

Молекулярно-генетические механизмы формирования мембранного потенциала у *Escherichia coli* в условиях стационарного роста на нитрите

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

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

kashev@bionet.nsc.ru

В кишечнике человека наиболее энергетически выгодным субстратом для бактерии *Escherichia coli* является нитрат, побочным продуктом восстановления которого является токсичный нитрит, используемый, хотя и с меньшей эффективностью, чем нитрат, в качестве акцептора электронов в дыхательной цепи. Нитрит восстанавливается до аммония периплазматической Nrf нитритредуктазой, кодируемой *nrfABCD* опероном, уровень эффективности транскрипции которого зависит от концентрации нитрита в среде. Ранее нами была выдвинута гипотеза, что активность Nrf редуктазы при низких концентрациях нитрита в среде определяется не только механизмами регуляции экспрессии оперона *nrfABCD*, но и действием мембранного потенциала на процессы формирования активной формы фермента в периплазме. Эта возможность была теоретически доказана на математической модели, в которой мембранный потенциал представлен в виде феноменологической функции, зависящей от нитрита. Для окончательного подтверждения гипотезы была создана модель утилизации нитрита в хемостате, в которой величина мембранного потенциала была рассчитана на основе молекулярно-генетических механизмов его формирования. Поскольку структура дыхательной цепи на нитрите неизвестна, были реконструированы два гипотетических сценария формирования мембранного потенциала при культивировании клеток в хемостате и разработаны соответствующие модели. В сценариях рассматривается участие форматгидрогениазных комплексов FHL-1 и FHL-2, компонентами которых являются форматдегидрогеназа Fdh и гидрогеназы Hsd-3 и Hsd-4 соответственно. Было показано, что результаты математического моделирования не зависят от сценария формирования потенциала. Полученные результаты подтверждают, что мембранный потенциал играет важную роль в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы при низких концентрациях нитрита. Учитывая распространенность механизма, мы предполагаем, что мембранный потенциал может играть существенную роль в регуляции активностей других периплазматических белков.

Ключевые слова: дыхание на нитрите, мембранный потенциал, МП, *E. coli*, хемостат, моделирование, форматгидрогениазный комплекс, нитритредуктаза

Molecular genetic mechanisms of membrane potential formation in *Escherichia coli* at stationary growth on nitrite

Ree N.A., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A.

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

The most energetically favorable substrate for *Escherichia coli* in the gut is nitrate, reduction of which results in accumulation of toxic by-product – nitrite, that can also be used by bacteria as an electron acceptor in the respiratory chain, although less effective than nitrate. Nitrite is reduced to ammonia by periplasmic Nrf nitrite reductase that is encoded by the *nrfABCD* operon, which transcription level depends on the nitrite concentration in the medium. Previously we proposed a hypothesis that under low nitrite level rate of substrate reduction by Nrf is determined by not only mechanisms of *nrfABCD* operon regulation, but also by PMF activation of Nrf subunits transport to periplasm and by improving active reductase complex formation. This hypothesis was theoretically proved by the mathematical model, in which membrane potential is presented as phenomenological function, dependent on nitrite. To confirm this hypothesis, the model of nitrite utilization in the chemostat was created, in which membrane potential was reproduced by molecular genetic mechanisms of its formation. As the structure of nitrite respiratory chain is unknown, two hypothetical scenarios of PMF formation in *E. coli* cell, cultured in the chemostat, were reconstructed and two corresponding models were created. These scenarios take into account participation of FHL-1 and FHL-2 complexes, composed of Fdh-H

dehydrogenase and Hyd-3 or Hyd-4 hydrogenases, respectively. It was shown that results of mathematical modeling are independent on the scenario of PMF formation. Obtained results confirm that membrane potential plays an important role in periplasmic Nrf activity regulation under low nitrite levels. As the mechanism is widespread, we suppose that membrane potential may play a significant role in regulation of other periplasmic protein activities.

Key words: nitrite respiration, membrane potential, PMF, E. coli, chemostat, modeling, formate hydrogen lyase complex, nitrite reductase

1. Введение

В анаэробных условиях, поддерживаемых в кишечнике, наиболее энергетически выгодным субстратом для бактерии *E. coli* служит нитрат. Побочным продуктом восстановления нитрата является нитрит, который токсичен не только для бактериальных клеток, но и клеток хозяина. Несмотря на токсический эффект, нитрит сам по себе может быть использован бактерией для синтеза АТФ в ходе функционирования дыхательной цепи и формирования мембранного потенциала, который необходим для работы мембран-ассоциированного фермента АТФ-синтазы. Известно, что в респираторной системе на нитрите формат является донором, а нитрит – акцептором, который перерабатывается периплазматической Nrf нитритредуктазой до аммония. Вторая нитритредуктаза – NirB, не участвует в формировании протонного градиента, локализуется в цитоплазме и восстанавливает нитрит до аммония только внутри клетки. Субстрат проникает внутрь клетки за счет активного транспорта, предположительно, за счет NirC транспортера [1, 2]. Nrf редуктаза наиболее активна при низких концентрациях субстрата, а NirB – при высоких. Переключение между респираторным путем и процессами транспорта субстрата с последующей детоксикацией внутри клетки происходит на уровне регуляции транскрипции *nrfABCD* и *nirBCD* оперонов, кодирующих субъединицы двух нитритредуктаз и транспортера NirC [3].

Ранее, используя методы математического моделирования, мы показали, что известных генетических механизмов регуляции экспрессии оперона *nirBCD* достаточно для описания кинетики утилизации нитрита в глюкозо-лимитированных условиях культивирования культуры *E. coli* в хемостате при концентрациях добавленного нитрита > 2 мМ. Однако скорости утилизации нитрита, рассчитанной на основании данных о влиянии нитрита на уровень экспрессии оперона *nrfABCD*, оказалось недостаточно для воспроизведения моделью кинетики его утилизации Nrf редуктазой при концентрациях субстрата < 2 мМ [4]. Анализ различных гипотез показал [5, 6], что одним из возможных механизмов, непротиворечащим экспериментальным данным, и позволяющим достичь нужной скорости утилизации нитрита Nrf ферментом в анализируемой области

концентраций субстрата, является активация секреции субъединиц редуктазы из цитоплазмы в периплазму под воздействием мембранного потенциала. В настоящей работе мы предлагаем два возможных сценария формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 и FHL-2 форматлиазных комплексов, и с помощью метода математического моделирования демонстрируем, что мембранный потенциал играет важную роль в регуляции эффективности утилизации нитрита в области низких концентраций субстрата в среде.

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

Ряд экспериментальных данных [7, 8] позволил нам предположить, что в формировании протонного градиента в условиях анаэробного дыхания на нитрите может участвовать форматдегидрогеназа Fdh-H, каталитический сайт которой расположен в цитоплазме. Данная гипотеза основана на данных о преимущественной экспрессии оперона *fdhF*, кодирующего субъединицы фермента, в условиях хемостата по сравнению с дегидрогеназами – Fdh-O и Fdh-N. Кроме того, профиль экспрессии *fdhF* оперона сходен с таковым для *nrf* оперона. Однако его участие в формировании респираторной цепи на нитрите не показано.

Fdh-H форматдегидрогеназа входит в состав двух мультиферментных, цитоплазматически ориентированных, форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2, ассоциированных с мембраной. FHL-1, помимо Fdh-H дегидрогеназы, содержит гидрогеназу Hyd-3, а FHL-2 – гидрогеназу Hyd-4 [9, 10]. На основании существующих экспериментальных данных были реконструированы два варианта сценариев формирования дыхательной цепи с участием FHL-1 и FHL-2 комплексов в глюкозо-лимитированных условиях хемостата, указанных в работе [10].

Поскольку FHL-1 комплекс позиционируется как не респираторный фермент, работающий в ферментирующих условиях, и для него не показана возможность связываться с каким-либо типом хинонов, то его прямое участие в качестве донора электронов исключается, что означает наличие некоего посредника между FHL-1 и Nrf ферментами. Таким посредником может быть

гидрогеназа, которая способна перерабатывать молекулярный водород в периплазме, диффундирующий из цитоплазмы, где он нарабатывается из формата FHL-1 комплексом. В периплазме могут работать две гидрогеназы – Hyd-1 и Hyd-2, однако, как было показано [12], Hyd-1 не активна в анаэробных условиях, в связи с чем в качестве посредника была выбрана Hyd-2 гидрогеназа (рис. 1). Выбор ферментов согласуется с условиями, поддерживаемыми в хемостате (рН = 6.5 и концентрации глюкозы 2.25 мМ) [11], для которых измерялись уровни транскрипции оперонов *nrfABCD*, *nirBCD*, и *fdhF*, поскольку опероны, кодирующие Hyd-3 и Hyd-2, экспрессируются в области пониженных значений рН при ограничении уровня глюкозы в среде [13]. Известно, что схожий сценарий цепи передачи электронов с участием мембранных гидрогеназ, реализуется в условиях анаэробного дыхания на fumarate [14].

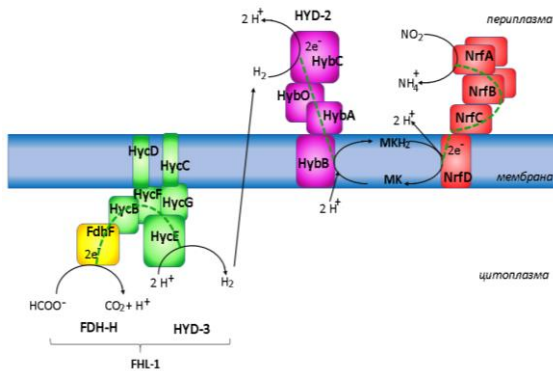


Рис. 1. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-1 комплекса в условиях дыхания на нитрите с использованием в качестве посредника респираторной, мембран-связанной Hyd-2 гидрогеназы.

Возможно ли формирование цепи переноса электронов, в которой донором является водород, а нитрит – акцептором, остается открытым, поскольку единственный эксперимент [15], результаты которого не поддерживают сценарий, предложенный на рисунке 1, и опровергают участие Hyd-2 в потреблении водорода в присутствии нитрита, проводился в области высоких значений нитрита, равных 10 мМ, что гораздо выше области значений, оптимальных для респираторной нитритредуктазы, судя по низкому значению константы Михаэлиса для нитрита [16].

Схема дыхательной цепи с участием FHL-2 комплекса, представлена на рисунке 2. Наличие у Hyd-4 фермента субъединиц с предсказанной протон-транслоцирующей функцией [9, 17] позволяют предположить механизм прямого участия комплекса в процессе поставки электронов для Nrf редуктазы. Что же касается особенностей экспрессии Hyd-4 гидрогеназы, то комплекс FHL-2 нарабатывается и окисляет формат в условиях

слегка повышенных значений рН [18, 19]. Впрочем, существуют и противоположные данные о том, что Hyd-4 нарабатывается при пониженном значении рН [17], как и в экспериментах Ванга в хемостате [11], а наличие у Hyd-4 фермента субъединиц с предсказанной протон-транслоцирующей функцией [9, 17] позволяют предположить возможность ее участия в процессах дыхания на нитрите.

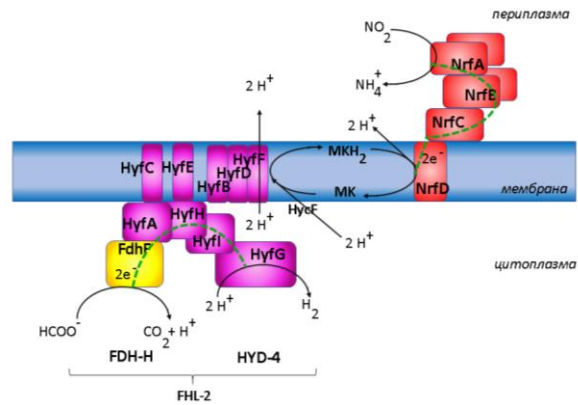


Рис. 2. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-2 комплекса в условиях дыхания на нитрите.

3. Математическая модель респираторной системы на нитрите

Ранее нами была разработана модель [6], описывающая процессы утилизации нитрита периплазматической и цитоплазматической Nrf и NirB редуктазами и процессы обмена нитритом между бактериальной клеткой и средой в глюкозо-лимитированных условиях хемостата. Для этой модели секрция субъединиц Nrf редуктазы в периплазматическое пространство зависит от величины мембранного потенциала, который представляет собой феноменологическую функцию, зависящую от концентрации добавленного нитрита. В настоящей работе Транспорт белков в периплазматическое пространство зависит от величины мембранного потенциала как функция, зависящая от величины мембранного потенциала:

$$kt_{out}(PMF) = \frac{kt_0 + \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}}{1 + \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}} \quad (1)$$

Значение мембранного потенциала определялось как соотношение концентраций протонов в периплазме и цитоплазме. В условиях хемостата рН среды поддерживается постоянным и равным 6.5, 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. Поэтому модель из работы [6] была дополнена подсистемами, описывающими синтез и формирование FHL-1 и Hsd-2 или FHL-2 комплексов в зависимости от варианта состава респираторной цепи. Концентрации белковых комплексов, входящих в состав респираторной цепи, пропорциональны уровню экспрессии оперонов, кодирующих их субъединицы. Транскрипционная активность $fdhF$ оперона описывается функцией $m_{fdhF}(u)$, значение которой определяется уровнем внеклеточного нитрита (u), что было показано в результате экспериментов Ванга и коллег [8].

$$m_{fdhF}(u) = \frac{s_{FdhF,0} + s_{FdhF,1} \left(\frac{u}{K_{FdhF,1}} \right)^{h_{FdhF,1}} + s_{FdhF,2} \left(\frac{u}{K_{FdhF,2}} \right)^{h_{FdhF,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{FdhF,1}} \right)^{h_{FdhF,1}} + \left(\frac{u}{K_{FdhF,2}} \right)^{h_{FdhF,2}}} \quad (2)$$

В моделях введены предположения о негативной регуляции экспрессии оперонов $hucABCD$, $hybABCD$ и $hyfABCD$, кодирующих субъединицы гидрогеназ Hsd-3, Hsd-2 и Hsd-4, что выражается в функциях относительных активностей данных оперонов $m_{huc}(u)$, $m_{hyb}(u)$ и $m_{hyf}(u)$.

$$m_{huc}(u) = \frac{s_{huc,0} + s_{huc,1} \left(\frac{u}{K_{huc,1}} \right)^{h_{huc,1}} + s_{huc,2} \left(\frac{u}{K_{huc,2}} \right)^{h_{huc,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{huc,1}} \right)^{h_{huc,1}} + \left(\frac{u}{K_{huc,2}} \right)^{h_{huc,2}}} \quad (3)$$

$$m_{hyb}(u) = \frac{s_{hyb,0} + s_{hyb,1} \left(\frac{u}{K_{hyb,1}} \right)^{h_{hyb,1}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{hyb,1}} \right)^{h_{hyb,1}}} \quad (4)$$

$$m_{hyf}(u) = \frac{s_{hyf,0} + s_{hyf,1} \left(\frac{u}{K_{hyf,1}} \right)^{h_{hyf,1}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{hyf,1}} \right)^{h_{hyf,1}}} \quad (5)$$

Предположения основаны на данных о негативном влиянии нитрата и / или нитрита на транскрипцию всех других оперонов, вовлеченных в нитрат-нитритную респираторную систему [20, 21], и на данных о единой структуре двухкомпонентных регуляторных систем (NarL/NarQ и NarP/NarX), реагирующих на присутствие как нитрата, так и нитрита. Регуляция транскрипции субстратом описывается в терминах обобщенных функций Хилла [22] по аналогии с функциями влияния нитрита на активность

оперонов $nrfABCD$ и $nirBCD$. Оценка параметров функции $m_{fdhF}(u)$ производилась в ходе адаптации к экспериментальным данным [8], а параметры функций $m_{huc}(u)$, $m_{hyb}(u)$ и $m_{hyf}(u)$ были определены в ходе адаптации расширенной модели к экспериментальным данным [11]. Результаты адаптации показаны на рисунке 3.

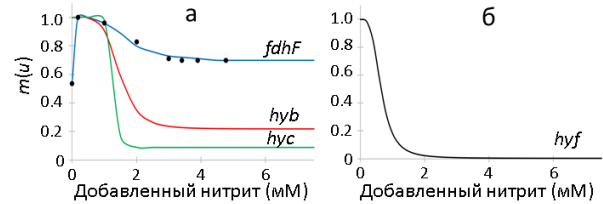


Рис. 3. Зависимости активности оперонов $fdhF$, hyb , huc (а) и hyf (б), от концентрации нитрита, добавленного в хемостат. Кривые – расчет модели, точки – экспериментальные данные [8].

Также были добавлены уравнения, описывающие динамику накопления субстратов для респираторных ферментов: формата, диметил-менахиона и его восстановленной формы, а также водорода (для первого сценария).

Общая модель утилизации нитрита, описывающая как процессы дыхания на нитрите (по сценарию 1 или 2), так и процессы транспорта и детоксикации субстрата, состоит из 38 и 36 уравнений для сценария 1 и 2, соответственно. Численные расчеты модели по зависимости значений стационарных скоростей утилизации нитрита двумя нитритредуктазами и общей скорости утилизации нитрита от концентрации добавленного субстрата проводились в пакете STEP [23] и представлены на рисунке 4.

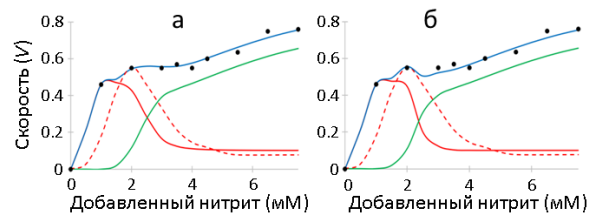


Рис. 4. Скорости переработки нитрита культурой клеток *E. coli* в зависимости от уровня, добавленного в хемостат нитрита (мМ). Красная сплошная линия – скорость утилизации нитрита периплазматической редуктазой, рассчитанная по сценарию 1 (а) и сценарию 2 (б), соответственно; красная пунктирная – скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой, рассчитанная по модели с нерегулируемым транспортом субъединиц фермента в периплазму; зеленая – скорость утилизации нитрита цитоплазматической NirB нитритредуктазой; голубая – общая скорость переработки нитрита. Точки – рассчитанные экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита клетками *E. coli* в хемостате [11].

Из результатов моделирования (см. рис. 4), 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. 4, красные пунктирные кривые), при 1 мМ добавленного нитрита составляет менее 50 % от наблюдаемой в эксперименте.

Таким образом, полученные данные подтверждают вклад мембранного потенциала в регуляцию активности периплазматической Nrf редуктазы при микромолярных концентрациях нитрита в среде. Не исключено, что этот механизм имеет более широкое распространение и может быть важен для других периплазматических ферментов.

4. Благодарности

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований СО РАН (проект № 0324-2018-0017) и при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-01-00237а).

5. Список литературы

- 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. 143–55.
- 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. № 1. P. 297–304. doi: [10.1042/BJ2008074](https://doi.org/10.1042/BJ2008074).
- 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. № 20. P. 5813–5822.
- 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. doi: [10.17537/2013.8.276](https://doi.org/10.17537/2013.8.276).
- 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. V. 10. № 1. С. 193–205. doi: [10.17537/2015.10.193](https://doi.org/10.17537/2015.10.193).
- 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. doi: [10.1186/s12866-015-0619-x](https://doi.org/10.1186/s12866-015-0619-x).
- Darwin A., Tormay P., Page L., Griffiths L., Cole J. Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* 1993. V. 139. № 8. P. 1829–1840.
- Wang H., Gunsalus R.P. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase fdnGHI and fdhF genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP. *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 17. P. 5076–5085.
- Andrews S.C., Berks B.C., McClay J., Ambler A., Quail M.A., Golby P. Guest J.R.A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate-hydrogenlyase system. *Microbiology.* 1997. V. 143. P. 3633–3647.
- McDowall J.S., Murphy B.J., Haumann M., Palmer T., Armstrong F.A., Sargent F. Bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 38. P. 3948–3956. doi: [10.1073/pnas.1407927111](https://doi.org/10.1073/pnas.1407927111).
- Wang H., Tseng C.P., Gunsalus R.P. The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite. *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 17. P. 5303–5308.
- Lukey M.J., Parkin A., Roessler M.M., Murphy B.J., Harmer J., Palmer T., Sargent F., Armstrong F.A. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 6. P. 3928–2938. doi: [10.1074/jbc.M109.067751](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067751).
- Rossmann R., Sawers G., Böck A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. № 11. P. 2807–2814.
- Pinske C., Sargent F. Exploring the directionality of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase: a membrane-bound enzyme capable of fixing carbon dioxide to organic acid. *Microbiologyopen.* 2016. V. 5. № 5. P. 721–737. doi: [10.1002/mbo3.365](https://doi.org/10.1002/mbo3.365).
- Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A. H₂ consumption by *Escherichia coli* coupled via hydrogenase 1 or hydrogenase 2 to different terminal electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 202. № 1. P. 121–124.
- Clarke T.A., Holley T., Hartshorne R.S., Fredrickson J.K., Zachara J.M., Shi L., Richardson D.J. The role of multihaem cytochromes in the respiration of nitrite in

- Escherichia coli* and Fe(III) in *Shewanella oneidensis*. *Biochem Soc Trans.* 2008. V. 36. № 5. P. 1005–1010. doi: [10.1042/BST0361005](https://doi.org/10.1042/BST0361005).
17. Skibinski D.A., Golby P., Chang Y.S., Sargent F., Hoffman R., Harper R., Guest J.R., Attwood M.M., Berks B.C., Andrews S.C. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 23. P. 6642–6653.
 18. Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the FOF1-ATPase, in H₂ production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. *FEBS Lett.* 2002. V. 516. № 1–3. P. 172–117.
 19. Mnatsakanyan N., Bagramyan K., Trchounian A. Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell Biochem. Biophys.* 2004. V. 41. № 3. P. 357–366.
 20. Hopper S., Babst M., Schlensog V., Fischer H.M., Hennecke H., Böck A. Regulated expression in vitro of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 30. P. 19597–19604.
 21. Richard D.J., Sawers G., Sargent F., McWalter L., Boxer D.H. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 1999. V. 145. P. 2903–2912.
 22. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized hill function method for modeling molecular processes. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. № 2B. P. 521–531.
 23. Фадеев С.И., Гайнова И.А. *Пакет программ "STEP" для численного исследования систем нелинейных уравнений*: препринт ИМ СО РАН. Новосибирск, 1994. № 13. С. 1–32.