

УДК: 519.8

## Сопряжение различных методов компьютерного моделирования в комплексной модели фотосинтетической мембраны

Д. М. Устинин<sup>а</sup>, И. Б. Коваленко, Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет,  
Россия, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, МГУ

E-mail: <sup>а</sup> dmitry.ustinin@gmail.com

*Получено 18 декабря 2012 г.,  
после доработки 01 марта 2013 г.*

Необходимость корректного учета деталей пространственной и функциональной организации клеточных структур требует поиска новых подходов к моделированию субклеточных процессов, в том числе первичных процессов фотосинтеза в тилакоидной мембране. Эти подходы должны интегрировать физические и биологические представления о конкретных механизмах, которые объединяются в общую картину на уровне компьютерной модели. В работе предлагается новый подход к моделированию, в котором воспроизводится трехмерная пространственная структура фотосинтетической мембраны. Разные стадии переноса зарядов при фотосинтезе моделируются с использованием разного математического аппарата и объединяются в единую компьютерную модель. Разработанные алгоритмы реализованы в виде программного комплекса, использующего параллельные вычисления на высокопроизводительных кластерах и графических процессорах.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, броуновская динамика

### Combination of different simulation techniques in the complex model of photosynthetic membrane

D. M. Ustinin, I. B. Kovalenko, G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin

*Moscow State University, Faculty of Biology, MSU, GSP-1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia*

**Abstract.** — Complex geometric organization of subcellular structures such as photosynthetic or mitochondrial membranes determines mechanism of electron and proton transfer processes. We propose new approach in modeling processes, where geometric shape of membranes is accurately taken into account. Different stages of charge transfer process are simulated using different approaches, which are integrated into a combined model. We implemented this model as software which utilizes parallel computations on high-performance clusters and GPUs for better performance.

Keywords: computer modeling, Brownian dynamics

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. 65–81 (Russian).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты № 11-04-01019, № 11-04-01268, №12-07-00783, №12-07-33036

## Введение

Моделирование фотосинтетической системы клетки важно для понимания механизмов ее работы. К настоящему времени накоплен огромный массив информации о строении фотосинтетической системы. Известны структуры практически всех белков, участвующих в работе фотосинтетической цепи, пространственная организация фотосинтетической мембраны, доступны многочисленные экспериментальные методы изучения состояния системы (исследование флуоресценции, метод электронного парамагнитного резонанса и т. д.). Кроме того, возросшие мощности вычислительной техники позволяют строить подробные компьютерные модели, имитирующие процесс фотосинтеза и подробно учитывающие пространственную организацию системы.

Моделируя процессы фотосинтеза, необходимо учитывать два фактора. Во-первых, фотосинтетическая мембрана имеет сложную пространственную организацию (см. рис. 1). Во-вторых, характерные времена протекания отдельных стадий этих процессов значительно отличаются. Сначала рассмотрим более подробно структуру фотосинтетической мембраны.

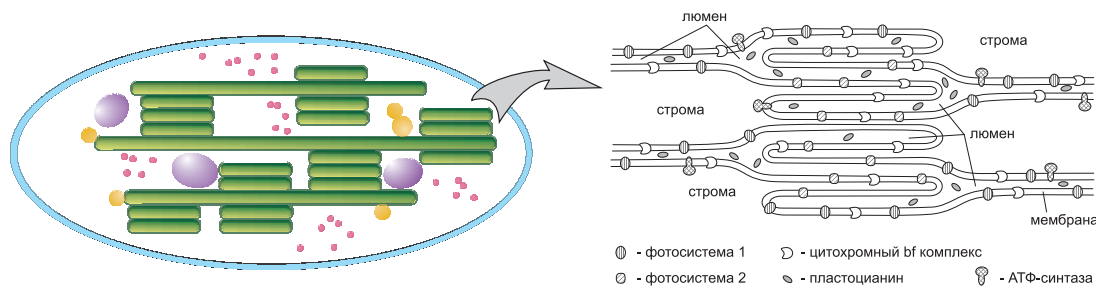


Рис. 1. Пространственная организация фотосинтетической мембраны хлоропласта

Она организована в виде большого количества стопок плоских дисков, называемых гранами (рис. 1). Каждая грана состоит из двойной липидной мембраны, в которую встроены белковые комплексы различной природы (фотосинтетические реакционные центры фотосистем 1 и 2, цитохромный  $b_6f$  комплекс, АТФ-синтазный комплекс). Внутреннее пространство гран между липидными мембранами называется люменом, внешнее пространство — стромой. Характерные размеры грани — диаметр около 500 нм, толщина мембран — 5 нм, толщина межмембранного пространства (люмена) — 5–10 нм.

Схема процессов, связанных с линейным транспортом электронов в фотосинтетической мембране, обеспечивающим синтез углеводов, может быть описана следующим образом. Комплекс фотосистемы II ( $PSII$ ) под действием света расщепляет молекулы воды, при этом освобожденные протоны выделяются в люмен, а два электрона по цепочке внутренних переносчиков в фотосистеме II передаются на пристыкованный к ней пластохинон ( $PQ$ ). После этого пластохинон в форме  $PQH_2$  отстыковывается и диффундирует к цитохромному  $b_6f$  комплексу. Последующее окисление  $PQ$  приводит к восстановлению пластоцианина ( $Pc$ ) — подвижного белкового переносчика, способного перемещаться в люмене, процесс происходит с участием цитохромного  $b_6f$  комплекса в соответствии со схемой Q-цикла Митчелла (рис. 2).

Комплекс фотосистемы I ( $PSI$ ) под действием света катализирует окисление пластоцианина ( $Pc$ ) на люминальной поверхности мембраны тилакоида и восстановление ферредоксина ( $Fd$ ) на стромальной стороне мембраны. После этого происходит диффузия восстановленного ферредоксина в строму, заканчивающаяся передачей электрона на  $NADP^+$  через экспонированный в строму комплекс ферредоксин-NADPH-редуктазы ( $FNR$ ).

Восстановленный  $NADPH$  далее используется как источник электронов в цепи синтеза органических соединений (цикл Кальвина). Транспорт электрона также сопряжен с протонным

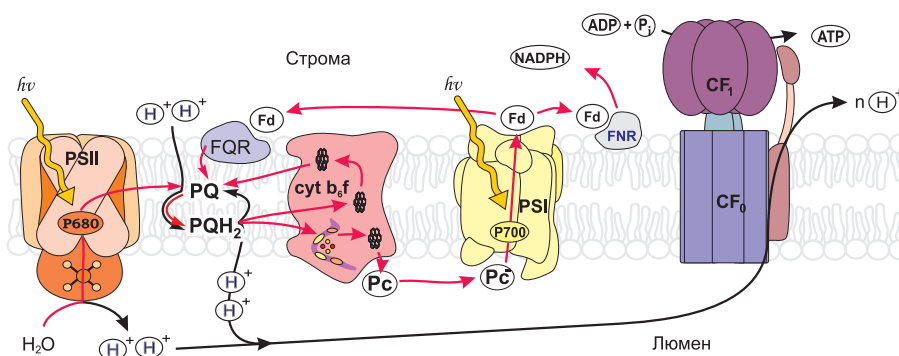


Рис. 2. Схема фотосинтеза. Пути переноса электронов (от  $H_2O$  до  $NADP^+$ , красные линии) и протонов (черные линии) при циклическом и нециклическом электронном транспорте

транспортом. Протоны выделяются в люмен при расщеплении воды фотосистемой II, а также при работе Q-цикла Митчелла в цитохромном  $b_6f$  комплексе. В результате создается разность  $pH$  между люменом и стромой, за счет которой встроенные в мембрану комплексы АТФ-синтазы производят АТФ. Эти комплексы в хлоропласте расположены в основном на внешнем краю гранальных дисков, а также на ламеллах, выступающих в строму и соединяющих стопки гран друг с другом. Фотосистемы II сосредоточены в основном внутри гранальных дисков, цитохромные комплексы распределены равномерно по всей тилакоидной мембране. Таким образом, протоны закачиваются в люмен во внутренних областях граны, а выводятся в строму — на периферии. Следовательно, можно ожидать возникновения неоднородного распределения протонов в плоскости мембраны. Кроме того, после начала работы фотосинтетической цепи (например при включении освещения) синтез АТФ начинается не сразу, должно пройти некоторое время, пока в периферийных областях граны (где расположены АТФ-синтазы) накопится некоторое количество протонов, необходимое для синтеза АТФ.

Молекулы пластоцианина окисляют цитохром  $f$  и восстанавливают реакционный центр  $PSI$ , диффундируя в люминальном пространстве на довольно большие расстояния (сотни нм) и перенося электроны между гранальными и стромальными областями в тилакоидах [Мокронос, Гавриленко, 1992; Норе, 1993; Gross, 1996]. В нативном хлоропласте толщина люмена (4–10 нм [Mehta et al., 1999]) сравнима с размерами пластоцианина, а люмен заполнен выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов [Норе, 2000], концентрация которых в тилакоидной мембране очень высока [Albertsson, 2001]. Как следствие, в люмене не обеспечиваются возможности свободной диффузии пластоцианина. В этом случае описание переноса электрона с помощью уравнений химической кинетики является весьма приближенным и не соответствует современным представлениям о гетерогенном характере мембраны. Необходимо поэтому рассматривать движение пластоцианина и других мобильных переносчиков в неоднородной среде, где диффузия затруднена и возможны столкновения с другими крупными молекулами. Рассмотрим основные методы моделирования фотосинтетических процессов.

## Методы моделирования процессов в фотосинтетической мембране

Можно выделить несколько стадий транспорта электронов в фотосинтетической мембране, отличающихся своими механизмами, характерными временами и пространственными масштабами.

1. Разделение зарядов и перенос внутри белковых комплексов. Характерные времена лежат в диапазоне от  $10^{-12}$  до  $10^{-4}$  сек. Для моделирования используются кинетические модели, базирующиеся на аппарате обыкновенных дифференциальных уравнений. Переменными являются вероятности состояния комплекса [Stirbet et al., 1998; Ризниченко и др., 2009; Лебедева и др., 2000]. При этом взаимодействие с подвижными переносчиками описывается законом действующих масс.
2. Диффузия подвижных переносчиков электрона в люмене и строме. Характерное время процесса определяется коэффициентом диффузии мобильных переносчиков. Например, для пластоцианина в люмене коэффициент диффузии равен  $10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с. Средний квадрат перемещения броуновской частицы связан со временем по формуле

$$\langle r^2 \rangle = Dt, \quad (1)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии.

Характерное расстояние между белковыми комплексами на мембране — порядка 15 нм. По формуле (1) получаем, что среднее расстояние между комплексами переносчик будет преодолевать за время порядка  $2.5 \cdot 10^{-7}$  с. Метод броуновской динамики позволяет моделировать электростатическое взаимодействие между белками и связывание одного подвижного переносчика с мультиферментным комплексом [Ullmann et al., 1997; Pearson, Gross, 1998; Ubbink et al., 1998; De Rienzo et al., 2001; Gross, Pearson, 2003]. В последние годы мы развиваем метод многочастичного прямого моделирования на основе броуновской динамики, позволяющий моделировать диффузию мобильных переносчиков в люмене и взаимодействие с пигмент-белковыми комплексами с учетом реалистичной геометрии белков и электростатических взаимодействий между ними [Riznichenko et al., 2010; Коваленко и др., 2009; Абатурова и др., 2009].

3. Диффузия протонов в люмене и их взаимодействие с буферными группами. Коэффициент диффузии протонов в воде равен  $10^{-4}$  см<sup>2</sup>/с. Оценивая по формуле (1), получаем характерное время переноса протона от комплекса к комплексу, равное  $2.5 \cdot 10^{-9}$  с. Таким образом, движение протонов на два порядка быстрее, чем движение мобильных переносчиков электрона. Следовательно, непосредственное включение протонов в многочастичную модель при сохранении той же точности потребует уменьшения временного шага вычислений на два порядка, что неэффективно с вычислительной точки зрения. Более перспективно моделировать перенос протонов с помощью дифференциальных уравнений в частных производных [Вершубский и др., 2007].

В системах, где существует несколько процессов, протекающих с сильно отличающимися скоростями, можно использовать принцип узкого места и применить теорему Тихонова для уменьшения размерности задачи. Однако, для этого требуется наличие четкой иерархии времен. При моделировании фотосинтетической системы как целого, с учетом пространственной организации, это сделать сложно, поскольку времена различных стадий электронного транспорта сравнимы между собой. Вместе с тем, сложно смоделировать всю систему в целом в рамках одного подхода — описание с помощью кинетических уравнений не учитывает пространственной организации системы, многочастичные модели не рассматривают процессы внутри комплексов, системы уравнений в частных производных не учитывают дискретный характер системы. Для того чтобы решить эти проблемы, в настоящей работе мы предлагаем подход, при котором разные стадии в рамках единой модели рассчитываются разными методами. Перенос электрона внутри комплекса описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений, где переменными являются вероятности состояний комплекса. Перенос электрона мобильными переносчиками моделируется методом многочастичной броуновской динамики, где каждая молекула

переносчика и каждый белковый комплекс моделируется как объект в трехмерном пространстве. Диффузия протонов описывается системой дифференциальных уравнений в частных производных относительно концентраций протонов в люмене и строме. Решение уравнений диффузии протонов осуществляется сеточными методами или методом частиц. Комплексы АТФ-синтазы также моделируются как отдельные объекты со своими внутренними состояниями. Целью является построение модели, сочетающей детальный учет пространственной организации мембраны, степень детализации при рассмотрении отдельных стадий и скорость вычислений, достаточную для моделирования процессов на одной или нескольких гранах хлоропласта (порядка 10 000 белковых комплексов и переносчиков электрона) с общей длительностью порядка секунд. Современные средства параллельных вычислений — высокопроизводительные кластеры с обычными и графическими процессорами — позволяют обеспечить достаточное быстродействие, при условии наличия эффективных параллельных алгоритмов. Основная сложность — обеспечить сопряжение разных методов моделирования отдельных стадий: переноса внутри комплексов, движения мобильных переносчиков, транспорта протонов. Трудность состоит в том, что для описания каждой из этих стадий используется своя степень детализации и свой математический аппарат. Так, например, каждый белковый комплекс рассматривается как твердое тело с некоторым распределением электрического заряда при моделировании движения мобильных переносчиков, а при моделировании переноса в комплексе тот же белок рассматривается как вектор состояний внутренних переносчиков электрона. При построении единой модели нужно согласовать между собой эти подходы. Для этого предлагается следующая схема функционирования модели.

Пусть в некоторый момент времени нам известно состояние всех моделируемых объектов. Выполняются следующие операции:

1. Моделирование перемещения переносчиков путем решения уравнение Ланжевена. Рассчитываются новые координаты переносчиков на следующем шаге броуновской модели. Размеры объектов, рассматриваемых в модели, лежат в интервале от 1 до 1 000 нм, т. е. в пределах от размера одного белка-переносчика до размера грани хлоропласта. Для того чтобы аккуратно учесть столкновения с другими объектами, среднее перемещение белка-переносчика за один шаг модели должно быть примерно на порядок меньше его линейных размеров (2 нм). Используя формулу (1), получаем, что временной шаг, обеспечивающий достаточную точность моделирования перемещения мобильных переносчиков, определяется их коэффициентом диффузии (порядка  $10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с), и составляет  $10^{-8}$  с. Дальнейшее уменьшение шага не имеет смысла, т. к. не приводит к заметному увеличению точности моделирования, хотя время расчета при этом сильно увеличится.
2. Расчет переходов между внутренними состояниями для каждого из белковых комплексов согласно матрице вероятностей перехода, рассчитываемой через решение системы дифференциальных уравнений. Определяется, как изменятся внутренние состояния всех комплексов на следующем шаге модели броуновского движения.
3. Если изменение состояния некоторых комплексов связано с выделением протонов в люмен или их утечкой, пересчитываются соответствующие плотности вероятности для протонов. Решая уравнение движения для протонов, рассчитываем изменение концентрации за время, равное одному шагу многочастичной модели.

## Методы и алгоритмы

Движение мобильных переносчиков моделируется на трехмерной сцене (рис. 3), в которую включены строма (внутреннее пространство хлоропласта вне фотосинтетической мембраны), двойная мембрана тилакоида и межмембранное пространство — люмен. Встроенные в мембрану мультиферментные белковые комплексы и мобильные переносчики электрона описываются



как твердые тела с определенной геометрической формой (определяемой по структуре из Protein Data Bank), расположенные в трехмерном пространстве. Каждый объект в модели обладает набором свойств, таких как координаты, геометрическая форма и размеры, наличие или отсутствие переносимых электронов, параметры взаимодействия с другими объектами.

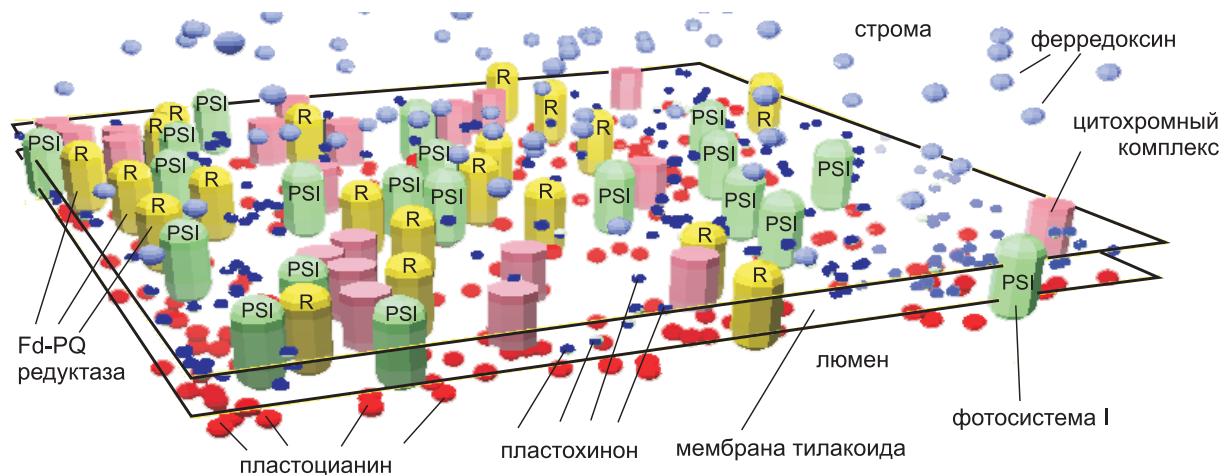


Рис. 3. Модельная сцена, представляющая участок фотосинтетической мембраны

Алгоритм формирования сцены и генерации псевдослучайного расположения комплексов на мембране подробно описан в нашей предыдущей работе [Устинин и др., 2010].

### Моделирование движения мобильных переносчиков

Для моделирования движения  $Pc$ ,  $Fd$ ,  $PQ$  в пространствах соответствующих компартментов использовали математический аппарат описания броуновского движения с учетом геометрических ограничений, налагаемых сформированной модельной сценой. Правомерность рассмотрения движения белковых переносчиков как броуновских частиц обусловлена их глобулярностью. Предполагается, что движение частицы происходит в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды. Для описания такого процесса можно использовать уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной силы

$$\xi \frac{dx}{dt} = f(t). \quad (2)$$

Здесь  $f(t)$  — случайная сила,  $\xi$  — коэффициент трения в среде, вычисляемый (в предположении о сферичности частицы) по формуле  $\xi = 6\pi\eta a$ , где  $\eta$  — вязкость среды,  $a$  — радиус частицы. Уравнение решается численно для каждой из частиц. Если выбрать шаг по времени, равный  $\Delta t$ , в разностном виде это уравнение будет записано как

$$\Delta x = \frac{f(t)\Delta t}{\xi}. \quad (3)$$

Случайная сила  $f(t)$  распределена по Гауссу с нулевым средним и дисперсией, равной  $\frac{2kT\xi}{\Delta t}$ , где  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура. Таким образом, перемещение частицы за один шаг на расстояние  $\Delta x$  является случайной величиной, распределенной по Гауссу с нулевым средним

и дисперсией, равной

$$\langle \Delta x^2 \rangle = \frac{2kT\Delta t}{\xi}. \quad (4)$$

Итак,  $\Delta x$  можно представить как

$$\Delta x = \sqrt{\frac{2kT\Delta t}{\xi}} N(0, 1). \quad (5)$$

Здесь  $N(0, 1)$  — случайная величина, имеющая стандартное нормальное распределение. Если теперь вычислить средний квадрат перемещения в трехмерном пространстве за время  $\Delta t$ , получим

$$\langle r^2 \rangle = \langle x^2 + y^2 + z^2 \rangle = 3 \cdot \frac{2kT}{\xi} \cdot \Delta t = D\Delta t. \quad (6)$$

Здесь  $D = \frac{6kT}{\xi}$  — коэффициент диффузии. Итак, перемещение за один шаг и коэффициент диффузии связаны следующим соотношением, которое и используется в программе для расчета:

$$\Delta x = \sqrt{\frac{D\Delta t}{3}} N(0, 1). \quad (7)$$

Шаг по времени подбирается таким образом, чтобы корень из дисперсии перемещения частицы на каждом шаге (среднее перемещение частицы на каждом шаге) был порядка одной десятой диаметра мобильного переносчика. Такой выбор шага обеспечивает приемлемые точность вычислений и время расчета. На боковых границах области моделирования использованы тороидальные (периодические) граничные условия, также учитывалось отражение частиц от физических поверхностей, включая мембрану и белковые комплексы. Каждый из участников движения может переносить или не переносить электрон, что при визуализации динамики системы изображается условным изменением цвета частицы.

Для генерации случайных чисел использовался генератор L'Esuyer с периодом  $2^{191}$ . В версии алгоритма для графических процессоров использовался параллельный генератор Mercenne-Twister.

### ***Учет столкновений и взаимодействие с белковыми комплексами***

Моделирование столкновений и взаимодействия с другими частицами подробно описано в работе [Устинин и др., 2010]. Стыковка мобильных переносчиков с белковыми комплексами описывается через эффективный радиус взаимодействия  $r$  и вероятность посадки  $p$ . У каждого комплекса есть один или несколько сайтов посадки, к которым могут пристыковаться определенные типы переносчиков.

Если на данном шаге переносчик подошел к соответствующему сайту посадки на комплексе ближе чем на расстояние  $r$ , то разыгрывается случайное число, равномерно распределенное на  $[0; 1]$ , и если оно меньше, чем величина вероятности стыковки  $p$ , считается, что переносчик состыковался с комплексом. Если стыковка не произошла, переносчик продолжает движение. После стыковки переносчик остается неподвижным на сайте посадки до тех пор, пока не произойдет передача электрона или случайная отстыковка. Радиус взаимодействия  $r$  и вероятность стыковки  $p$  являются параметрами модели. Радиус взаимодействия выбирается по данным о дальности действия электростатических сил между комплексами и переносчиками. Этот радиус составляет примерно 8 нм. Для определения параметров модели были использованы результаты более подробного моделирования с явным учетом электростатических взаимодействий [Коваленко и др., 2009]. Вероятность стыковки прямому определению не поддается и оценивается по

экспериментальным данным. Для того чтобы оценить вероятность стыковки, используются данные о скоростях реакций отдельных переносчиков и комплексов в растворе. Например, отдельно рассматривается реакция пластоцианина с цитохромом  $f$ . По измеренной экспериментальной кривой оценивается константа реакции, затем параметр  $p$  — вероятность стыковки пластоцианина с цитохромом — подбирается так, чтобы константа реакции, вычисленная по результатам моделирования, совпадала с экспериментальной. Аналогично, по данным экспериментов в растворе определяются параметры стыковки для пар ферредоксин — фотосистема  $I$ , пластоцианин — фотосистема  $I$ .

### Моделирование переноса электрона внутри белковых комплексов

Представление белковых комплексов как элементарных объектов многочастичной модели не позволяет подробно учитывать процессы переноса заряда внутри комплексов фотосистем и цитохрома. Однако эти процессы необходимо учитывать, чтобы корректно смоделировать сигналы, получаемые в экспериментах по изучению флуоресценции, данные электронного парамагнитного резонанса и спектральных измерений. Эти сигналы зависят от состояния промежуточных переносчиков электрона в фотосистемах и цитохромном комплексе. Следовательно, требуется более подробное рассмотрение комплексов и их состояний. Для моделирования процессов внутри комплексов разработан удобный аппарат описания системами обыкновенных дифференциальных уравнений, где переменными выступают вероятности состояний комплекса [Rubin, Riznichenko, 2009]. Проблема заключается в том, чтобы состыковать многочастичную модель движения мобильных переносчиков с моделью переноса внутри комплексов. Количество комплексов в многочастичной модели велико, поэтому решать для каждого из них систему уравнений для перехода между внутренними состояниями на каждом шаге многочастичной модели невозможно, да и не имеет смысла. На самом деле, интересно только, в каком состоянии окажется каждый комплекс в конце очередного шага многочастичной модели, на каком переносчике находится заряд, произошел ли перенос заряда от мобильного переносчика или на него, произошел ли акт флуоресценции и т. п. Число промежуточных переносчиков электрона, моделируемых для каждого комплекса, конечно, и каждый переносчик может находиться в ограниченном числе состояний (обычно в двух — с электроном либо без электрона).

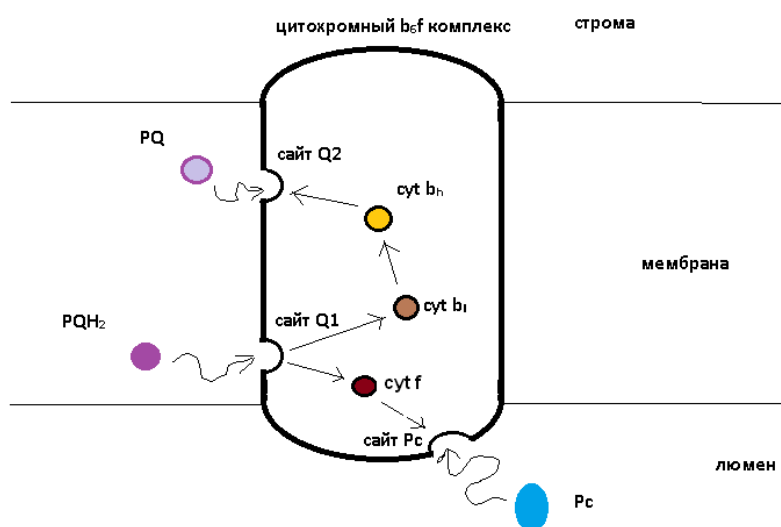


Рис. 4. Перенос электрона в цитохромном  $b_6f$  комплексе



В качестве примера рассмотрим модель цитохромного  $b_6f$  комплекса (рис. 4). Мы выделяем следующие промежуточные переносчики электрона: цитохром  $f$ , низкопотенциальный гем цитохрома  $b - b_h$ , высокопотенциальный гем цитохрома  $b - b_l$ . Каждый из этих переносчиков может находиться в одном из двух состояний — окисленном (без электрона, 0) или восстановленном (с электроном, 1). Сайты посадки пластохинона могут находиться в следующих состояниях:

1. переносчик не пристыкован;
2. пристыкован окисленный пластохинон;
3. пристыкован семихинон с одним электроном;
4. пристыкован восстановленный пластохинол  $PQH_2$  с двумя электронами.

Итого по четыре возможных состояния на каждый из двух сайтов посадки пластохинона. Аналогично, сайт посадки пластоцианина может находиться в одном из трех возможных состояний:

1. пластоцианин не пристыкован;
2. пристыкован окисленный пластоцианин;
3. пристыкован восстановленный пластоцианин.

Таким образом, состояние комплекса «пластоцианин–цитохром  $b_6f$ –пластохинон» описывается вектором из 6 состояний каждого промежуточного переносчика электрона и сайтов посадки  $Pc$  и  $PQ$ . Общее количество возможных состояний комплекса можно вычислить, перемножив количество возможных состояний каждого элемента: 4 (люминальный сайт посадки  $PQ$ )  $\times$  4 (стромальный сайт посадки  $PQ$ )  $\times$  3 (сайт посадки  $Pc$ )  $\times$  2 ( $Cyt f$ )  $\times$  2 (гем  $b_h$ )  $\times$  2 (гем  $b_l$ ). Итого, получаем 384 различных возможных состояния комплекса. Перенос электрона с одного промежуточного переносчика на другой описывается сменой состояния комплекса. Например, на очередном шаге многочастичной модели движения переносчиков была зафиксирована стыковка восстановленного пластохинола  $PQH_2$  с люминальным сайтом посадки цитохромного комплекса. Вектор состояния комплекса будет выглядеть следующим образом: (люминальный сайт посадки  $PQ$  — в состоянии 4 (пристыкован  $PQH_2$ ), все остальные промежуточные переносчики — в состоянии 0). Если за следующий шаг модели броуновской динамики произошел перенос электрона с  $PQH_2$  на цитохром  $f$ , вектор состояния изменится следующим образом: (люминальный сайт посадки  $PQ$  — в состоянии 3,  $Cyt f$  — в состоянии 1, все остальные промежуточные переносчики останутся в состоянии 0). Для того, чтобы смоделировать такой переход, нужно предварительно рассчитать вероятность этого перехода за время, равное одному шагу модели броуновской динамики. Для этого нужно записать систему обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих реакции переноса электрона внутри комплекса. Константы соответствующих реакций можно найти в литературе по кинетическим моделям [Chow, Nore, 2004]. Для каждого из возможных начальных состояний системы задаются начальные условия для дифференциальных уравнений. Так, для цитохромного комплекса получается 384 варианта начальных условий. Решая систему уравнений, получаем для каждого из этих начальных условий распределение состояний системы в конце заданного отрезка времени (например, шага многочастичной модели). Получив такие распределения для всех начальных состояний, мы вычисляем матрицу переходов размерности  $384 \times 384$  элемента. На главной диагонали матрицы стоят вероятности остаться в текущем состоянии, выше главной диагонали — вероятности прямых реакций, ниже — обратных.

Имея такую матрицу, можно быстро моделировать результат переноса электрона внутри комплекса за один шаг броуновской динамики для каждого комплекса. Для расчета матрицы

перехода была разработана программа автоматической записи и решения системы дифференциальных уравнений по кинетической схеме переходов внутри комплекса. Для решения системы использовался метод Рунге–Кутты 4-го порядка. Решая систему уравнений с начальными условиями, в которых  $i$ -е состояние в начальный момент имеет вероятность 1, а остальные состояния — вероятность 0, получали вероятность состояния  $j$  через время, равное одному шагу многочастичной модели. Матрица перехода рассчитывается один раз для каждого типа комплексов перед началом вычислений по полной модели. В начале каждого шага многочастичной модели определяется, в каком состоянии находится каждый комплекс (с учетом пристыкованных переносчиков), разыгрывается случайное число от 0 до 1 и по соответствующей строке матрицы переходов определяется, в каком состоянии комплекс окажется в следующий момент. Если этот переход сопровождается флуоресценцией (при моделировании фотосистемы 2), имитируется испускание соответствующего кванта. Такой подход позволяет без существенной потери скорости вычислений детально учесть переходы внутри каждого комплекса и корректно смоделировать сигналы с внутренних акцепторов электрона, измеряемые в эксперименте. Таким образом, стыковка многочастичной модели движения переносчиков и кинетической модели переноса внутри комплексов осуществляется путем задания набора возможных состояний для каждого комплекса. Состояние комплекса определяется наличием пристыкованных мобильных переносчиков на сайтах посадки и наличием электронов на внутренних акцепторах. За один шаг многочастичной модели рассчитывается изменение состояния каждого комплекса, которое происходит двумя путями — через стыковку/расстыковку мобильного переносчика и через переходы между внутренними акцепторами, которые рассчитываются через матрицу перехода.

### **Вычислительный эксперимент**

В качестве примера было проведено моделирование экспериментальной ситуации, описанной в работе [Chow, Nore, 2004]. Исследовался перенос электрона от фотосистемы 2 к цитохромному комплексу и затем на фотосистему 1 через пластоцианин. В экспериментах листья огурцов сначала выдерживались в темноте, затем подвергались миллисекундной лазерной вспышке. После этого в течение пяти секунд измерялось восстановление акцептора  $P700$  в фотосистеме I, а также восстановленность гема  $b_h$  и цитохрома  $f$  в цитохромном комплексе (рис. 5 и 6). В численном эксперименте была сделана попытка воспроизвести эту экспериментальную ситуацию. Была сгенерирована модельная сцена, содержащая фотосистемы 2 в гранальной области, фотосистемы I в стромальной области и цитохромные комплексы, равномерно распределенные между обоими областями. Предполагалось, что сначала восстановленные переносчики электронов в системе отсутствуют, таким образом имитировалось длительное выдерживание системы в темноте. Далее моделировалась вспышка в 1 мс, затем свет выключался и рассчитывалось количество восстановленных  $cyt\ b$  и  $cyt\ f$  в системе. Результаты моделирования показаны на рисунках 5 и 6. Численный эксперимент показал хорошее совпадение с экспериментальными данными.

### **Моделирование протонного транспорта**

Рассматривая процесс протонного транспорта в фотосинтетической системе, мы учитываем процессы, приводящие к изменению активности во внутритилакоидном пространстве. К ним относится выделение протонов в люмен, латеральная диффузия и утечка протонов. Включать протоны как частицы в модель движения мобильных переносчиков нецелесообразно, т. к. существенно отличаются скорости перемещения (коэффициент диффузии протонов в воде порядка  $10^{-4}$  см<sup>2</sup>/с, на два порядка больше, чем коэффициент диффузии белков-переносчиков), и для моделирования каждого протона понадобится более мелкий шаг по времени. Поэтому, мы используем аппарат дифференциальных уравнений в частных производных, предложенный в работе [Вершубский и др., 2007]. При этом переменными в уравнениях являются концентрации

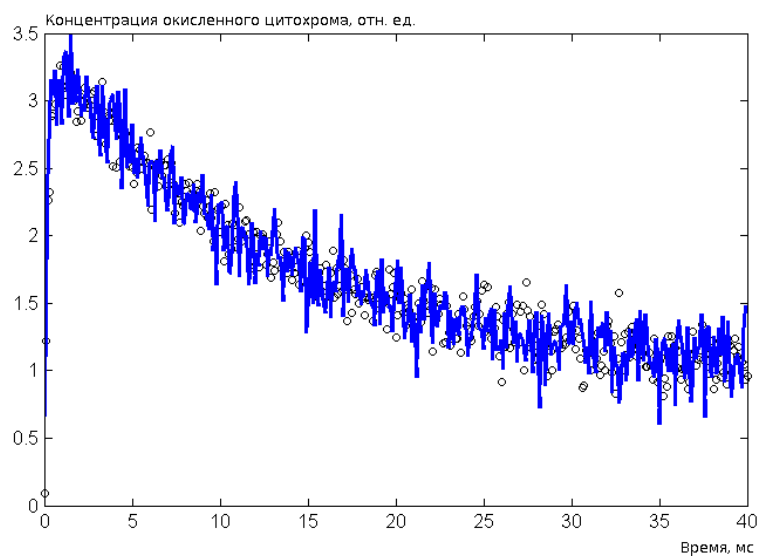


Рис. 5. Кривые окисления и последующего восстановления цитохрома  $f$  после вспышки. Черные точки — эксперимент [Chow, Nore, 2004]. Синяя сплошная линия — результаты моделирования

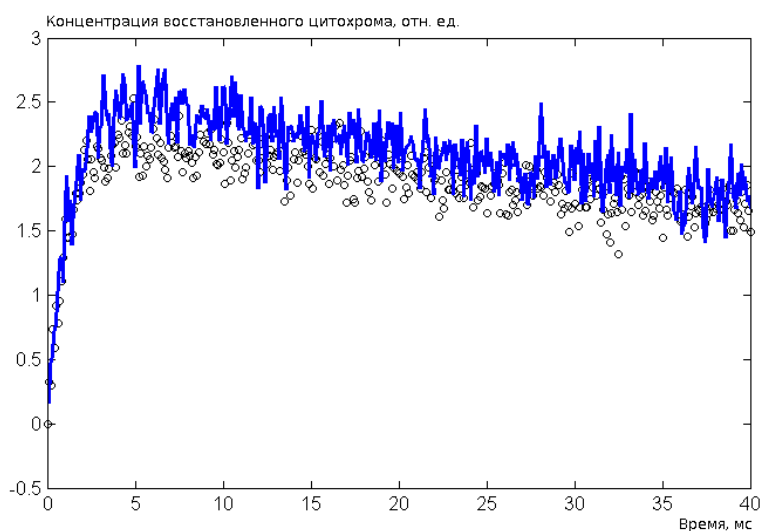


Рис. 6. Экспериментальная кривая восстановления и последующего окисления цитохрома  $b$ . Черные точки — эксперимент [Chow, Nore, 2004]. Синяя сплошная линия — результаты моделирования

протонов в люмене и строме, зависящие от координат и времени. Однако в живой биологической системе в реальных условиях общее количество протонов в одной грани тилакоида невелико и измеряется десятками, а иногда и единицами штук на грану. Поэтому возникает вопрос о правомерности использования самого понятия концентрации при столь малом количестве частиц. В настоящей работе мы используем интерпретацию, предложенную в работе [Тихонов, Блюменфельд, 1985], согласно которой речь идет не о концентрации, а о плотности вероятности распределения протонов: т. е., переменная в уравнении интерпретируется как плотность вероятности обнаружить протон в данной точке пространства.

Совмещение дискретной модели движения переносчиков с диффузионной моделью переноса протонов осуществляется следующим образом. Задается трехмерная сетка, покрывающая область модельной сцены, в которой нас интересует перенос протонов. Ширина ячеек сетки примерно соответствует диаметру белковых комплексов — порядка 10 нм. При этом в каждую ячейку попадает не более одного белкового комплекса — потенциального источника протонов. Для каждого протона в системе задается сеточная функция, определяющая вероятность обнаружить его в данной ячейке. В конце каждого шага многочастичной модели анализируются переходы между состояниями комплексов, произошедшие за этот шаг. Некоторые из этих переходов сопровождаются выделением протонов в люмен. В случае, если такой переход зафиксирован у некоторого комплекса, мы добавляем в систему новый протон. Функция распределения вероятности для него задается следующим образом: вероятность равна 1 в ячейке, соответствующей комплексу, через который произошло выделение протона, и нулю во всех остальных ячейках. Затем на каждом шаге многочастичной модели мы пересчитываем распределение вероятности всех протонов, решая для каждого из них конечно-разностную систему уравнений, описывающую диффузию и взаимодействие с буфером (10).

Стыковка многочастичной модели с конечно-разностной моделью диффузии протонов также необходима при моделировании утечки через АТФ-синтазу. Она выполняется следующим образом: для каждого комплекса АТФ-синтазы известны его координаты, и, следовательно, ячейка сетки, в которой он находится. Для каждого протона мы знаем вероятность обнаружить его в данной ячейке. В конце шага многочастичной модели для каждой АТФ-синтазы и для каждого протона разыгрывается случайное число, равномерно распределенное на отрезке  $[0; 1]$ . Если выпавшее число меньше, чем вероятность нахождения данного протона в ячейке вблизи АТФ-синтазы, моделируется утечка протона. Протон исключается из рассмотрения в люмене и добавляется для рассмотрения в строме, а для АТФ-синтазы симулируется поворот подвижной субъединицы  $\gamma$  на 120 градусов. Когда произойдет три таких поворота, будет синтезирована молекула АТФ.

### **Модель выделения протонов в люмен**

Плотность вероятности для каждого свободного протона в люмене определяется переменной  $H$ , заданной на прямоугольной сетке размерности  $N_X \times N_Y \times N_Z$ , причем размер ячейки выбирается порядка среднего диаметра белковых комплексов (10 нм). Поскольку толщина люмена тоже порядка 10 нм, при моделировании переноса протонов в люмене достаточно одной ячейки по оси  $z$  (перпендикулярной плоскости мембраны). Фактически диффузия протонов в люмене моделируется на двумерной сетке. Характерный диаметр грани — 500 нм, так что размерность сетки для одной грани составит  $50 \times 50 \times 1$  ячеек.

Выделение протонов происходит в результате индуцированного светом разложения воды в ФС2, а также за счет окисления пластохинола ( $QH_2$ ) цитохромным  $b_6f$  комплексом. В многочастичной модели эти события описываются через изменение состояний комплексов в конце каждого временного шага модели. Зная интенсивность света, можно рассчитать вероятность того, что какой-либо комплекс фотосистемы 2 поглотит квант света за время, равное длительности шага многочастичной модели. Рассчитать эту вероятность можно по формуле

$$p = \frac{I\sigma t}{h\nu}, \quad (8)$$

где  $I$  — интенсивность света (порядка 1000 Вт/м<sup>2</sup> в солнечный день),  $\sigma$  — эффективное сечение поглощения,  $t$  — длительность шага многочастичной модели,  $h$  — постоянная Планка,  $\nu$  — частота поглощаемого света.

При интенсивности света, соответствующей яркому солнечному дню, и длительности шага модели в 10 наносекунд, вероятность  $p$  — величина порядка 0.0001. В конце каждого шага многочастичной модели для каждого из комплексов фотосистемы 2 разыгрывается случайное число

из равномерного распределения на  $[0; 1]$ . Если оно оказалось меньше величины вероятности поглощения  $p$ , то считается, что данный комплекс фотосистемы 2 поглотил на данном шаге квант света. Так как мы знаем координаты комплекса, мы также знаем ячейку сетки для плотности вероятности протонов, в которую этот комплекс попадает.

Теперь добавляем в систему новый протон. Его функция плотности вероятности будет выглядеть следующим образом: в ячейке сетки, в которой находится выделившийся комплекс, плотность вероятности нахождения протона в данной ячейке равна:

$$\Delta H = \frac{1}{dV(1 + KB)}. \quad (9)$$

Здесь  $dV$  — объем ячейки,  $K$  — константа равновесия для реакции связывания протонов с буферными группами,  $B$  — концентрация буферных групп.

Во всех остальных ячейках вероятность обнаружить данный протон равна нулю (т. к. он только что был выделен и еще не успел никуда продиффундировать).

В этой формуле учтено взаимодействие ионов водорода с буферными группами, фиксированными на внутренней и внешней поверхностях тилакоидной мембраны. Физически буферные группы представляют собой выступающие в люмен заряженные аминокислотные остатки в белковых цепях многочисленных комплексов, встроенных в мембрану. Протоны могут временно связываться с этими остатками, что существенно замедляет их диффузию в люмене и примерно в 1000 раз уменьшает концентрацию свободных протонов в водной фазе люмена. В связи с этим, необходимо учитывать наличие буферных групп при моделировании диффузии протонов.

### **Модель латеральной диффузии протонов**

Моделируется диффузия в люмене (межмембранном пространстве). Геометрически рассматриваемая область представляет собой прямоугольный параллелепипед, где верхняя и нижняя его стороны отображают плоскости фотосинтетической мембраны, через которую происходит утечка протонов.

В рассматриваемой нами системе ионы водорода могут диффундировать в водной фазе внутритилакоидного объема. Значение рН в строме ( $pH_s$ ) в данной версии модели принимается постоянным.

Для моделирования процесса латерального переноса протонов во внутритилакоидном пространстве используется система дифференциальных уравнений, учитывающая связывание с буферными группами:

$$\frac{\partial H}{\partial t} = D_H \nabla^2 H - k_1 H(B_0 - c) + k_2 c + J, \quad (10)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = k_1 H(B_0 - c) - k_2 c, \quad (11)$$

где  $H(r, t)$  — плотность вероятности нахождения протона в данной точке люмена;  $c(r, t)$  — плотность распределения комплексов «протон–буферная группа»;  $B_0$  — максимальная концентрация буферных групп (в данной версии модели предполагается не зависящей от координат и времени);  $k_1, k_2$  — константы связывания и распада;  $D_H$  — коэффициент диффузии свободных протонов в воде;  $J$  — сумма притока от фотосистем 2 и цитохромных  $b_6f$  комплексов и оттока через АТФ-синтазу.

Граничные условия задаются как непроницаемые стенки на верхней и нижней плоскостях люмена и периодические — на боковых границах. Численное решение поставленной задачи выполнялось методом конечных разностей.



### ***Моделирование утечки протонов через АТФ-синтазу и синтез АТФ***

Каждый комплекс АТФ-синтазы моделируется как отдельный объект в трехмерном пространстве, расположенный на мембране тилакоида. На каждом шаге многочастичной модели мы имеем дело с вероятностью обнаружить какой-либо протон в ячейке, соседней с выбранной АТФ-синтазой. Если на данном шаге выпадает случайное число, меньшее этой вероятности, мы полагаем, что протон в данной ячейке присутствует, и с некоторой вероятностью  $p_f$  (которая является параметром модели) может произойти утечка протона через данную АТФ-синтазу. При этом имитируется поворот подвижной субъединицы  $\gamma$  («ротора») на 120 градусов внутри неподвижной субъединицы  $\alpha$  («статора»). Когда через АТФ-синтазу проходят три протона, происходит синтез одной молекулы АТФ. На данном этапе мы не учитывали, сколько в системе АДФ и свободного фосфата, предполагая, что синтез АТФ лимитируется наличием протонного градиента.

### ***Программная реализация***

В качестве платформы для программной реализации были выбраны C++, как удобный объектно-ориентированный язык программирования. Для реализации параллельных вычислений использовались среда MPI для вычислений на кластерах, и среда программирования CUDA C для вычислений на графических процессорах. Основные вычислительные блоки, которые подвергались распараллеливанию — генерация случайных чисел, моделирование броуновского движения частиц, решение уравнения диффузии для протонов методом частиц.

### ***Вычислительный эксперимент. Моделирование синтеза АТФ***

Исследование переноса протонов в плоскости мембраны при фотосинтезе производилось в следующем вычислительном эксперименте. В гранальной области мембраны (справа-снизу на рисунке 7а) располагались фотосистемы 2 (зеленые точки на рисунке), в стромальной области (слева-сверху) — АТФ-синтазы и фотосистемы 1. Цитохромные комплексы (красные точки) располагались равномерно по всей плоскости мембраны. Сначала система некоторое время выдерживалась в темноте, затем включалось освещение. При включении света фотосистемы 2 начинают поглощать кванты, происходит разложение воды и выделение протонов в люмен. Когда новый протон выделяется в люмен водоразлагающим комплексом фотосистемы 2 или цитохромным комплексом, его плотность вероятности представляет собой дельта-функцию, локализованную в пространстве вблизи комплекса, выделившего протон. На рисунке 7а это можно видеть как пики в правой части графика. Со временем протон начинает диффундировать в пространстве, график его плотность вероятности становится более пологим и напоминает колокол кривой распределения Гаусса. В гранальной части люмена количество протонов возрастает, они начинают диффундировать в стромальную часть. По мере накопления протонов создается градиент между стромальной и гранальной частями (рис. 7b). Когда вероятность обнаружить протоны в стромальной области становится заметной величиной, начинается синтез АТФ, связанный с утечкой протонов через АТФ. Зависимость количества синтезированной АТФ от времени показана на рисунке 8а. Сначала можно наблюдать лаг-период, когда вероятность обнаружить протон в стромальной области мала. Затем скорость синтеза возрастает, и кривая выхода АТФ становится линейной. На рисунке 8b показано суммарное количество протонов в люмене. Оно сначала нарастает, затем приток от фотосистем 2 и цитохромных комплексов сравнивается с утечкой через АТФ-синтазы, и распределение протонов в люмене стабилизируется.

Учет неоднородного распределения комплексов на мембране и моделирование диффузии переносчиков электрона и протонов позволяют смоделировать эффект возникновения задержки между включением освещения и началом синтеза АТФ. Задержка при этом обуславливается

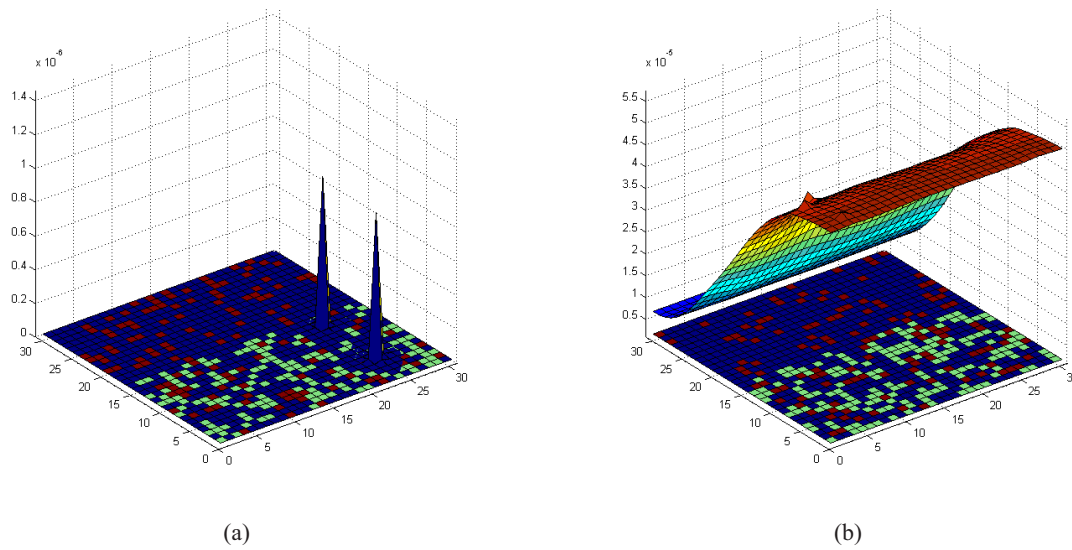


Рис. 7. Распределение плотности вероятности нахождения протонов в плоскости мембраны: *a* — в начале освещения; *b* — через 50 мс после начала освещения. Зеленые точки отмечают положение фотосистем 2 в плоскости мембраны, красные отмечают положение цитохромных комплексов. Пики соответствуют положению фотосистем или цитохромных комплексов, через которые произошло выделение протонов на текущем шаге модели. Через 50 мс после начала освещения сформировался градиент концентрации между гранальной областью (справа внизу), содержащей фотосистемы 2, и стромальной (слева сверху), не содержащей их

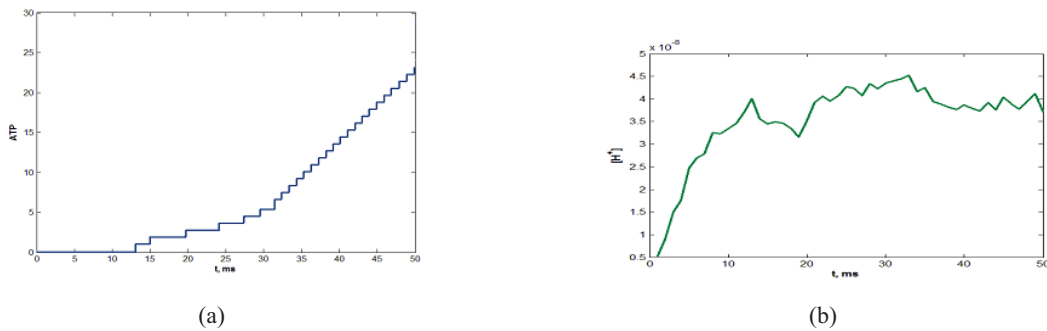


Рис. 8. *a* — с ростом рН в стромальной области АТФ-синтаза начинает производить АТФ. Сначала скорость синтеза лимитируется количеством доступных протонов, затем — временем поворота субъединиц. *b* — общее количество протонов в люмене сначала нарастает, а со временем выходит на постоянный уровень

несколькими факторами — конечной скоростью диффузии переносчиков электрона из гранальной части в стромальную, достаточно медленными характерными временами переноса электрона в цитохромном комплексе, сопряженного с протонным транспортом, а также конечной скоростью диффузии протонов в люмене. В результате накопление протонов в стромальной части, где находятся АТФ-синтазы, происходит с задержкой, что и приводит к задержке начала синтеза АТФ. Модель позволяет одновременно учитывать эти факторы в едином пространственно-временном масштабе.

## Выводы

Предложен новый метод моделирования, позволяющий адекватно учесть пространственную структуру биологических энергопреобразующих мембран. В многочастичном подходе к моделированию используется различный математический аппарат для моделирования разных процессов в мембране — броуновская динамика для движения мобильных переносчиков, уравнения химической кинетики — для реакций внутри белковых комплексов, уравнения в частных производных — для моделирования диффузии протонов. Объединение этих подходов в единую модель позволило найти компромисс между требованиями к аккуратности моделирования отдельных стадий, протекающих на разных пространственных и временных масштабах, и скорости расчетов, приемлемой для современной вычислительной техники. Программная реализация метода позволяет эффективно использовать возможности современных параллельных вычислений.

## Список литературы

- Абатурова А. М., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Исследование образования комплекса флаводоксина и фотосистемы 1 методами прямого многочастичного компьютерного моделирования // Компьютерные исследования и моделирование. — 2009. — Т. 1. — С. 85–91.
- Вершубский А. В., Приклонский В. И., Тихонов А. Н. Математическая модель электронного и протонного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа // Российский химический журнал. — 2007. — Т. LI.
- Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Новый метод компьютерного моделирования образования белок-белковых комплексов // Доклады Академии наук. — 2009. — Т. 427. — С. 696–698.
- Лебедева Г. В., Беляева Н. Е., Ризниченко Г. Ю. и др. Кинетическая модель фотосистемы II высших растений // Журнал физической химии. — 2000. — Т. 74. — С. 1874–1883.
- Мокронос А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. — Москва: Изд-во МГУ, 1992.
- Ризниченко Г. Ю., Беляева Н. Е., Коваленко И. Б., Рубин А. Б. Математическое и компьютерное моделирование первичных процессов фотосинтеза // Биофизика. — 2009. — Т. 54. — С. 16–33.
- Тихонов А. Н., Блюменфельд Л. А. Концентрация водородных ионов в субклеточных частицах: физический смысл и методы определения // Биофизика. — 1985. — Т. 30. — С. 527–537.
- Устинин Д. М., Коваленко И. Б., Грачев Е. А. и др. Метод прямого многочастичного компьютерного моделирования фотосинтетической электронно-транспортной цепи // Динамические модели процессов в клетках и субклеточных наноструктурах. — 2010. — С. 241–262.
- Albertsson P. A. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane // Trends in Plant Science. — 2001. — Vol. 6. — P. 349–354.
- Chow W., Hope A. B. Kinetics of reactions around the cytochrome bf complex studied in intact leaf disks // Photosynthetic Research. — 2004. — Vol. 81. — P. 153–163.
- De Rienzo F., Gabdoulline R. R., Menziani M. C. et al. Electrostatic analysis and Brownian dynamics simulation of the association of plastocyanin and cytochrome f // Biophysical Journal. — 2001. — Vol. 81. — P. 3090–3104.
- Gross E. L. Plastocyanin: structure, location, diffusion and electron transfer mechanisms. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants, edited by R. Jones. — Kluwer Academic Publishers, 1996. — P. 413–429.
- Gross E. L., Pearson Jr. D. C. Brownian Dynamics Simulations of the Interaction of Chlamydomonas Cytochrome f with Plastocyanin and Cytochrome c6 // Biophysical Journal. — 2003. — Vol. 85. — P. 2055–2068.

- Hope A. B.* The chloroplast cytochrome bf complex: a critical focus on function // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1993. — Vol. 1143. — P. 1–22.
- Hope A. B.* Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — Vol. 1456. — P. 5–26.
- Mehta M., Sarafis V., Critchley C.* Thylakoid membrane architecture // *Australian Journal of Plant Physiology.* — 1999. — Vol. 26. — P. 709–716.
- Pearson D. C., Gross E. L.* Brownian dynamics study of the interaction between plastocyanin and cytochrome f // *Biophysical Journal.* — 1998. — Vol. 75. — P. 2698–2711.
- Riznichenko G. Y., Kovalenko I. B., Abaturova A. M. et al.* New direct dynamic models of protein interactions coupled to photosynthetic electron transport reactions // *Biophysical Reviews.* — 2010. — Vol. 2. — P. 101–110.
- Rubin A. B., Riznichenko G. Y.* Models of primary processes in a photosynthetic membrane // *Advances in Photosynthesis and respiration.* — 2009. — Vol. 29. — P. 151–176.
- Stirbet A., Govindjee, Strasser B. J., Strasser R. J.* Chlorophylla Fluorescence Induction in Higher Plants: Modelling and Numerical Simulation // *Journal of Theoretical Biology.* — 1998. — Vol. 193. — P. 131–151.
- Ubbink M., Ejdeback M., Karlsson G. B., Bendall D. S.* The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics // *Structure.* — 1998. — Vol. 6. — P. 323–335.
- Ullmann G. M., Knapp E.-W., Kostic N. M.* Computational Simulation and Analysis of Dynamic Association between Plastocyanin and Cytochrome f. Consequences for the Electron-Transfer Reaction // *Journal of American Chemical Society.* — 1997. — Vol. 119. — P. 42–52.