе молекулярно-генетических данных нитрит утилизирующая активность Nrf нитритредуктазы обеспечивает только около 50% наблюдаемой активности переработки нитрита в клетке.
4. Предложена гипотеза, что дополнительная нитрит-утилизирующая активность в области микромолярных концентраций нитрита в среде возникает за счет локального повышения концентрации Nrf нитритредуктазы в периплазме при активизации перехода его субъединиц из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи.

## ВЫВОДЫ (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

5. На основе модели (M1) разработана двухкомпарментная математическая модель (M2) утилизации нитрита в хеостате, в которой дополнительно учтен процесс транспорта субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и зависимость его скорости от наличия и величины мембранного потенциала.

6. Методами компьютерного анализа модели (M2) показано, что экспериментально известная кинетика формирования мембранного потенциала в зависимости от концентрации нитрита обеспечивает корректное описание динамики накопления нитрита в хеостате, что позволяет считать мембранный потенциал существенным компонентом в механизме регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli* при микромолярных концентрациях добавленного нитрита в среде  $<1$  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 хеостате независимо от сценария формирования потенциала, что дополнительно подтверждает важную роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы.

# ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано **13 работ**:

- **четыре** в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК
- +1 в печати
- **восемь** работ в сборниках тезисов конференций

## Статьи:

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. (в печати)
2. 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. – Vol. 16. – Suppl 1:7. **IF: 2.644**
3. **Ри Н.А.**, Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста // **Математическая биология и биоинформатика.** – 2015. – Т.10. – №1. – С. 193–205.
4. Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., **Ри Н.А.**, Фадеев С.И., Лихошвай В.А., Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков // **Математическая биология и биоинформатика.** – 2013. – Т.8. – №1. – С. 276- 294.
5. 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. **IF: 0.8**

# ТЕЗИСЫ 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. BGRS/SB'10. Novosibirsk, 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.** и др. Компьютерное моделирование динамики функционирования молекулярно-генетических систем *Escherichia coli*. IV МК “Математическая биология и биоинформатика”, Пущино, Россия, 2012, с.108-109.
4. Akberdin I.R., Kazantsev F.V., **Ree N.A.** et al. Modeling and analysis of dynamics of the gene networks: automatic generation and storage in a new database. Международный микросимпозиум Syspatho, Санкт-Петербург, Россия, 2012, стр. 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, 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» (Новосибирск, 2018)

## Экзамены

Специальность – 4, Английский – 5, Философия – 5, ГИА - 5



# БЛАГОДАРНОСТИ

Научному руководителю **Хлебодаровой Т.М.** и научному консультанту **Лихошваю В.А.** за руководство и неоценимую помощь в работе

**Фадееву С.И.** за помощь в освоении пакета STEP

**Лашину С.А., Антонец Д.В. и Розанову А.С.** за советы и рецензирование

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ