

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА С ПОМОЩЬЮ КИНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА МОНТЕ-КАРЛО

© 2016 г. А.С. Маслаков, Т.К. Антал, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: alexei.maslakov@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.15 г.

С помощью метода Монте-Карло моделируются процессы в ансамбле фотосинтетических электрон-транспортных систем. Размер ансамбля (3–5 млн элементарных фотосинтетических цепей) соответствует числу фотосинтетических реакционных центров в растительной клетке. Метод позволяет модифицировать структуру модельной системы в соответствии с различными гипотезами об организации процессов в фотосинтетической мембране. На модели воспроизведены полученные в эксперименте кинетики индукции флуоресценции хлорофилла фотосистемы II и окислительно-восстановительных превращений фотоактивного пигмента фотосистемы I. Верификация модели проведена путем сравнения рассчитанных индукционных кривых флуоресценции с экспериментальными кривыми при действии различных ингибиторов фотосинтеза и в условиях температурной инактивации донорной стороны фотосистемы II.

Ключевые слова: индукция флуоресценции, метод Монте-Карло, математическое моделирование, фотосинтетический реакционный центр.

Система первичных процессов фотосинтеза является уникальной субклеточной системой с точки зрения возможностей математического моделирования. В течение последних десятилетий система интенсивно исследовалась в сотнях лабораторий мира [1–4]. Для системы первичных процессов определены константы скоростей отдельных стадий как для реакций в растворе, так и для нативных систем, что является очень сложной задачей для большинства биологических процессов. Спектральные методы (дифференциальная спектроскопия, флуоресцентные методы, метод электронного парамагнитного резонанса) позволяют регистрировать кинетические кривые изменения состояния отдельных компонентов системы, давая информацию о скорости отдельных реакций.

Для проверки гипотез о функциональной организации и регуляции целостной системы и оценки соответствующих параметров элементарных стадий фотосинтетического переноса электрона в последние годы разработано большое число математических моделей. В большинстве моделей используются системы обыкновенных дифференциальных уравнений для описания временных зависимостей вероятностей состояний пигмент-белкового комплекса

фотосистемы II (ФС II) или концентраций окислительно-восстановительных состояний переносчиков в цепи фотосинтеза. Современные модели [5–23] обычно состоят из нескольких десятков дифференциальных уравнений.

Однако такого рода кинетические модели фотосинтетического электронного транспорта имеют свои ограничения. С увеличением количества рассматриваемых в модели переносчиков число уравнений увеличивается мультипликативно. Кроме того, экспериментальные данные свидетельствуют о гетерогенном характере системы и существовании фотосинтетических реакционных центров (ФРЦ), обладающих разным числом переносчиков электрона и разным типом связей между этими переносчиками. Поэтому для описания процессов с учетом соответствующих современных экспериментальных данных модели должны содержать уже сотни и тысячи уравнений. Включение в модель новых компонентов или связей требует изменения всех (или многих) уравнений системы.

В связи с развитием возможностей вычислительной техники и расширением ограничений на объемы вычислений для моделирования процессов в живой клетке все более популярным становится метод Монте-Карло (ММК) [24–28]. К группе ММК относятся численные методы, основанные на получении большого числа реализаций случайного процесса, причем вероят-

Сокращения: ФС II – фотосистема II, ФРЦ – фотосинтетический реакционный центр, ММК – метод Монте-Карло, ФС I – фотосистема I.

ностные характеристики совпадают с аналогичными величинами решаемой задачи.

Прямое моделирование ММК какого-либо процесса подразумевает моделирование поведения отдельных элементарных частей сложной системы. В случае, когда моделируется поведение системы во времени, используют кинетический ММК [29], который получил распространение для моделирования различных систем и процессов в физике, таких как системы разреженных газов, облучение твердых тел ионами в приближении бинарных столкновений и др.

Предлагаемая модель фотосинтетического электронного транспорта относится к типу кинетического ММК. В модели заданы условия переходов между вероятными состояниями системы для каждой индивидуальной фотосинтетической цепи. В частности, в модели определены вероятности возбуждения молекул собирающей антенны при попадании кванта света, вероятности захвата энергии реакционным центром и вероятности переноса электрона с донора на акцептор в пределах фотосинтетических мультиферментных комплексов в тилакоидной мембране, и между этими комплексами и подвижными переносчиками электронов.

В представленной модели определенные «правила» применены к каждой из нескольких миллионов фотосинтетических систем, входящих в рассматриваемый ансамбль, поэтому ее можно отнести к «rule-based» типу моделей, которые часто используются для описания регуляторных процессов в живой клетке [30,31]. События, происходящие в результате выполнения этих «правил», суммируются на протяжении определенного промежутка времени (шага модели), обуславливая наблюдаемый сигнал; временные изменения рассчитанной величины сигнала сопоставляются с данными эксперимента. Для этого, в частности, суммируется количество излученных квантов флуоресценции хлорофилла на заданном отрезке времени и полученные кривые сопоставляются с наблюдаемыми индукционными кривыми флуоресценции. Таким образом, моделируемый сигнал флуоресценции может быть напрямую сопоставлен с сигналом, регистрируемым в разных экспериментальных условиях.

Данный метод позволяет воспроизводить процессы переноса электрона в ансамблях ФРЦ, размер которых сравним с реальным количеством реакционных центров в клетке фотосинтезирующих организмов (3–5 млн), и естественным образом учитывать гетерогенность моделируемого ансамбля. Введение в модель новых путей переноса электрона не требует изменения структуры всей модели, как это имеет место

при использовании аппарата дифференциальных уравнений. ММК позволяет «напрямую» проверять на модели различные гипотезы об изменениях структуры и функциональной организации кластеров ФРЦ при воздействиях, связанных со стрессом разной природы (ингибиторы, тепловой шок, голодание).

В настоящей работе представлена основанная на ММК модель процессов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, включающей пигмент-белковые комплексы фотосистемы II, цитохромного комплекса b_6/f , фотосистемы I (ФС I), а также мобильные переносчики: пластохинон, пластоцианин, в неявном виде ферредоксин. Рассмотрена структура модели и методы расчетов. Выход флуоресценции сопоставлен с экспериментальными кривыми индукции флуоресценции. Концентрация молекул фотоактивного пигмента фотосистемы I P700 в окисленном состоянии сопоставлена с экспериментально наблюдаемыми изменениями поглощения в спектральной области 820 нм. В рамках модели исследовали влияние разной интенсивности света, повышенной температуры, а также различных ингибиторов фотосинтеза на кривые индукции флуоресценции.

МОДЕЛЬНАЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Модельная фотосинтетическая система представляет собой набор большого числа (3–5 млн) элементов – фотосинтетических электрон-транспортных цепей. Отдельный элемент фотосинтетической системы включает ФС II, пул пластохинонов, цитохромный комплекс b_6/f , пластоцианин и ФС I [32]. Схема взаимодействия компонентов каждой элементарной фотосинтетической цепи, описываемой в модели, приведена на рис. 1 и соответствует устоявшимся представлениям о фотосинтетическом электронном транспорте согласно Z-схеме [33].

Основным источником флуоресценции является ФС II, поэтому в модели ее структура представлена наиболее детально. Каждый реакционный центр ФС II имеет антенну, донорную часть, включающую комплекс выделения кислорода, тирозин Z, фотоактивный пигмент P680, и акцепторную часть: феофитин, первичный хинон Q_A , сайт Q_B , который может быть свободен или содержать молекулу пластохинона.

Кислородвыделяющий комплекс может находиться в одном из четырех возможных состояний: S_0 , S_1 , S_2 и S_3 [34]. Экспериментальные данные указывают на то, что в начальном состоянии после темновой адаптации образцов

так называемого пластохинонового цикла Митчела [37].)

Далее в цепи переноса электрона располагается ФС I, представленная в модели реакционным центром P700, первичным акцептором A_0 и пулом переносчиков электронов в акцепторной части ФС I. Все переносчики электронов, расположенные после A_0 (хлорофилла), включая A1 (хинон), F_x , F_a , и F_b , представлены в виде общего пула. В пул также входит ферредоксин. Емкость пула переносчиков электрона акцепторной части принята равной четырем электронам.

На свету P700 может переходить в возбужденное состояние по механизму, аналогичному P680. После этого становится возможным разделение зарядов между P700 и первичным акцептором A_0 . При этом P700 переходит в окисленную форму. Далее P700 может быть восстановлен переносчиком электрона пластоцианином, а A_0 может передавать электрон далее по цепи – в пул переносчиков в акцепторной части ФС I и далее на ферредоксин. Циклический транспорт вокруг ФС I в представленной модели не учитывается.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ РЕАКЦИОННЫМИ ЦЕНТРАМИ В ДИМЕРЕ ФОТОСИСТЕМЫ II

В модели учитывается тот факт, что между двумя реакционными центрами ФС II возможен перенос энергии, так называемое экситонное взаимодействие (рис. 2). Рассмотрены α -центры ФС II, представляющие собой димеры двух субъединиц ФС II, связанные общей периферической антенной светособирающего комплекса и преимущественно локализованные в гранальных областях тилакоидной мембраны [38,39]. В соответствии с данными, подробно обсуждаемыми в работе [35], введено энергетическое взаимодействие между реакционными центрами в димере, при этом возбуждение, пришедшее на закрытый реакционный центр (с восстановленным Q_A^- , на рис. 2 изображен слева), может передаваться в соседний реакционный центр, если он находится в открытом состоянии, т.е. с нейтральным Q_A (на рис. 2 изображен справа).

Константы скоростей процессов, используемые в модели, представлены в таблице.

В процессе счета программа делает короткие временные шаги, на каждом из которых проверяет возможность перехода каждой элементарной системы (фотосинтетической цепи) из того состояния, в котором она находится в данный момент времени, во все другие возмож-

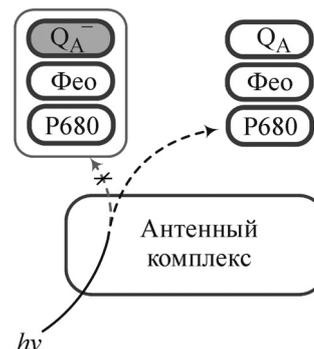


Рис. 2. Перенос энергии возбужденного состояния из «закрытого» реакционного центра на «открытый» внутри димерного суперкомплекса.

ные состояния. Для этого рассчитывается вероятность каждого из возможных переходов и вероятность того, что результатом очередного минимального симуляционного шага будет один из возможных переходов в другое состояние. Алгоритм работы программы представлен в виде блок-схемы на рис. 3.

Вероятность P_n для n -го из возможных переходов можно найти из выражения $P_n = 1 - e^{-kt}$, где k – константа скорости соответствующего процесса, а t – длина минимального симуляционного шага. Тогда вероятность того, что произойдет один из этих переходов, можно найти из выражения $P = (1 - e^{-(k_1+k_2+\dots+k_n)xt})$, где k_1, k_2, \dots, k_n – константы скоростей соответствующих процессов.

Затем генерируем случайное число в интервале от нуля до единицы и проверяем, как оно соотносится с вероятностью того, что что-то произойдет на этом шаге. Если случайное число больше значения этой вероятности, то для данной элементарной цепи на этом шаге ничего не происходит, и симуляция переходит на следующий шаг. Если же это случайное число оказалось меньше значения вероятности, то далее нужно выбрать, какой именно из возможных переходов должен произойти. Для этого разбиваем интервал от нуля до единицы на меньшие интервалы, величины которых пропорциональны величинам вероятности тех переходов, за которые они отвечают. Затем генерируем еще одно случайное число в интервале от нуля до единицы, проверяем, в какой из интервалов оно попадает, и осуществляем соответствующий переход для данной простейшей модельной единицы. Эти же правила применяются на каждом шаге к каждой простейшей модельной единице, присутствующей в модельной системе. Вся модельная система состоит из порядка 3 млн таких простейших единиц – элементарных фотосинтетических цепей.

Параметры модели и используемые в модели значения параметров

Наименование параметра	Используемое значение параметра	Источник
Константа скорости перехода из состояния S_0 в состояние S_1	$5 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$	[40]
Константа скорости перехода из состояния S_1 в состояние S_2	$3 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$	[40]
Константа скорости перехода из состояния S_2 в состояние S_3	$1 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$	[40]
Константа скорости перехода из состояния S_3 в состояние S_0	$3 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$	[40]
Константа скорости восстановления P680 ⁺ тирозином Y_z	$5 \cdot 10^7 \text{ c}^{-1}$	[41]
Константа скорости переноса электрона от P680 к Y_z^+	$1,7 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$	[41,42]
Константа скорости разделения зарядов в открытом реакционном центре ФС II	$3 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости рекомбинации зарядов между P680 ⁺ и Feo^- в открытом реакционном центре ФС II	$3 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости разделения зарядов в закрытом реакционном центре ФС II	$4,8 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости рекомбинации заряда между Feo^- и P680 ⁺ в закрытом реакционном центре ФС II	$3,4 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости переноса электрона от Feo^- к Q_A	$2,3 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости переноса электрона от Q_A^- к Q_B	3500 c^{-1}	[44]
Константа скорости переноса электрона от Q_B^- к Q_A	200 c^{-1}	[42,44]
Константа скорости переноса электрона от Q_A^- к Q_B^-	2000 c^{-1}	[42,44]
Константа скорости переноса электрона от Q_B^{2-} к Q_A	50 c^{-1}	[42,44]
Константа скорости отсоединения $Q_B\text{H}_2$ от ФС II	1500 c^{-1}	Оценено согласно модели [44,45]
Константа скорости присоединения PQH_2 ($Q_B\text{H}_2$) к ФС II	1500 c^{-1}	Оценено согласно модели [44,45]
Константа скорости присоединения PQ (Q_B) к ФС II	1500 c^{-1}	Оценено согласно модели [44,45]
Константа скорости отсоединения Q_B от ФС II	1500 c^{-1}	Оценено согласно модели [44,45]
Константа скорости окисления PQH_2 цитохромным комплексом b_6/f	200 c^{-1}	[46]
Константа скорости безызлучательной рекомбинации заряда между P680 ⁺ и Feo^- в закрытом реакционном центре	$3 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$	[43]
Константа скорости рекомбинации зарядов между P680 ⁺ и Q_A^-	$1 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$	[47,48]
Константа скорости испускания квантов флуоресценции возбужденными реакционными центрами	$6,7 \cdot 10^7 \text{ c}^{-1}$	[49]
Количество фотонов, попадающих в антенну одного реакционного центра ФС II в секунду	1500 c^{-1}	[50,51]
Количество фотонов, попадающих в антенну одного реакционного центра ФС I в секунду	1500 c^{-1}	
Константа скорости тушения возбужденного состояния окисленным хлорофиллом реакционного центра P680 ⁺	$1 \cdot 10^{11} \text{ c}^{-1}$	[52]
Константа скорости переноса возбуждения из антенны ФС II к P680	$7,6 \cdot 10^{10} - 2,4 \cdot 10^{11} \text{ c}^{-1}$	[53]
Константа скорости переноса возбуждения от P680 к антенне ФС II	$1,44 \cdot 10^{11} - 2,4 \cdot 10^{11} \text{ c}^{-1}$	[53]

Окончание

Наименование параметра	Используемое значение параметра	Источник
Начальное соотношение $S_1:S_0$ состояний КВК при нормальных физиологических условиях	0,75:0,25	[34,54,55]
Процент β реакционных центров ФС II при нормальных физиологических условиях	35%	[56]
Процент Q_B не восстанавливающих реакционных центров ФС II при нормальных физиологических условиях	5,00%	[57]
Вероятность переноса энергии возбуждения из закрытого реакционного центра в соседний открытый реакционный центр	100,00%	[45]

Каждый переход, сопровождаемый высвечиванием кванта флуоресценции, фиксируется для дальнейшей обработки. В результате работы модели получаем запись о том, сколько высвечиваний произошло на каждом шаге симуляции.

В результате симуляции работы одного димера ФС II получается запись о нескольких десятках высвечиваний квантов флуоресценции. Однако для построения кривой кинетической индукции флуоресценции этой информации недостаточно. Результат симуляции работы димера ФС II можно считать точкой в многомерном пространстве, в котором каждой точке на графике кривой индукции флуоресценции соответствует определенное количество высвеченных квантов. Тогда можно использовать ММК, чтобы накопить достаточное количество таких точек для построения хорошо разрешенной кривой индукции флуоресценции.

В данной модели одновременно симулировали работу 3–5 млн ФРЦ. Затем делили время симуляции на достаточное количество (500–1000) одинаковых временных промежутков, суммировали количество высвечиваний на каждом из них и строили график зависимости количества высвечиваний от времени. Этот график представляет собой модельную кривую индукции флуоресценции.

Кроме того, в каждый момент времени модель фиксирует редокс-состояния всех компонентов системы, что позволяет получить информацию о кинетике изменения этих состояний. В частности, модель позволяет получить кинетику окисления-восстановления реакционного центра ФС I P700, что позволяет сравнить результаты с полученными экспериментально кинетиками изменения ΔA_{820} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Проростки гороха (*Pisum sativum*) выращивали на жидкой питательной среде, как описано в работе [58]. Для измерений использовали листья 5–7-дневных растений. Высокоразрешенные индукционные кривые флуоресценции хлорофилла *a* (ОЖР-кривые) и светоиндуцированные изменения сигнала отражения модулированного света на длине волны 820 нм (I_{820}), отражающие редокс-изменения состояния первичного донора электронов P700 в ФС I, измеряли с помощью прибора M-PEA2 (Multi-Functional Plant Efficiency Analyzer, Hansatech-Instruments, Великобритания). Плотность потока фотонов актиничного света составляла 3000 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$. Перед измерениями листья адаптировали к темноте в течение 5 мин.

В экспериментах по влиянию реагентов и повышенной температуры на форму индукционной кривой флуоресценции измерения проводили на приборе PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech-Instruments, Великобритания) при плотности потока фотонов 3000 мкмоль фотонов $m^{-2}c^{-1}$ (на поверхности листа). Обработку реагентами проводили путем погружения листовых дисков нижней стороной в водный раствор соответствующего ингибитора, после чего листья выдерживали определенное время в темноте при комнатной температуре и измеряли ОЖР-кривую. Концентрация реагента и длительность темновой обработки составляли $5 \cdot 10^{-5}$ М и 30 мин для диурона, 10^{-2} М и 45 мин для метилвиологена, $2 \cdot 10^{-5}$ М и 2 ч для дибромотимохинона. Термическую обработку проводили путем погружения листа в термостатируемую баню при $50^\circ C$ в темноте на 2 и 4 мин.

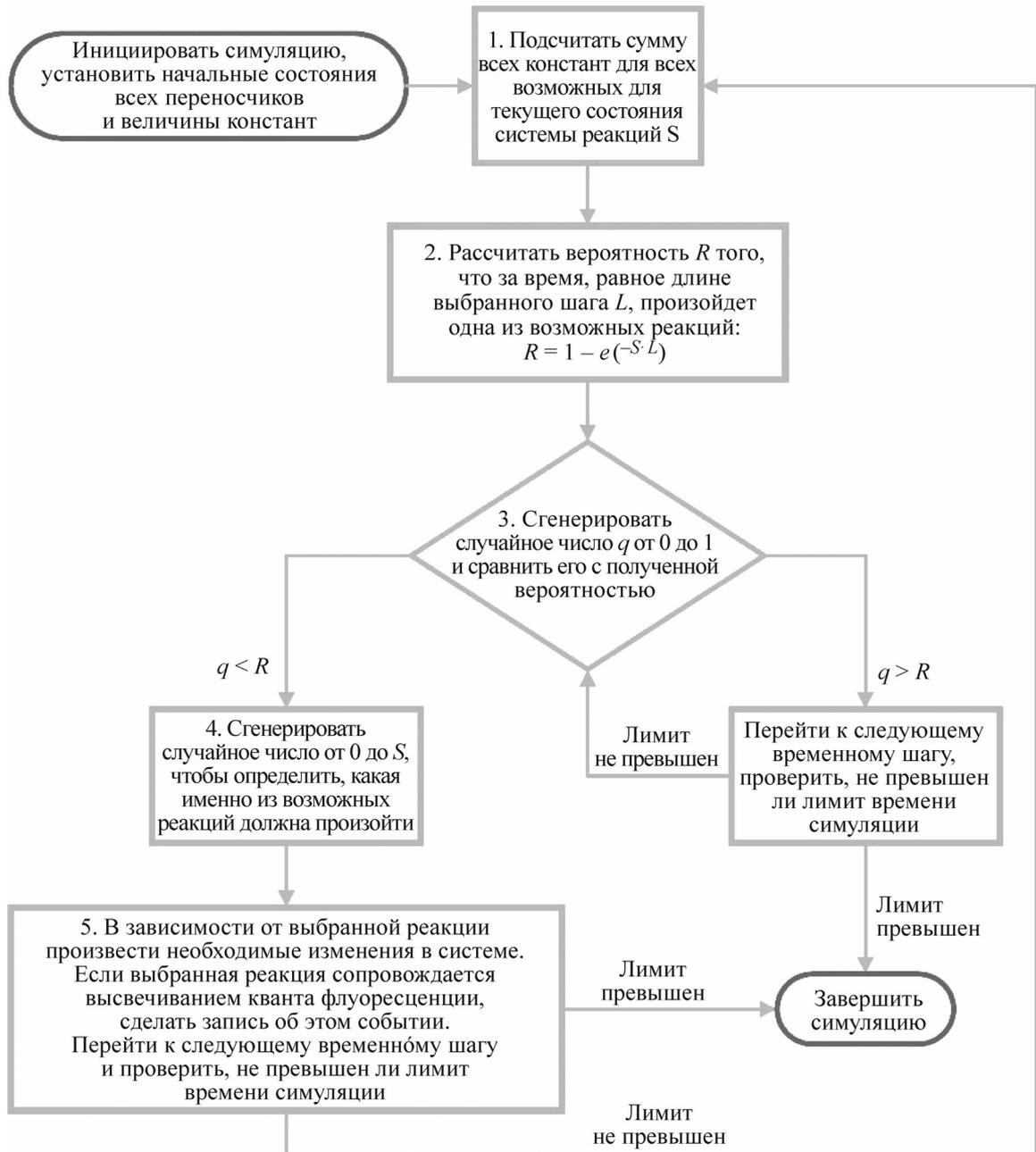


Рис. 3. Блок-схема алгоритма расчета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки работоспособности модели и изучения ее свойств были проведены вычислительные эксперименты. Предполагалось, что значения констант скоростей переноса электрона между компонентами внутри каждого элемента системы (ФРЦ) неизменны, их значения и источники данных приведены в таблице.

На рис. 4а приведены данные по изменениям амплитуды сигнала отражения на длине волны 820 нм, полученные на листе горошка с ис-

пользованием прибора М-РЕА. Эти изменения отражают редокс-переходы Р700 в ФС I. На рис. 4б приведена рассчитанная на основе модели кривая редокс-изменений Р700, которая демонстрирует хорошее соответствие с экспериментальными данными. Сигнал в обоих случаях снижается с началом освещения, отражая накопление окисленного Р700 в результате светоиндуцированного перехода электрона на акцепторную часть ФС I. Максимальное окисление Р700 наблюдается через 20 мс после включения света, затем кривая медленно возрастает,

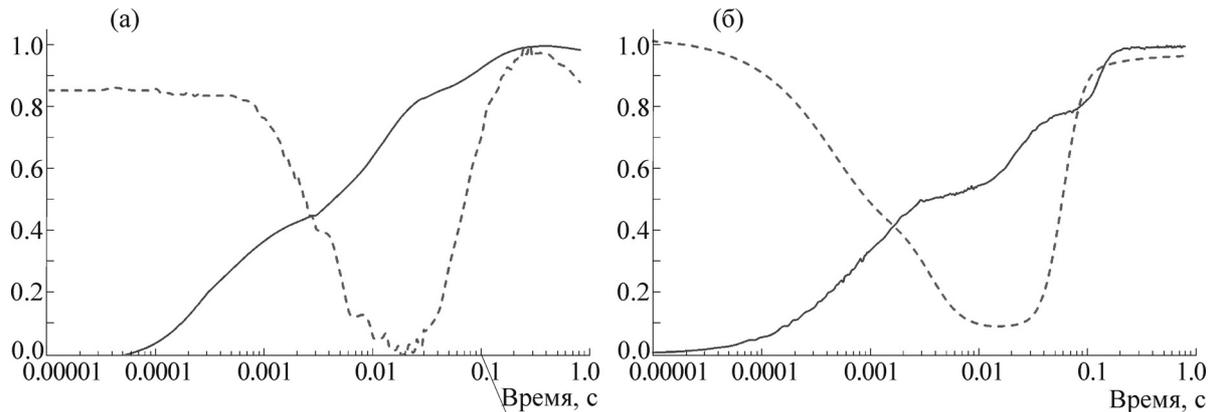


Рис. 4. Экспериментальные (а) кривые индукции флуоресценции (сплошная линия) и индукции поглощения в полосе 820 (пунктирная линия) и модельные (б) кривые индукции флуоресценции и изменения редокс-состояния Р700 во времени. Приведены данные, нормированные на максимум на кривой (нет подписи к ординате).

выхода на плато через 100 мс, что отражает восстановление Р700⁺ в результате переноса электронов от ФС II.

Более подробно были исследованы особенности кривой индукции флуоресценции в зависимости от параметров модели. Модельные индукционные кривые флуоресценции демонстрируют хорошее соответствие с экспериментальной кривой на всех стадиях увеличения выхода флуоресценции хлорофилла. Выход на первый промежуточный уровень J происходит через 3 мс после начала освещения, а амплитуда OJ составляет примерно 45% от амплитуды ОР. Второй промежуточный уровень I наблюдается на временах около 40 мс и составляет по амплитуде 85% от величины ОР. Выход флуоресценции достигает максимального уровня Р примерно после 200 мс освещения.

Влияние интенсивности света на форму ОJР-кривой. Изменению интенсивности света в модели соответствует изменение «световой» константы, характеризующей переход нейтрального Р680 в возбужденное состояние. При увеличении интенсивности возбуждающего света (увеличении световой константы в модели), в реакционный центр попадает большее количество квантов света в единицу времени. В связи с этим быстрее нарастает количество закрытых реакционных центров и быстрее нарастает кривая индукции флуоресценции. На рис. 5 представлены модельные кривые для разных значений «световой» константы (количество квантов, попадающих в антенну ФРЦ в единицу времени).

Моделирование действия ингибиторов. Для верификации модели использовались условия, соответствующие действию разного рода ингибиторов электронного транспорта. Также были рассмотрены изменения, происходящие в до-

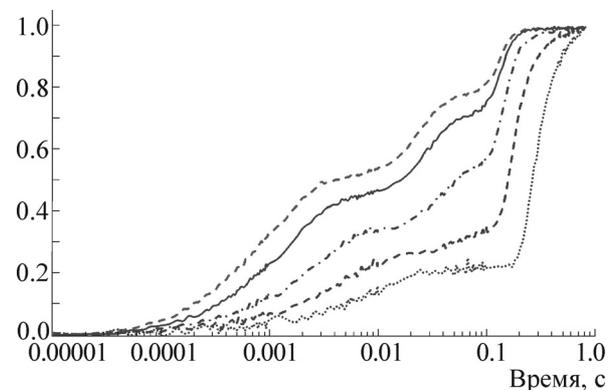


Рис. 5. Результаты моделирования кинетики индукции нарастающего участка кривой индукции флуоресценции при разных интенсивностях возбуждающего света. За 100% принята интенсивность 3000 мкмоль квантов/(м²с).

нормной части при тепловом шоке (выдерживание объекта несколько минут при температуре 50°C), который, как известно, приводит к резкому снижению активности кислородвыделяющего комплекса [63].

Диурон (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) является широко применяемым ингибитором-блокатором переноса электрона с первичного Q_A на вторичный Q_B акцептор в ФС II [42,59]. Влияние этого ингибитора приводит к упрощению формы кинетики нарастания флуоресценции, кинетика становится однофазной, максимальный уровень достигается на меньших временах. При этом максимальный уровень флуоресценции в обработанных образцах обычно ниже сигнала в контроле на 10–20% (эксперимент, рис. 6а).

Для имитации действия диурона в модели был запрещен перенос электрона с Q_A на Q_B.

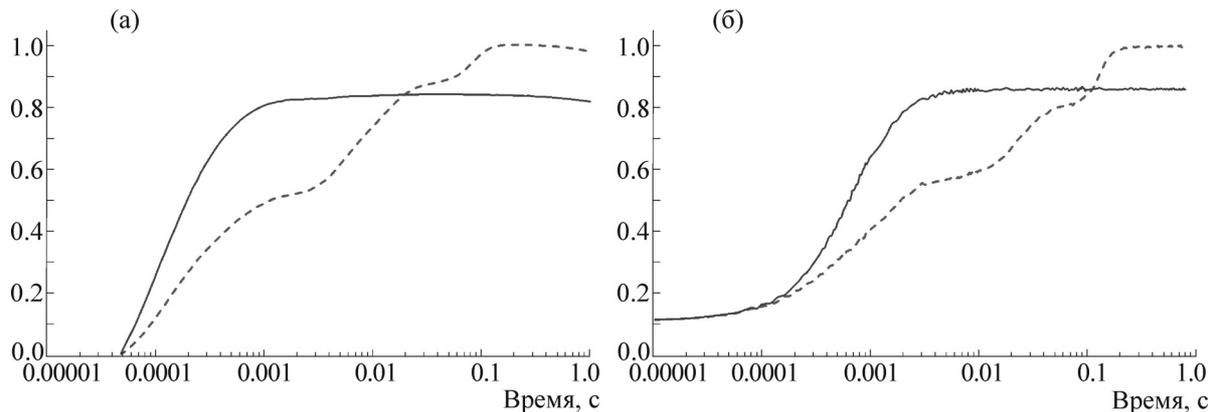


Рис. 6. Кривые индукции флуоресценции в контроле (сплошная линия) и при воздействии диурона (пунктирная линия): (а) – экспериментальные данные (30 мин в водном растворе $5 \cdot 10^{-4}$ М диурона в темноте); (б) – модельные кривые. Параметры модели указаны в таблице.

При этом вследствие отсутствия оттока электронов с первичного акцептора Q_A реакционные центры оказываются «закрытыми» уже на участке ОI и остаются в «закрытом» состоянии и далее, что исключает дальнейший подъем уровня флуоресценции. Максимальный уровень флуоресценции при этом не достигает уровня P, что связано с учетом в модели нефотохимического тушения пулом хинонов, находящимся в окисленном состоянии. Результаты моделирования действия диурона качественно совпадают с экспериментальными данными (рис. 6а,б).

Дибромотимохинон ингибирует ре-окисление пластохинола (PQH_2), связываясь с Q_O -сайтом цитохромного комплекса b_6/f [60]. В присутствии дибромотимохинона трехфазная кинетическая кривая ОIIP преобразуется в двухфазную ОI-кривую, при этом максимальный выход флуоресценции (P) достигается на более ранних временах, соответствующих точке I (20–30 мс) [61]. Наиболее вероятная интерпретация данного эффекта предполагает, что ингибирование ре-окисления пула пластохинонов приводит к тому, что пластохиноны восстанавливаются полностью в течение фазы II, индуцируя переход всех центров ФС II в закрытое состояние.

Для имитации действия дибромотимохинона в модели было запрещено окисление молекул пластохинона цитохромным комплексом b_6/f , что прерывает поток электронов к ФС I и препятствует ре-окислению пула пластохинонов. В связи с этим на кривой индукции не наблюдается замедление роста флуоресценции, связанного с ре-окислением пула пластохинонов дальнейшими переносчиками, который оказывается полностью восстановленным уже к концу

стадии II. Соответственно, прекращается ре-окисление Q_B и Q_A , в связи с чем большинство реакционных центров оказывается в «закрытом» состоянии. К концу стадии II уровень флуоресценции достигает максимума, соответствующего уровню P в отсутствие ингибитора и перестает расти, что качественно соответствует изменениям, наблюдаемым в экспериментах (рис. 7а,б).

Метилвиологен является эффективным окислителем железо-серных кластеров в ФС I и ферредоксине, восстанавливая, в свою очередь, молекулярный кислород до супероксид аниона с последующей генерацией пероксида водорода [62]. Ранее было показано, что добавление этого редокс-агента к фотосинтетическим образцам приводит к снижению амплитуды самой медленной фазы IP на кривой индукции флуоресценции, что свидетельствует о важной роли редокс-состояния переносчиков ФС I и ферредоксина в формировании фазы IP [61].

Для имитации действия метилвиологена в модели было снято ограничение на объем пула переносчиков электрона после первичного акцептора ФС I (см. рис. 1). Таким образом, акцепторная часть ФС I смогла принимать неограниченное число электронов. Это обеспечило постоянную скорость ре-окисления пула пластохинонов и предшествующих ему переносчиков Q_B и Q_A . В связи с этим, после достижения уровня флуоресценции соответствующего концу стадии II, дальнейший рост флуоресценции не наблюдается. Именно этот отток электронов через ФС I обеспечивает постоянное присутствие определенного количества «открытых» реакционных центров и не дает флуоресценции достигнуть максимального уровня, соответст-

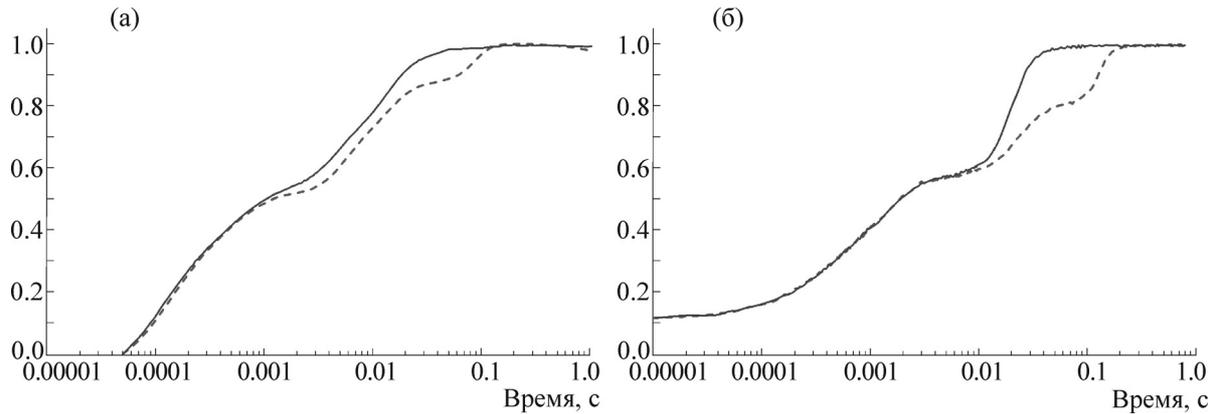


Рис. 7. Кривые индукции флуоресценции в контроле (пунктирная линия) и при воздействии дибромотимохинона (сплошная линия): (а) – экспериментальные данные (3 ч в водном растворе $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л дибромотимохинона в темноте); (б) – модельные кривые. Параметры модели указаны в таблице.

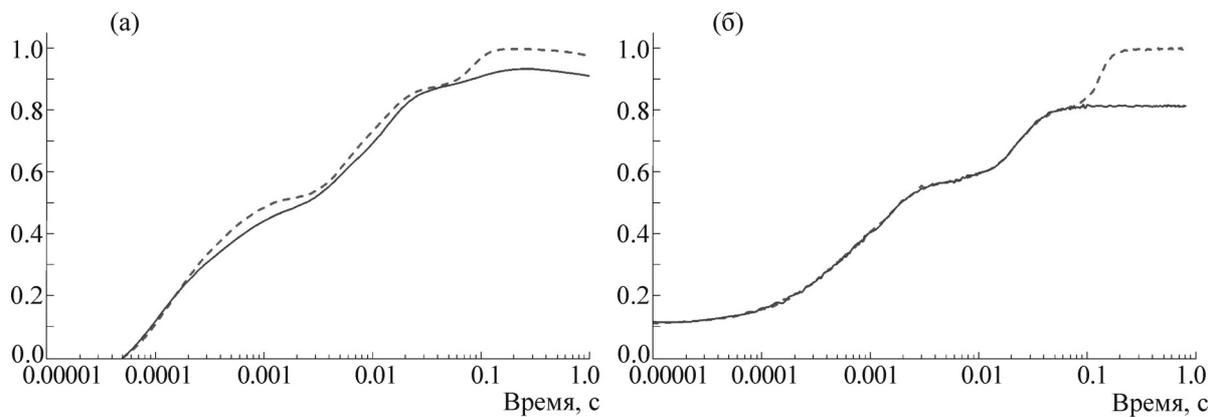


Рис. 8. Кривые индукции флуоресценции в контроле (пунктирная линия) и при воздействии метилвиологена (сплошная линия): (а) – экспериментальные данные (45 мин в водном растворе $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л метилвиологена в темноте); (б) – модельные кривые. Параметры модели указаны в таблице.

вующего уровню Р в отсутствие метилвиологена. На рис. 8а,б видно, что искусственное ре-окисление переносчиков электронов в ФС I приводит к подавлению стадии IP и, таким образом, к снижению максимального выхода флуоресценции с уровня Р до уровня I, что хорошо согласуется с экспериментальными данными по действию метилвиологена. Полное восстановление пула пластохинонов становится невозможным при окисленном состоянии последующих переносчиков электронов, включая пластоцианин, ФС I и ферредоксин, что указывает значительную роль последних в формировании стадии IP.

Термическая обработка. Выдерживание объекта несколько минут при температуре около 50°C приводит к резкому снижению активности кислородвыделяющего комплекса [63]. В модели действие высокой температуры имитировали

блокированием переноса электронов из кислород-выделяющего комплекса на P680. Экспериментальные данные и модельные кривые приведены на рис. 9а,б. При ингибировании активности комплекса на свету происходит быстрое восстановление Q_A , которое сопровождается ростом выхода флуоресценции. Далее происходит ре-окисление Q_A хиноном Q_B , при этом новые электроны не поступают на Q_A из-за неактивного состояния кислородвыделяющего комплекса, и выход флуоресценции снижается.

Отличие амплитуды пика на экспериментальной и модельной кривой связано с тем, что при нагревании помимо инактивации кислородвыделяющего комплекса происходит также частичная инактивация ФС II, что приводит к снижению выхода флуоресценции. Этот факт не учитывается в модели.

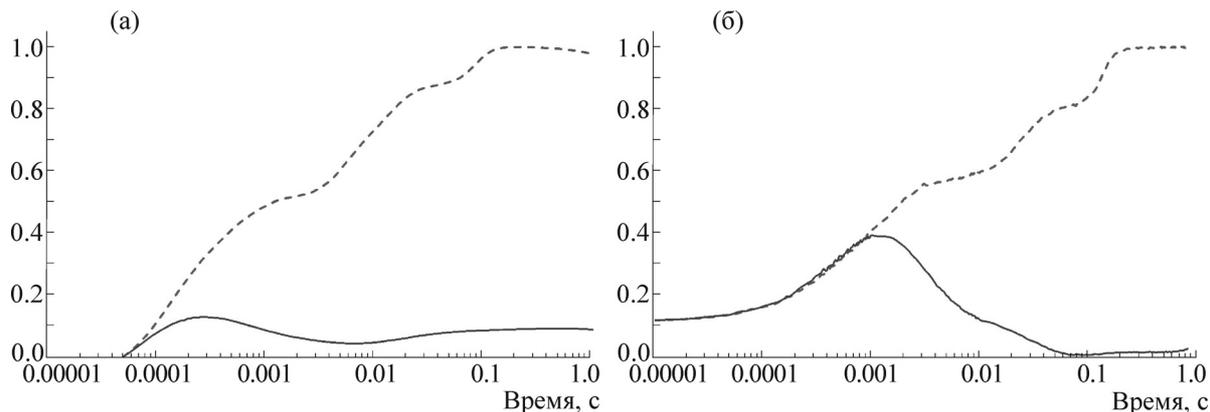


Рис. 9. Кривые индукции флуоресценции в контроле (пунктирная линия) и при воздействии высокой температуры (сплошная линия): (а) – экспериментальные данные (4 мин в водном растворе, в темноте, при 50°C); (б) – модельные кривые. Параметры модели указаны в таблице.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предложен метод описания процессов переноса электрона при фотосинтезе в ансамбле ФРЦ, число которых приближается к реальному числу ФРЦ в растительной клетке (несколько млн). Метод позволяет описывать процессы в системе в разных экспериментальных условиях (стресс, ингибиторы) и путем сравнения модельных кинетических кривых с экспериментальными, проверять гипотезы о механизмах изменения системы в неблагоприятных условиях.

Предлагаемый метод описания имеет ряд особенностей. Широко распространенные кинетические модели представляют собой системы дифференциальных уравнений и построены на основе представлений об определенных кинетических законах взаимодействия компонентов фотосинтетической цепи, например о независимости движения отдельных молекул и пропорциональности скорости реакции числу столкновений молекул донора и акцептора в случае закона действующих масс. В представленной нами модели и «rule-based»-кинетическом ММК, используемом ранее в работе [28], описываются процессы в каждой индивидуальной электрон-транспортной цепи (или группе из двух–пяти цепей, объединенных на уровне светособирающего комплекса). В нашей модели кванты флуоресценции, испускаемой каждой из молекул Р680* за определенный промежуток времени, суммируются, имитируя сигнал флуоресценции, регистрируемый в эксперименте. В работе [28] интенсивность флуоресценции предполагается пропорциональной концентрации восстановленных молекул Q_A .

Моделирование процессов в отдельных фотосинтетических цепях ансамблей, состоящих

из сотен тысяч и миллионов электрон-транспортных цепей, стало возможным благодаря использованию мощностей современной вычислительной техники. Суммарный сигнал от моделируемого ансамбля имитирует сигнал, получаемый в эксперименте на суспензии клеток (хлоропластов) методами спектрометрии. Число электрон-транспортных цепей соответствует по порядку величины количеству реакционных центров в клетке микроводорослей.

Такой метод построения модели позволяет легко модифицировать структуру моделируемых цепочек переноса электрона, учитывать различия отдельных цепей и объединения фотосинтетических реакционных центров ФС II в группы (энергетический обмен). Отметим, что при моделировании такого объединения традиционным способом с помощью систем дифференциальных уравнений для вероятностей (концентраций) возможных состояний системы требуется многократное увеличение числа уравнений системы. Любая модификация моделируемой цепи требует здесь изменения вида многих уравнений системы, что представляет собой трудоемкую задачу.

Преимущества «индивидуального подхода» к описанию событий в отдельной электрон-транспортной цепи были использованы нами ранее для интерпретации результатов экспериментов по воздействию серного голодания на форму начального участка нарастающей части индукционной кривой флуоресценции клеток водорослей [35]. Первая версия нашей модели, воспроизводящая процессы на участке Р680–Фео– Q_A для ансамбля из 2 млн ФРЦ ФС II, дала возможность оценить соотношение альфа- и бета-центров в норме и после определенных сроков серного голодания. В рассмотренной в

данной работе версии модели учитывалось присутствие бета-центров (35% реакционных центров имеют меньший размер антенны и не могут образовывать димер ФС II) и не восстанавливающих Q_B центров (15% реакционных центров не способны восстанавливать пул пластохинонов). Такая гетерогенность строения реакционных центров соответствует данным, приведенным в работе [56].

Модель реализована с использованием программы, написанной А.С. Маслаковым на языке CUDA C и использующей графический процессор компании NVIDIA для ускорения вычислений. В процессе вычислений каждый графический процессор производит параллельную симуляцию работы 16384 модельных электрон-транспортных цепей, представленных на рис. 1. Для генерации случайных чисел используется генератор Mersenne Twister (реализованный в библиотеке cuRAND). Для получения кривой индукции флуоресценции необходима симуляция работы нескольких миллионов электрон-транспортных цепей, поэтому расчеты проводились на графической части суперкомпьютера «Ломоносов». Для получения кривой индукции использовалось до 300 графических процессо-ров.

Принцип работы нашей модели аналогичен принципу работы модели, описанной в работе [28]. Степень детальности описания процессов в реакционном центре ФС II, водоразлагающем комплексе, на уровне взаимодействия ФС II с пулом хинонов та же, что и в модели [28]. Более подробно, с учетом донорного и акцепторного компонентов описана структура ФС I, что позволяет нам наряду с кинетикой флуоресценции моделировать кинетику окислительно-восстановительных превращений фотоактивного пигмента P700, см. рис. 5.

Основным отличием нашей модели является то обстоятельство, что величина выхода флуоресценции, сопоставляемая с экспериментальными данными по регистрации индукционной кривой флуоресценции, оценивается непосредственно как число излученных квантов, а не считается пропорциональной концентрации компонента Q_A^- , как это делается в работе [28].

Модель позволяет сравнить кинетику этих процессов – выхода флуоресценции и кинетики восстановления первичного акцептора хиноновой природы Q_A (рис. 10).

При учете процессов, приводящих к рекомбинации с регенерацией возбужденного состояния P680, между кривой индукции флуоресценции и кинетикой восстановления Q_A появляются различия. Эти различия усиливаются при учете

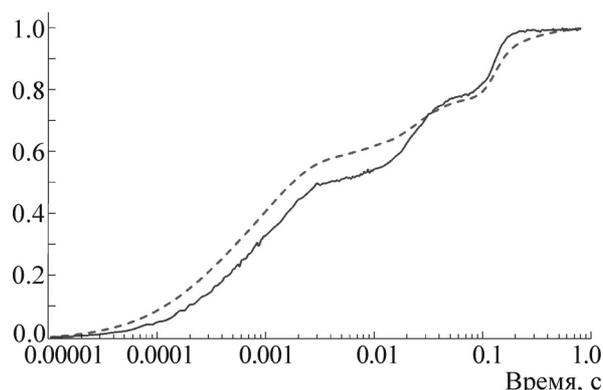


Рис. 10. Полученные на модели кривые индукции флуоресценции (сплошная линия) и восстановления Q_A (пунктирная линия).

нефотохимических видов тушения, таких как тушение окисленной формой P680 (P680+) [64]. Наибольшие отличия наблюдаются на начальном участке, связанном с восстановлением акцепторной части ФС II. Предположение об отличии между кинетикой индукции флуоресценции и кинетикой восстановления Q_A были ранее высказаны в работе [65].

Предложенный в работе метод моделирования включает элементы кинетического ММК и «rule-based»-методов. Метод применим для описания процессов в больших ансамблях индивидуальных фотосинтетических цепей, позволяет имитировать индивидуальные особенности структурных единиц фотосинтетического аппарата и проверять основанные на экспериментальных данных гипотезы о структуре и гетерогенной организации процессов в фотосинтетической мембране.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику кафедры биофизики биологического факультета МГУ С.С. Хрущеву за ценные советы в процессе написания программы и отладки модели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 14-04-00302, 14-04-00326).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Современные проблемы фотосинтеза* (Изд-во ИКИ, М.-Ижевск, 2014).
2. *Discoveries in Photosynthesis*. Ed. by Govindjee, J. T. Beatty, H. Gest, and J. F. Allen, *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Springer, Berlin, 2006), vol. 20.
3. A. Smith, *Plant Biology* (Garland Science, New York, 2010).

4. R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, 2nd ed. (John Wiley & Sons, 2014).
5. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, in: *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*, Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, V. 19 (Springer, Dordrecht, 2004), PP. 321–362.
6. D. Lazár, *Photosynthetica*, **47**, 483 (2009).
7. D. Lazár, *J. Theor. Biol.* **335**, 249 (2013).
8. D. Lazár and G. Schansker, in: *Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems*, Ed. by A. Laisk, L. Nedbal, and Govindjee, *Advances in photosynthesis and respiration*, (Springer, Dordrecht, 2009), vol. 29, pp. 85–123.
9. X.-G. Zhu, Govindjee, N. R. Baker, et al., *Planta* **223**, 114 (2005).
10. N. E. Belyaeva, F.-J. Schmitt, R. Steffen, et al., *Photosyn. Res.* **98**, 105 (2008).
11. N. E. Belyaeva, F. J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Biosystems* **103**, 188 (2011).
12. N. E. Belyaeva, F. J. Schmitt, V. Z. Paschenko, et al., *Plant Physiol. Biochem.* **77**, 49 (2014).
13. G. Y. Riznichenko, N. E. Belyaeva, I. B. Kovalenko, and A. B. Rubin, *Biophysics* **54**, 10 (2009).
14. J.-D. Rochaix, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 878 (2011).
15. A. B. Rubin and G. Yu. Riznichenko, in: *Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems*, Ed. by A. Laisk, L. Nedbal, and Govindjee, *Advances in photosynthesis and respiration* (Springer, Dordrecht, 2009), vol. 29, pp. 151–176.
16. A. B. Rubin and G. Yu. Riznichenko, *Mathematical biophysics* (Springer, 2013).
17. A. Stirbet, Govindjee, B. J. Strasser, and R. J. Strasser, *J. Theor. Biol.* **193**, 131 (1998).
18. A. Stirbet and Govindjee, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **104**, 236 (2011).
19. A. Stirbet and Govindjee, *Photosynth. Res.* **113**, 15 (2012).
20. С. С. Макаров, Е. А. Грачев и Т. К. Антал, *Математическая биология и биоинформатика*, **7** (2), 508 (2012).
21. A. Stirbet, *Photosynth. Res.* **116**, 189 (2013).
22. А. Штирбет, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин и Говинджи, *Биохимия* **79** (4), 379 (2014).
23. *Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня*, под ред. С.И. Аллахвердиева, А. Б. Рубина и В.А. Шувалова (Ижевский ин-т компьютерных исследований, М. – Ижевск, 2013).
24. *Monte-Carlo method*, *Encyclopedia of Mathematics*, Ed. by M. Hazewinkel, (Springer, 2001), ISBN 978-1-55608-010-4.
25. R. Y. Rubinstein and D. P. Kroese, *Simulation and the Monte Carlo Method*, 2nd ed. (John Wiley & Sons, New York, 2007). ISBN 978-0-470-17793-8.
26. M. H. Kalos and P. A. Whitlock, *Monte Carlo Methods* (Wiley-VCH, 2008). ISBN 978-3-527-40760-6.
27. D. P. Kroese, T. Taimre, and Z. I. Botev, *Handbook of Monte Carlo Methods* (John Wiley & Sons, New York, 2011). ISBN 0-470-17793-4.
28. C. P. Xin, J. Yang, and X. G. Zhu, *Photosynth. Res.* 1–16 (2013). <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-013-9894-2>.
29. N. Metropolis and S. Ulam, *J. Amer. Stat. Association* **44** (247), 335 (1949). DOI:10.2307/2280232.
30. B.-H. Su, Y.-Sh. Tu, O. A. Lin, et al., *J. Chem. Inf. Model.* **55** (2), 434 (2015).
31. L. A. Chylek, L. A. Harris, C.-S. Tung, et al., *Rev. Syst. Biol. Med.* **6**, 13 (2014).
32. *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastocyanin Oxidoreductase*, Ed. by Th. J. Wydrzynski and K. Satoh, *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006), vol. 22.
33. Govindjee, J. F. Kern, J. Messinger, and J. Whitmarsh, In *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2010). DOI: 10.1002/9780470015902.a0000669.pub2.
34. B. Kok, B. Forbush, and M. McGloin, *Photochem. Photobiol.* **11**, 457 (1970).
35. T. K. Antal, A. Kolacheva, A. Maslakov, et al., *Photosynth. Res.* **114** (3), 143 (2013).
36. D. Baniulis, E. Yamashita, H. Zhang, et al., *Photochem. Photobiol.* **84** (6), 1349 (2008). doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00444.x.
37. P. Mitchell, *FEBS Lett.* **59**, 137 (1975).
38. J. Nield, O. Kruse, J. Ruprecht, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 27940 (2000).
39. J. P. Dekker and E. J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 12 (2005).
40. M. R. Razeghifard, C. Klughammer, and R. J. Pace, *Biochemistry* **36**, 86 (1997).
41. K. Brettel, E. Schlodder, and H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 403 (1984).
42. D. Lazár, *J. Theor. Biol.* **220**, 469 (2003).
43. H. Dau, *Photochem. Photobiol.* **60**, 1 (1994).
44. D. Lazár, *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 1 (1999).
45. D. Lazár and J. Jablonský, *J. Theor. Biol.* **257**, 260 (2009).
46. A. R. Crofts, I. Baroli, D. Kramer, and S. Taoka, *Z. Naturforsch.* **C48**, 259 (1993).
47. J. Haveman and P. Mathis, *Biochim. Biophys. Acta* **440**, 346 (1976).
48. G. Renger and C. Wolf, *Biochim. Biophys. Acta* **423**, 610 (1976).
49. E. Rabinovich and Govindjee, *Photosynthesis* (Interscience Publishers Inc., Wiley, New York, 1969).
50. D. Lazár and P. Pospril, *Eur. Biophys. J.* **28**, 468 (1999).
51. D. Lazár, *J. Theor. Biol.* **220**, 469 (2003).
52. M. Y. Gorbunov, F. I. Kuzminov, V. V. Fadeev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1591 (2011).
53. A. R. Holzwarth, M. G. Müller, M. Reus, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6895 (2006).

54. J. Messinger and G. Renger, *Biochemistry* **32**, 9379 (1993).
55. M. Haumann and W. Junge, *Biochemistry* **33**, 864 (1994).
56. J. Lavergne and J. M. Briantais, in: *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Ed. by D. R. Ort and C. F. Yocum (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 1996), pp. 265–287.
57. P. Tomek, P. Ilík, D. Lazár, et al., *Plant Sci.* **164**, 665 (2003).
58. T. E. Krendeleva, G. P. Kukarskikh, N. V. Nizovskaya, and A. B. Rubin, *Physiologia Plantarum* **96**, 439 (1996).
59. J. Metz, H. Pakrasi, M. Seibert, and C. Arntzer, *FEBS Lett.* **205** (2), 269 (1986). doi:10.1016/0014-5793(86)80911-5.
60. J. F. Allen, *Plant Sci. Lett.* **12**, 161 (1978).
61. G. Schansker, S. Z. Toth, and R. J. Strasser, *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 250 (2005).
62. N. Bukhov, E. Egorova, T. Krendeleva, et al., *Photosynth. Res.* **70**, 155 (2001).
63. Sz. Z. Tyth, G. Schansker, G. Garab, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics*, doi:10.1016/j.bba-bio.2007.02.019.
64. T. Matsuoka, Sh. Tanaka, and K. Ebina, *J. Theor. Biol.* **380**, 220 (2015).
65. T. Antal and A. Rubin, *Photosynth. Res.* **96**, 217 (2008).
66. Г. Ю. Ризниченко, Н. Е. Беляева, И. Б. Коваленко и др., в кн. *Современные проблемы фотосинтеза*, под ред. С. И. Алахвердова, А. Б. Рубина и В. А. Шувалова (Изд-во ИКИ, М. – Ижевск, 2014), т. 2, сс. 41–100.

Modeling of Primary Photosynthetic Processes Using a Kinetic Monte Carlo Method

A.S. Maslakov, T.K. Antal, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin

Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

Processes occurring in an ensemble of photosynthetic electron transport systems are modeled using a kinetic Monte Carlo method. The size of a simulated ensemble (3–5 millions of elementary photosynthetic chains) corresponds to the number of photosynthetic reaction centers in a plant cell. The method permits one to modify the model structure according to different photosynthetic membrane processes organization hypotheses. Chlorophyll fluorescence induction kinetics associated with Photosystem II and redox transformations of photoactive Photosystem I pigment obtained in experiment have been reproduced with this model. The model was verified by comparing calculated fluorescence induction curves and experimental curves obtained in the presence of different photosynthesis inhibitors and under temperature inactivation of Photosystem II donor side.

Key words: fluorescence induction, Monte Carlo method, mathematical modeling, photosynthetic reaction center