

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ РАЗНОСТНОЙ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ МЕМБРАННОГО БЕЛКА БАКТЕРИОРОДОПСИНА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ МИКРОВОЛНАМИ 8–18 ГГц

© 2024 г. Е.Л. Терпугов*,*, О.В. Дегтярева*, Е.Е. Фесенко*

*Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: EL_Terpugov@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 04.09.2023 г.

Инфракрасная разностная спектроскопия с преобразованием Фурье была использована для изучения влияния миллиметрового электромагнитного излучения на структуру бактериородопсина в условиях освещения. Детальный анализ ИК-Фурье-спектров выявил выраженные структурные изменения в области амид I, амид II и перестройки сети водородных связей. Хорошо разрешенные пики амидных полос позволяют распознать два разных компонента (α -I и α -II) α -спиральной конформации опсина. Обнаруженные с помощью разностной ИК-Фурье-спектроскопии необратимые конформационные изменения бактериородопсина в пурпурных мембранах позволяют предположить, что микроволны индуцируют структурные перестройки белков, не связанные с температурой.

Ключевые слова: бактериородопсин, темновая/световая адаптация, оптическая спектроскопия, дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия, электромагнитные волны сверхвысокой частоты, биологический эффект.

DOI: 10.31857/S0006302924050048, EDN: MKPXPB

Бактериородопсин (БР) — мембранный белок, который был обнаружен в пурпурных мембранах бактерий *Halobacterium salinarum*, функционирует как активированная светом протонная помпа, эффективно переносящая протоны через мембрану и создающая электрохимический градиент протонов [1, 2]. БР имеет белковую часть в виде одной полипептидной цепи с 248 аминокислотными остатками и ретинальный хромофор, соединенный с белком через ϵ -аминогруппу Lys₂₁₆ через протонированное шиффово основание. Пространственная организация этого белка хорошо охарактеризована [3, 4]. Структура БР определена как преимущественно α -спиральная [5]. Трансмембранная часть БР сложена в семь антипараллельных регулярных α -спиралей, идущих от одного до другого края мембраны и образующих слегка наклоненный к ее плоскости пучок, а одинокая β -шпилька и все нерегулярные участки цепи, соединяющие спирали петли, выходят из пурпурных мембран. Вклад α -спиральных участков в

общей структуре составляет 52%, тогда как β -спиральная структура белка составляет 26%. В пурпурных мембранах БР сгруппирован по 3 молекулы, триады, которые имеют четкую гексагональную решетку. БР в мембране составляет по массе порядка 75%, а остальные 25% приходятся на липиды.

Биологическая функция БР основана на структурных изменениях белка, запускаемых поглощением света ретинальным хромофором [6, 7]. В темноте бактериородопсин содержит практически равновесную смесь продуктов БР₅₇₀ и БР₅₅₀ соответственно с *полностью-транс*- и *13-цис*-конфигурацией ретиналя, тогда как в светoadaptированном состоянии БР₅₇₀ содержит ретиналь исключительно с *полностью-транс*-геометрией. Относительно различий в конформации апобелка между двумя этими формами известно, что определенные изменения, вовлеченные во вторичную или третичную структуру апобелка, высоко локализованы в месте взаимодействия апобелка с ретиналем и искажение конформации

Сокращения: БР — бактериородопсин, ИК — инфракрасный, СВЧ — сверхвысококачественный.

в результате изомеризации не распространяется на весь апобелок.

Под действием света происходит изомеризация ретиналя, т.е. осуществляется переход из *13-цис*- в *полностью-транс*-состояние ретиналя, что инициирует цикл событий, которые приводят к переносу протона через плазматическую мембрану. Возникающий электрохимический градиент используется клеткой для синтеза АТФ, необходимого для поддержания жизнедеятельности галобактерий в условиях пониженного содержания кислорода. Фотохимия БР интенсивно изучалась в последние годы различными методами [8, 9]. Недавно было показано, что бактериородопсин обладает большой активностью не только в оптическом, но и в микроволновом диапазоне от 3 до 40 ГГц. В водной среде оба состояния БР (свето- и темноадаптированное) имеют максимум поглощения на частоте возле 8 и 25 ГГц [10]. Адсорбционные свойства БР в области микроволн представляют не только фундаментальный интерес, но также важны с точки зрения их практического применения.

В предыдущей работе мы исследовали влияние микроволнового излучения на структуру БР с использованием пленок пурпурных мембран в темноадаптированном состоянии (БР^T) [11]. Использование темноадаптированных пленочных образцов позволяло исключить влияние света и водной среды на конечный результат. В настоящей работе мы продолжили эти исследования на светоадаптированных образцах (БР^C) с использованием дифференциальной инфракрасной (ИК) Фурье-спектроскопии, одним из важных преимуществ которой перед статичной, или ИК-спектроскопией с временным разрешением, является ее способность получать информацию о молекулярных изменениях боковых аминокислотных групп (особенно карбоксильных групп и ароматических аминокислот), кофакторов (например, хромофоров и субстратов) и изменениях амидных мод в ходе белковых реакций или вызванных внешними воздействиями структурными и функциональными нарушениями. Измерения на пленочных образцах бактериородопсина в условиях световой адаптации должны обеспечить биологически более реалистичную картину взаимодействия микроволн с белком путем отслеживания изменений в хромофорном ретинале и белковых компонентах в амидной I и II и других областях спектра, важных для оценки изменений во вторичной структуре. Взаимодействие белка с внешним электрическим полем может изменить его структуру и динамическое поведение, что потенциально может повлиять на биологическую функцию белка и вызвать неопределенные последствия для здоровья. Это может иметь решающее значение для изучения возможностей потен-

циальных применений эффектов, индуцированных электромагнитным излучением, в белковой инженерии и медицине [12, 13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образца. Пурпурные мембраны были выделены из бактерий *Halobacterium salinarum* ET-1001 стандартно, как описано ранее [14]. Осадок пурпурных мембран после отмывки ресуспендировали в дистиллированной воде без добавления буфера (pH 6.6) до концентрации 10 мг/мл. Далее аликвоту 5 мкл суспензии пурпурных мембран высаживали на CaF₂-пластину, которую использовали в качестве подложки. Образец медленно высушивали на воздухе при комнатной температуре. Измерения проводили на образцах с $OD_{568} = \sim 0.6\text{--}0.9$ и относительной влажностью $\sim 30\%$ согласно работе [15].

Сверхвысокочастотная аппаратура. Сверхвысокочастотный (СВЧ) генератор модели Г4-195 (Россия), который использовался в настоящем исследовании, имел возможность регулирования частоты в пределах 8–18 ГГц в режиме медленной или быстрой перестройки частоты. Генератор Г4-195 — это автоматически управляемый резонатор с регулируемой частотой, обеспечивающий однородность распределения энергии в многомодовом микроволновом резонаторе. Принципиальная схема настройки СВЧ-генератора детально описана ранее в работе [11]. В качестве средства вывода СВЧ-излучения с генератора использовали коаксиальный кабель с антенной, которая была установлена на расстоянии 5 см от образца в кюветном отделении спектрометра. Излучение было направлено на образец под углом 15 градусов к нормали плоскости образца. Выходная мощность на излучателе составляла 10 мВт/см², что соответствовало рекомендуемому нормативному пределу общего воздействия на человека. Время экспозиции составляло 40 мин.

Учитывая, что БР обладает микроволновой активностью в диапазоне от 3 до 40 ГГц [9], мы использовали весь диапазон устройства 8–18 ГГц в режиме быстрой перестройки частоты, при которой смена частоты происходила за период 1 с.

Спектральные измерения ИК-Фурье-техникой и в УФ-видимой области. Дифференциальные ИК-Фурье-спектры поглощения записывали на двухлучевом двухканальном ИК-Фурье-спектрометре ФС-02 с использованием охлаждаемых жидким азотом низкотемпературных МСТ-приемников, германиевым окошком на криостате. Детально прибор описан ранее в работе [16]. Каждый спектр записывали с накоплением 400 сканов и разрешением 4 см⁻¹. Дифференциальные изменения получали посредством вычитания из спектра, записанного при включенном генераторе,

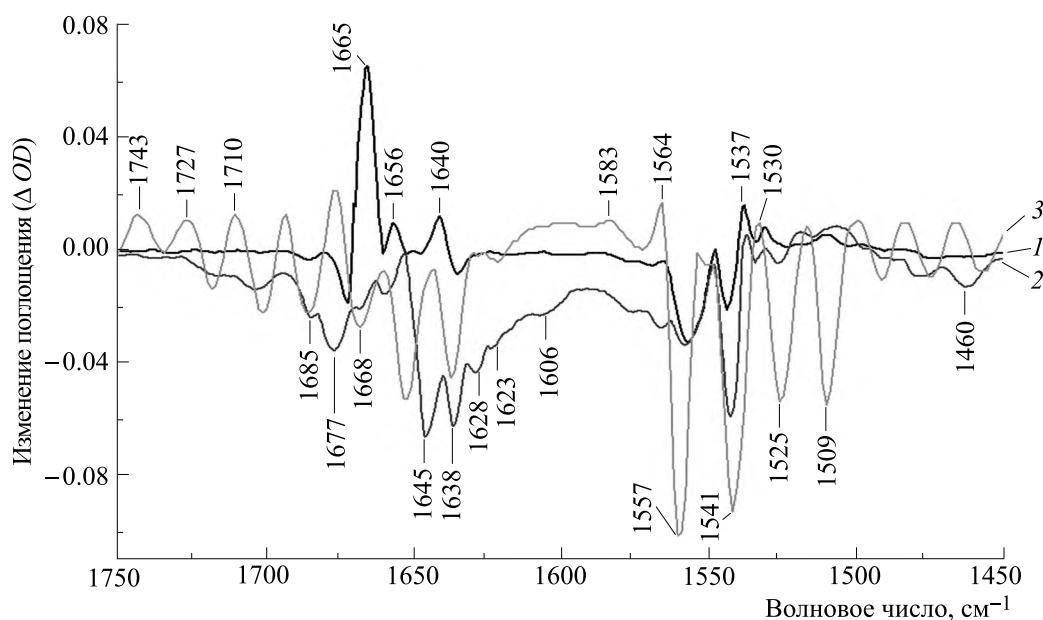


Рис. 1. Разностный (облученный микроволнами минус необлученный) ИК-Фурье-спектр БР^C в области 1750–1450 см⁻¹. Облучение проводили электромагнитной радиацией миллиметрового диапазона (8–18 ГГц, 10 мВт/см²) в режиме быстрой перестройки частоты: кривая 1 – однократное облучение, кривая 2 – двукратное облучение, кривая 3 – трехкратное облучение. Запись спектра проводили при непрерывном облучении одновременно микроволнами и видимым светом ($\lambda > 500$ нм, 160 мВт).

спектра, записанного при выключенном генераторе. В обоих случаях в течение записи спектра образец БР освещался непрерывным светом ($\lambda > 500$ нм, 160 мВт). Для каждой записи использовали свежий образец. Первоначально записывали спектр светоадаптированного образца, затем запись спектра проводили одновременно освещая образец светом и микроволнами 8–18 ГГц. После записи спектров облученные образцы БР помещали в темноту и выдерживали в течение 24 ч при комнатной температуре.

Спектрофотометрические измерения в УФ-видимой области были выполнены на спектрофотометре Sperecord UV/VIS M-40 (Германия) на облученных образцах БР после длительного (в течение нескольких месяцев) хранения их в темноте при комнатной температуре и атмосферном давлении. В этом случае для приготовления пленок из пурпурных мембран в качестве подложки использовали кварцевые стекла. Измерения проводили на темно- и светоадаптированных пленках БР ($OD \sim 0.6$).

Все измерения проводили при комнатной температуре и атмосферном давлении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен дифференциальный ИК-Фурье-спектр между облученным и необлученным светоадаптированным образцом БР (БР^C) в спектральной области 1750–1450 см⁻¹,

который демонстрирует наличие ряда полос, разбросанных по всей амидной области 1700–1500 см⁻¹. Эти амидные полосы разностного спектра обусловлены белковым остовом, претерпевшим изменения в течение облучения. Как видно, спектр содержит относительно небольшой набор полос, локализованных в диапазонах между 1700 и 1650 см⁻¹ и от 1640 до 1500 см⁻¹, где наиболее сильные полосы выявлены на частотах 1665 и 1557 см⁻¹, являющихся типичными для полос поглощения амид I и II соответственно. Эти полосы характеризуют α -спиральную конформацию апобелка. Полоса амид I обусловлена в основном валентными C=O- и C–N-колебаниями, а основной вклад в интенсивность и частоту полосы амида II вносят валентные C–N-колебания в сочетании с плоскостными деформационными N–H-колебаниями пептидных групп [17]. Как хорошо известно, эти две главные белковые полосы проявляют чувствительность к отдельным элементам вторичной белковой структуры, характеру водородных связей, спираль-спиральным взаимодействиям и геометрической ориентации в α -спиралях БР [18]. Специфическая форма и положение амидных полос коррелируют со специфической вторичной структурой. В нативном белке БР α -спиральная конформация апобелка характеризуется присутствием в спектре ИК-поглощения основной полосы амид I около 1665 см⁻¹ с плечами около 1680 и 1642 см⁻¹ и

дополнительными полосами субкомпонентов, которые выявляются методами с высоким спектральным разрешением. Смещение главной белковой полосы на $10\text{--}12\text{ см}^{-1}$ в высокочастотную область по сравнению с полосой нормальной α -спирали объясняется тем, что α -спираль в тримере БР имеет α_{II} -, а не α_I -конформацию. В качестве одной из возможных причин конформационного различия между α_{II} - и α_I -формами полагают наличие разницы в двугранных углах. Согласно теоретическим расчетам, приведенным в работе [5], α_{II} -спиральная структура имеет двугранные углы (ϕ и ψ), отличные от углов α_I -спиральной конформации, за счет чего в α_{II} -спиральной структуре длина Н-связи ($\text{C}=\text{O}\dots\text{H}-\text{N}-\text{H}$) немного больше, чем в α_I -структуре, что приводит к увеличению константы связи и, соответственно, к увеличению частоты валентных колебаний в α_{II} -форме. Другой возможной причиной может быть характер спираль-спиральных взаимодействий [18]. Однако точная причина существующих различий до сих пор неизвестна.

Детальный анализ спектра показал, что в области между 1700 и 1600 см^{-1} присутствуют две разные по интенсивности положительные полосы при 1665 и 1656 см^{-1} , которые по своему положению позволяют распознать две различные компоненты (α_I и α_{II}) α -спиральной конформации апобелка соответственно. Появление слабой полосы при 1656 см^{-1} может происходить от того, что исходная α -спиральная конформация апобелка БР уже включает в себя обе эти формы [19]. С другой стороны, появление α_I -формы могло быть результатом воздействия СВЧ-поля и производимого им теплового эффекта, который мог термически дестабилизировать белок, вызвав небольшие изменения двугранного угла или изменения водородных связей пептидных групп, что обусловило частично конформационный переход от α_{II} - к α_I -форме. Ранее подобное явление наблюдалось в БР при внешнем воздействии высокой температурой (с помощью общего нагрева, высокого давления или импульсного лазерного возбуждения) [20–23]. Одновременно с этим в светоадаптированном образце БР наблюдали присутствие формы с *13-цис*-конформацией ретиналя, что авторы интерпретировали исходя из известных представлений о том, что нагрев способствует увеличению скорости темновой адаптации и увеличению равновесной концентрации *13-цис*-изомера за счет *полностью-транс*-изомера ретиналя. При высоком давлении каталитический эффект авторы также связывали с возникновением некоего промежуточного и/или протонированного состояния группы, близкой к ретиналю, что конформационно могло дестаби-

лизировать опсин и оказать влияние на стабилизацию заряда вблизи шиффова основания, а также на геометрию связей в хромоформном ретинале [22].

В данном случае при микроволновом облучении в спектре светоадаптированного БР (рис. 1, спектр 1) наблюдали дуплет моды $\text{C}=\text{C}$ при 1536 и 1529 см^{-1} , обусловленный $\text{C}=\text{C}$ -валентными колебаниями хромоформного ретиналя *полностью-транс*- и *13-цис*-конформации ретиналя соответственно. В области локализации амида I помимо главной полосы выявлены другие полосы, например, довольно слабая полоса при $1686(-)\text{ см}^{-1}$ и средней интенсивности полоса при $1672(-)\text{ см}^{-1}$, а также пара полос $1634(-)/1640(+)\text{ см}^{-1}$, которые отнесены к субкомпонентам белковой структуры (к элементам с неупорядоченной и *бета*-структурой) [24, 25]. Примечательно, что последние две полосы могли быть изменены за счет вклада валентных $\text{C}=\text{N}$ -колебаний протонированного/депротонированного шиффова основания соответственно. В области амид II ($1600\text{--}1500\text{ см}^{-1}$) спектр демонстрирует присутствие двух интенсивных отрицательных полос при 1557 и 1541 см^{-1} , вклад в который могут вносить как валентные $\text{N}-\text{H}$ -колебания белка (амид II) с α_I - и α_{II} -спиральной структурой соответственно, так и $\text{C}=\text{C}$ -валентные колебания полиеновой цепи хромоформного ретиналя.

Таким образом, очевидно, что в индуцированный СВЧ-полем эффект вовлечены как ретиналь, так и опсин. В данной работе подобные изменения в БР наблюдали в случае использования режима быстрой (в течение 1 с), но не медленной (более 1 с) перестройки частоты (данные не приведены). Учитывая, что БР характеризуется высокой термоустойчивостью, разумно было предположить, что наблюдаемая реакция, производимая действием СВЧ, обратима и в отсутствие внешних стимулов в результате терморелаксации белок может вернуться в исходное состояние БР с восстановленной структурой. Для того, чтобы в этом убедиться, мы повторили эксперимент с тем же самым образцом, предварительно поместив его на 24 ч в темноту. Против ожидания, образец не вернулся к своей первоначальной форме. Это могло быть результатом сильно замедленной термальной релаксации измененной структуры либо результатом структурной трансформации с появлением неправильной квазистабильной структуры БР.

Детальное сравнение разностных спектров исходного БР^C и после повторного облучения, представленных на рис. 1 (спектры 1 и 2), показало расхождения между ними по числу и положению выявляемых пиков, форме, относительной

полуширине и амплитуде спектральных полос. Примечательно отметить появление в высокочастотной области в спектре повторно облучаемого БР^С (рис. 1, спектр 2) широкой полосы выше 1710 см^{-1} , где локализованы колебания COOH -групп боковых аминокислотных остатков, скрытых во внутреннем пространстве белка [26, 27]. Со стороны основных полос амида I наблюдали сложные спектральные изменения, включающие перераспределение интенсивности, изменение формы и небольшие ($\sim 2\text{--}3\text{ см}^{-1}$) сдвиги их максимумов в высокочастотную область. При этом отмечено изменение (возрастание) интенсивности полос при $1685(-)$ и $1677(-)\text{ см}^{-1}$, а также полосы при $1638(-)\text{ см}^{-1}$ и полос в области между 1650 и 1600 см^{-1} , где вместо практически гладкой полосы появилась положительная широкая полоса со множеством пиков при $1628(+)$, $1623(+)$ и $1606(+)\text{ см}^{-1}$, представляющих в основном валентные C=O -колебания в пептидных группах субкомпонентов белка [24, 28]. В области амида II также отмечено возрастание сигнала на частотах 1575 , 1561 и 1541 см^{-1} .

Таким образом, повторное воздействие СВЧ-полем изменило паттерн первоначально наблюдаемых спектральных изменений, что указывает на более сложную конформационную динамику с участием как основной цепи, так и различных субкомпонентов белка, таких элементов, как β -сшивки и нерегулярные части белковой структуры, как результат масштабной перегруппировки водородных связей внутри белка. Чтобы наблюдать за развитием конформационной динамики, мы повторили эксперимент по предыдущей схеме. В результате было установлено, что дополнительное воздействие СВЧ-полем не вызвало денатурации белка и диссоциации ретиналя (пурпурный цвет мембран не изменился). В то же время разностный спектр, записанный в этом случае (рис. 1, спектр 3) продемонстрировал дополнительные, еще более сложные изменения. В частности, в высокочастотной области выше 1700 см^{-1} появились новые пики при $1743(+)\text{ см}^{-1}$ и $1727(+)/1718(-)\text{ см}^{-1}$, которые отнесены к колебаниям COOH -групп боковых аминокислотных остатков, находящихся в непосредственной близости к ретиналю [29]. В области амида I у полосы α_1 -амид I при 1657 см^{-1} произошел сдвиг в низкочастотную область в сторону 1652 см^{-1} . В области между 1650 и 1560 см^{-1} изменились форма полос и знак их амплитуды. Со стороны полос амида II наблюдали резкое увеличение интенсивности при 1557 и 1541 см^{-1} , тогда как частота их колебаний не изменилась, что совсем не удивительно, поскольку хорошо известно, что частота колеба-

ний амида II в α -спиралях, которые представляют собой комбинацию валентных C-N - и деформационных N-H -колебаний в плоскости, проявляет особую чувствительность к состоянию протонирования пептидной единицы, а не вторичной структуры [30]. В то же время водородная связь и внутрицепочечная конфигурация пептидных групп могут существенно влиять на интенсивность колебательной моды амида II в пептидных цепях, что показано в теоретическом исследовании [31]. Таким образом, наблюдаемые в этом случае спектральные изменения подтвердили эффект влияния микроволн на вторичную структуру БР^С в плазматических мембранах и необратимый характер происходящих изменений, что коррелирует с данными других авторов, свидетельствующих о влиянии микроволнового излучения как на конформацию отдельных глобулярных белков [32, 33], так и сложных систем, включая клеточные мембраны (см., например, работу [34]). Поскольку в облученных образцах БР наблюдалась большая структурная неоднородность белка описана, интересно было попытаться спектрально оценить влияние СВЧ-поля на движение альфа-спиралей и динамику конформационных изменений. Для сравнения мы использовали величину интенсивности полос, принадлежащих α_1 -спиральной структуре α_1 - и α_{II} -форм из разложенных спектров, как это показано на рис. 2.

На рис. 2 представлено разложение сложного профиля амидных полос на гауссовы компоненты. Мы оценили конформационную динамику по соотношению интенсивностей полос амида I α_1 - и α_{II} -форм в разностных спектрах.

На рис. 3 показана гистограмма изменения величины соотношения высот амплитуд полос с α -I- и α -II-спиральной структурой при увеличении длительности микроволнового облучения путем повторения записи с перерывом на хранение в темноте в течение суток. Численные значения соотношения интенсивностей двух спектральных компонент (I_{1668}/I_{1656}) получены на основе разложения сложного профиля полос амида I на спектральные компоненты 1668 и 1656 см^{-1} при одно-, двух- и трехкратном облучении. Как видно, по мере увеличения длительности воздействия соотношение интенсивностей полос при 1668 и 1656 см^{-1} менялось соответственно от 1.690 ± 0.175 и 1.280 ± 0.276 до значения 0.4900 ± 0.0954 , что четко свидетельствует о структурных перестройках внутри белкового остова, сопровождающихся, в том числе, изменением альфа-спиральной конфигурации регулярных α -спиралей внутри мембраны и переходом от α -II- к α -I-типу. Очевидно, что трансформация вторичной структуры в присутствии СВЧ, и светового поля включает более глобальные

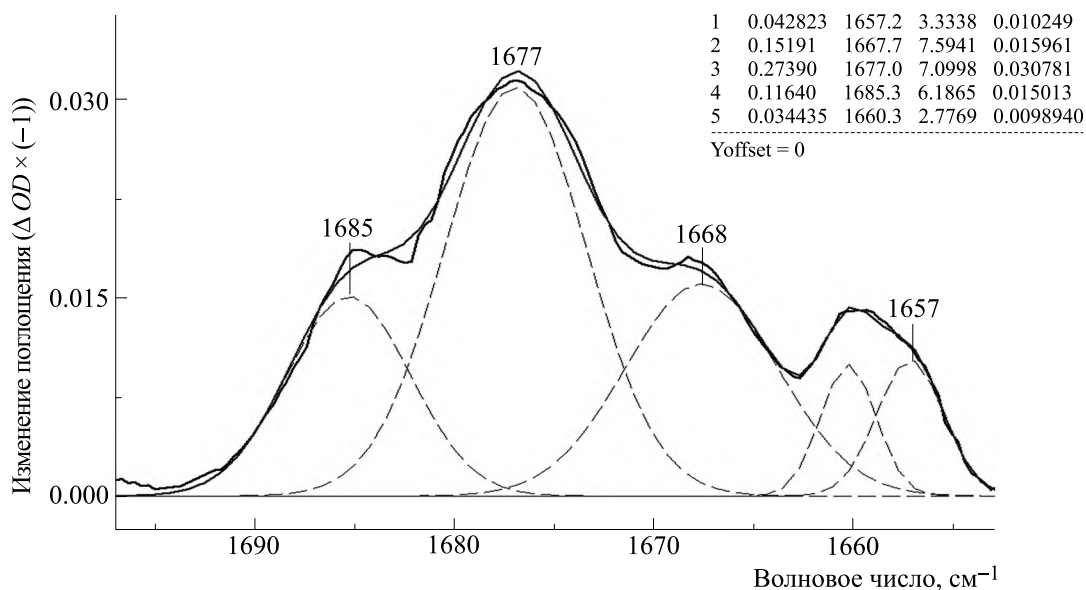


Рис. 2. Разложение разностного спектра БР из рис. 1 в области 1670–1650 см^{-1} . Спектр оптимально аппроксимирован гауссовыми полосами индивидуальных компонентов амида I. По оси ординат — амплитуда изменения поглощения ΔD (умножено на -1).

структурные изменения по сравнению с теми, что наблюдаются в ходе световой и тепловой реакции нативного белка в пурпурных мембранах. Обнаруженные в данном эксперименте изменения на уровне конформации белка имели необратимый характер. Примечательно отметить, что БР с образовавшейся, вероятно, неправильной квазиустойчивой структурой в отсутствие каких-либо внешних стимулов мог пребывать в таком состоянии неопределенно долго. В этом мы смогли убе-

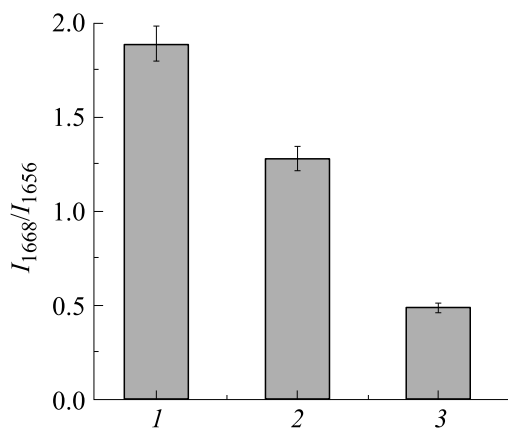


Рис. 3. Гистограмма динамики конформационного перехода от конформера II к конформеру I альфа-спиральной цепи БР по изменению соотношения амплитуды (I_{1668}/I_{1656}) полос амида I по деконволюционным разностным спектрам ИК-поглощения из рис. 1. Точки данных представляют собой средние значения как минимум двух выборок $\pm SE$.

диться, записав спектры поглощения образца БР спустя несколько месяцев после облучения.

На рис. 4 представлены спектры поглощения темноадаптированного (спектр 1) и светоадаптированного (спектр 2) образца БР спустя несколько месяцев после облучения. Спектры, представленные на рис. 4, полностью очищены от рэлеевского рассеяния. Спектры поглощения облученного темно- и светоадаптированного БР демонстрируют максимумы возле 560 и 566 нм соответственно, которые по положению не совпадают с теми, что наблюдали в спектрах поглощения нативного БР ($\lambda_{\text{max}}^{\text{БРТ}} = 550$ нм и $\lambda_{\text{max}}^{\text{БРС}} = 570$ нм). Кроме того, было отмечено обратимое увеличение в темноте поглощения облученного образца и наличие неизвестных продуктов.

Данные спектры поглощения темно- и светоадаптированного образцов могли быть удовлетворительно аппроксимированы гауссовыми кривыми. Первоначально спектр БР^T включал только две гауссовы компоненты с положением максимума возле 537.00 ± 1.86 нм и 581.0 ± 0.8 нм. Спектр БР^C (рис. 4, спектр 2) включал минимальный состав, состоящий из трех компонент — основных гауссовых компонент с максимумами при 537.0 ± 1.5 нм и 581.84 ± 1.30 нм и третьей, самой слабой гауссовой компоненты, которая имела максимум при 417.0 ± 2.3 нм. По своему положению компонента с максимумом при 417.0 ± 2.3 нм более всего соответствовал высокому уровню возбуждения ретинального хромофора (β -полоса) и/или дополнительному, близкому к M_{412}

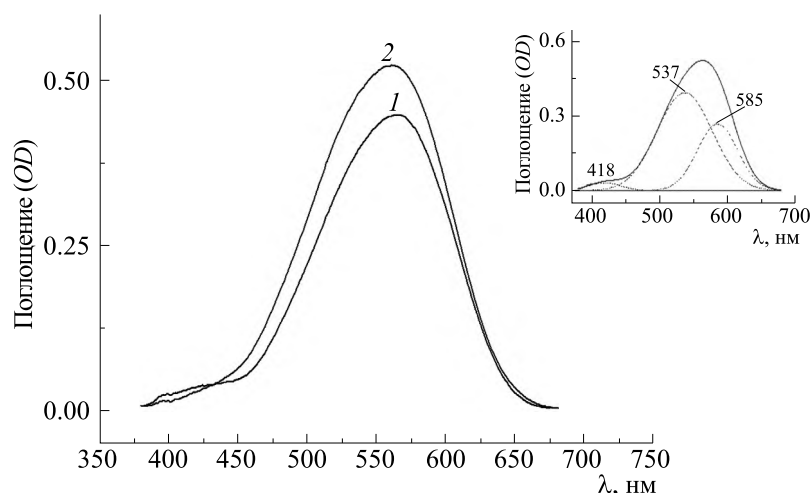


Рис. 4. Спектры оптического поглощения облученного БР в условиях темновой и световой адаптации: 1 — спектр темноадаптированного БР, записан после длительного (в течение нескольких месяцев) хранения после облучения микроволнами (8–18 ГГц, 10 мВт/см²); 2 — спектр светоадаптированного образца записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин). Спектры полностью очищены от рэлеевского рассеяния. На врезке: разложение спектра 2 оптимально подходящими гауссовыми полосами отдельных компонентов.

фотопродукту. Спектральная компонента с максимумом поглощения возле 537 нм могла быть близка к L_{537} -форме [35], однако спектральная компонента с максимумом поглощения 581 нм не соответствовала ни одному из пяти идентифицированных в фотоцикле продуктов, представляющих собой спектрально-различные виды (K, L, M, N и O) [6].

Освещение пленок пурпурных мембран привело не только к смещению главного максимума от 566 к 560 нм, но и к смещению равновесия в сторону увеличения поглощения возле 581 нм. В темноадаптированном состоянии облученного БР содержание продукта BR_{537} в равновесной смеси превышало более, чем в 2 раза содержание продукта BR_{581} ($I_{537}/I_{581} = 2.14 \pm 0.09$). Освещение облученного БР непрерывным светом в течение 15 мин приводило к изменению равновесия в сторону увеличения поглощения BR_{581} ($I_{537}/I_{581} = 1.65 \pm 0.14$) и появлению нового продукта — BR_{417} . Изменение в соотношении компонент и компонентном составе фотопродуктов в облученном БР демонстрирует наличие фотореакции.

Разностный спектр облученного микроволнами БР между свето- и темноадаптированным образцами демонстрировал глубокий отрицательный минимум при $\lambda = 532$ нм и слабый положительный максимум при 410 ± 2 нм (рис. 5, спектр 1), тогда как в разностном спектре нативного БР основной положительный максимум между свето- и темноадаптированным образцом находится возле 590 нм (см., например, работу [36]).

Кроме того, нами было замечено, что увеличение длительности фотовозбуждения путем чередования световой и темновой адаптации не оказывало практически никакого влияния на соотношение компонент I_{537}/I_{581} в составе BR^T и BR^C . В то же время дополнительное освещение приводило к сдвигу максимума (на ~ 2 нм) в синюю область в спектрах поглощения BR^T и BR^C и появлению дополнительной структуры в разностном спектре в области 580–650 (рис. 5, спектры 3 и 4), что указывает на возможное существование фотореакций, связанных с относительно небольшими изменениями оптической плотности. Рис. 5 наглядно иллюстрирует динамику фотореакции БР при увеличении длительности фотовозбуждения. При повторном действии световой подсветки в разностном спектре облученного БР каждый раз отмечали сокращение глубины и полуширины основного минимума, его сдвиг в сторону более коротких волн от 532 к 509 нм, а также появление положительного максимума около 600 нм в спектрах (рис. 5, спектры 3 и 4), что отражает локальные изменения в окружении ретинального хромофора, диэлектрической константе, кинетических характеристиках измененного белка, фотопродуктах и их составе. Также это наблюдение показывает, что сформировавшаяся в результате облучения неправильная структура неустойчива в присутствии внешнего светового поля, которое способно повлиять на фотореакцию белка.

Описанные выше результаты, получены на пленках пурпурных мембран с ограниченным содержанием воды. В этих условиях белок БР, не будучи экспонирован в водной среде, не испытывает с ее стороны нагрева посредством термического

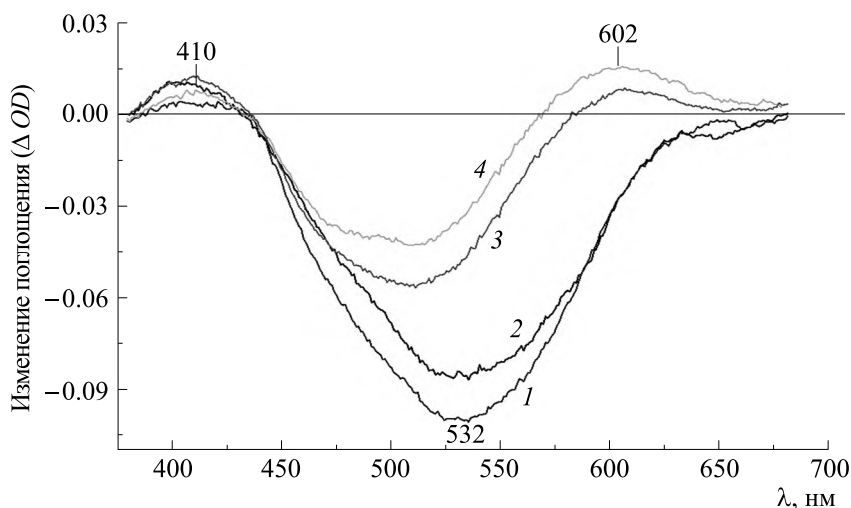


Рис. 5. Фотоиндуцированные изменения оптического поглощения бактериородопсина после длительного хранения после облучения микроволнами (8–18 ГГц, 10 мВт/см²). Разностный спектр (свет минус темнота): 1 — спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 2 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 1 и спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 3 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 2, запись спектра произведена сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин); 4 — образец выдержан в течение ночи в темноте после записи спектра 3 и спектр записан сразу после освещения светом ($\lambda = 400\text{--}600$ нм, 15 мин).

обмена с раствором, который сильно поглощает микроволновое излучение. Показано, что облучение пленок пурпурных мембран электромагнитным излучением сверхвысокой частоты в режиме быстрой перестройки частоты малой мощности вызывает структурные перестройки как внутри хромофорного центра, так и в самом белковом остове за счет разворачивания спиралей и перехода α_{II} - к α_I -форме α -спиральной структуры и появления некоего вида β -структур. Это привело нас к заключению о том, что возможный нагрев образца под воздействием микроволн производит эффект на вторичную структуру БР, который не является тем же самым, что при общем прогреве образца или нагреве, вызванном лазерным излучением или высоким давлением. Структурная трансформация, индуцированная действием СВЧ-поля, приводит к образованию неправильной конфигурации спиралей, вследствие чего затруднена температурная и структурная релаксация апобелка. В настоящее время у нас нет четкого понимания, почему при некотором сходстве действие микроволнового облучения на БР отличается от действия тепла, вызванного общим нагревом.

Между тем, в литературе появляется все больше свидетельств, что микроволновое излучение может влиять на конформацию белков [32, 38–40] за счет проявления не теплового, а атермического действия микроволн, механизм которого менее всего изучен и не имеет однозначного объяснения [32, 37–39]. Механизмы, участвующие в предполагаемых нетепловых эффектах, непосредственно не связаны с изменением тепла, а

скорее связывают с различными типами структурных преобразований. Недавно в работе [41] выявлено о специфическом микроволновом эффекте, выявленном на зеленом флуоресцентном белке, который авторы связывают с атермическим эффектом, обусловленным поглощением микроволн молекулами связанной воды, присутствующими в структуре белка, как внутри (ряд молекул воды тянется от хромофора к глобуле), так и на поверхности (слой связанной воды присоединен к поверхности белковой глобулы). Как хорошо известно, поглощение связанной воды лежит в диапазоне 1–15 ГГц [42], в который также попадают частоты 8–18 ГГц, используемые в нашем исследовании. Мы полагаем, что и в нашем случае не последнюю роль могло также сыграть взаимодействие микроволн с молекулами связанной воды, которые содержатся внутри протон-переносящего канала в БР [43] и на поверхности белка опсина. Электрическое поле посредством взаимодействия с различными заряженными, полярными и поляризуемыми группами, включая молекулы связанной воды, способно повлиять на распределение заряда в структуре БР и/или прочность водородных связей в сети, соединяющей молекулы воды с белковой глобулой внутри протон-переносящего канала. Как результат, происходит трансформация основной цепи, перераспределение водородных связей и образование неправильной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия пленочных образцов БР в пурпурных мембранах, облучаемых микроволнами 8–18 ГГц продемонстрировала в режиме реального времени чувствительность его вторичной структуры как со стороны C=O- и N–H-мод пептидных групп, так и молекулярных групп в окружении ретиналя. Показано, что индуцированные воздействием микроволн структурные перестройки как внутри хромофорного центра, так и в самом белковом остове были необратимыми в рассматриваемом периоде. Это подтверждается тем, что в результате облучения в белке произошли частичная трансформация конфигурации основной цепи от II к I типу, изменение структуры водородных связей с перераспределением заряда в окружении ретиналя. Облученный белок с неправильной структурой демонстрировал наличие равновесной смеси продуктов, их фотоактивность, динамическую реакцию на фотовозбуждение, однако пока не известно, был ли БР способен качать протоны и вернуться в состояние с нативной структурой. Во всяком случае, этот загадочный результат требует своего дальнейшего изучения.

Мы также полагаем, что способность микроволн изменять структуру сети водородных связей может стать многообещающим инструментом для дальнейших фундаментальных исследований и будущих приложений в биотехнологии и медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/>). Авторы выражают свою благодарность за помощь в работе сотрудникам ЦКП Н.К. Призовой и Л. М. Хайбулаевой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lozier R. H., Bogomolni R. A., and Stoerkenius W. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys J.*, **15** (9), 955–962 (1975). DOI: 10.1016/S0006-3495(75)85875-9
- Ernst O. P., Lodowski D. T., Elstner M., Hegemann P., Brown L. S., and Kandori H. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.*, **114** (1), 126–163 (2014). DOI: 10.1021/cr4003769
- Fahmy K. and Sakmar T. P., Interdisciplinary biophysical studies of membrane proteins bacteriorhodopsin and rhodopsin. *Biophys. Rev.*, **15**, 111 (2023). DOI: 10.1007/s12551-022-01003-y
- Henderson R., Baldwin J. M., Ceska T. A., Zemlin F., Beckmann E., and Downing K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, **213** (14), 899–929 (1990). DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80271-2
- Krimm S. and Dwivedi A. M. Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism? *Science*, **216** (4544), 407–408 (1982). DOI: 10.1126/science.6280277
- Mathies R. A., Lin S. W., Ames J. B., and Pollard W. T. From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 491–518 (1991). DOI: 10.1146/annurev.bb.20.060191.002423
- Birge R. R. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1016** (3), 293–327 (1990). DOI: 10.1016/0005-2728(90)90163-x
- Balashov S. P. Photoreactions of the photointermediates of bacteriorhodopsin. *Isr. J. Chem.*, **35** (3–4), 415 (1995).
- Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes. Bacteriorhodopsin as a prototype for proton pumps. *J. Biol. Chem.*, **272** (50), 31209–31212 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.50.31209
- Birge R. R., Govender D. S. K., Izgi K. C., and Tan E. H. L. Role of calcium in the proton pump of bacteriorhodopsin. microwave evidence for a cation-gated mechanism. *J. Phys. Chem. B.*, **100** (23), 9990–10004 (1996). DOI: 10.1021/jp953669e
- Terpugov E. L., Degtyareva O. V., and Fesenko E. E. Microwave-induced structural changes in bacteriorhodopsin: studies using optical and Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biophysics*, **63** (5), 705–711 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918050226
- Kandori H. Biophysics of rhodopsins and optogenetics. *Biophys. Rev.*, **12** (2), 355–361 (2020). DOI: 10.1007/s12551-020-00645-0
- Saeedi P., Moosaabadi J. M., Sebtahmadi S. S., Mehrabadi J. F., Behmanesh M., and Mekhilef S. Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered*, **3**, 326–328 (2012). DOI: 10.4161/bioe.21445
- Oesterhelt D. and Stoerkenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.*, **31**, 667–678 (1974).

15. O'Brien F. E. M. The control of humidity by saturated salt solutions, *J. Sci. Instr.*, **25** (3), 73–76 (1948). DOI: 10.1088/0950-7671/25/3/30
16. Terpugov E. L., and Degtyareva O. V. FTIR emission spectra of bacteriorhodopsin in a vibrational excited-state. *Biochemistry (Moscow)*, **66** (11), 1315–1322 (2001). DOI: 10.1023/A:1013195605416
17. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767** (9), 1073–1101 (2007). DOI: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004
18. Karjalainen E.-L. and Barth A. Vibrational coupling between helices influences the amide I infrared absorption of proteins. Application to bacteriorhodopsin and rhodopsin. *J. Phys. Chem. B.*, **116** (15), 4448–56 (2012). DOI: 10.1021/jp300329k
19. Rothschild K. J. and Clark N. A. Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane. *Science*, **204** (4390), 311–312 (1979). DOI: 10.1126/science.432645
20. Taneva S. G., Caaveiro J. M. M., Muga A., and Coñi F. M. A pathway for the thermal destabilization of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, **367** (3), 297–300 (1995). DOI: 10.1016/0014-5793(95)00570-Y
21. Torres J., Sepulcre F., and Padrós E., Conformational Changes in Bacteriorhodopsin Associated with Protein-Protein Interactions: a functional α I- α II helix switch? *Biochemistry*, **34** (50), 16320–16326 (1995). DOI: 10.1021/bi00050a012
22. Barnett S. M., Edwards C. M., Butler I. S., and Levin I. W. Pressure-induced transmembrane (II)- to (I)-helical conversion in bacteriorhodopsin: an infrared spectroscopic study. *J. Phys. Chem. B.*, **101** (46), 9421–9424 (1997). DOI: 10.1021/jp972086x
23. Wang J. and El-Sayed M. A. Temperature jump-induced secondary structural change of the membrane protein bacteriorhodopsin in the premelting temperature region: a nanosecond time-resolved Fourier transform infrared study. *Biophys. J.*, **76** (5), 2777–2783 (1999). DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77431-x
24. Byler D. M. and Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, **25** (3), 469–487 (1986). DOI: 10.1002/bip.360250307
25. Surewicz W. K. and Mantsch H. H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, **952** (2), 115–130 (1988). DOI: 10.1016/0167-4838(88)90107-0
26. Maeda A., Sasaki J., Shichida Y., and Yoshizawa T. Water structure changes in bacteriorhodopsin photocycle: Analysis by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **31** (2), 462–467 (1992). DOI: 10.1021/bi00117a023
27. Fischer W. B., Sonar S., Marti T., Khorana H. G., and Rothschild K. J. Detection of a water molecule in the active-site of bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction. *Biochemistry*, **33** (43), 12757–12762 (1994). DOI: 10.1021/bi00209a005
28. Jackson M. and Mantsch H. H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, **30** (2), 95–120 (1995). DOI: 10.3109/10409239509085140
29. Braiman M. S., Mogi T., Marti T., Stern L. J., Khorana H. G., and Rothschild K. J. Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212. *Biochemistry*, **27** (23), 8516–8520 (1988). DOI: 10.1021/bi00423a002
30. Krimm S. and Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **38**, 181–364 (1986). DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60528-8
31. Torii H. and Kawanaka M. Secondary structure dependence and hydration effect of the infrared intensity of the amide II mode of peptide chains. *J. Phys. Chem. B.*, **120** (8), 1624–1634 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08258
32. Porcelli M., Cacciapuotì G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De Rosa M., and Zappia V. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Lett.*, **402** (2–3), 102–106 (1997). DOI: 10.1016/S0014-5793(96)01505-0
33. Bohr H. and Bohr J. Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. *Phys. Rev. E*, **61** (4), 4310–4314 (2000). DOI: 10.1103/PhysRevE.61.4310
34. Fesenko E. E., Geletyuk V. I., Kazachenko V. N., and Chemeris N. K. Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel-modifying activity. *FEBS Lett.*, **366** (1), 49–52 (1995). DOI: 10.1016/0014-5793(95)98629-w
35. Klink B. U., Winter R., Engelhard M., and Chizhov I. Pressure dependence of the photocycle kinetics of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, **83** (6), 3490–3498 (2002). DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75348-4
36. Kouyama T., Bogomolni R. A., and Stoekenius W. Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, **48** (2), 201 (1985). DOI: 10.1016/S0006-3495(85)83773-5
37. Zhao X. and Wang C., The non-thermal biological effects and mechanisms of microwave exposure. *Inter. J. Rad. Res.*, **19** (3), 483–494 (2021). DOI: 10.29252/ijrr.19.2.483
38. Adair R. K. Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation *Bioelectromagnetics*, **24** (1), 39–48 (2002). DOI: 10.1002/bem.10061
39. de Pomerai D. I., Smith B., Dawe A., North K., Smith T., Archer D. B., Duce I. R., Jones D., and Candido P. M. Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett.*, **543** (1–3), 93–97 (2003). DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00413-7
40. Calabrò E. and Magazù S. The α -helix alignment of proteins in water solution toward a high-frequency

- electromagnetic field: A FTIR spectroscopy study. *Electromagn. Biol. Med.*, **36** (3), 279–288 (2017). DOI: 10.1080/15368378.2017.1328691
41. Coptý A. B., Neve-Oz Y., Barak I., Golosovsky M., and Davidov D. Evidence for a specific microwave radiation effect on the green fluorescent protein. *Biophys. J.*, **91** (4), 1413–1423 (2006). DOI: 10.1529/biophysj.106.084111
 42. Dawkins A. W. J., Nightingale N. R. V., South G. P., Sheppard R. J., and Grant E. H. The role of water in microwave absorption by biological material with particular reference to microwave hazards. *Phys. Med. Biol.*, **24** (6), 1168 (1979). DOI: 10.1088/0031-9155/24/6/007
 43. Deng H., Huang L., Callender R., and Ebrey T. Evidence for a bound water molecule next to the retinal Schiff base in bacteriorhodopsin and rhodopsin: a resonance Raman study of the Schiff base hydrogen/deuterium exchange. *Biophys. J.*, **66** (4), 1129–1136 (1994). DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80893-8

FT-IR Difference Spectroscopy for Studying the Secondary Structure of the Membrane Protein Bacteriorhodopsin When Submitted to Microwave Radiation at 8–18 GHz

E.L. Terpugov*, O.V. Degtyareva*, and E.E. Fesenko*

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Fourier transform infrared (FTIR) difference spectroscopy was used to study the effects of microwaves radiation on the structure of bacteriorhodopsin under light condition. The detailed FTIR spectral analysis revealed the pronounced structural changes in amide I and amide II regions as well as the rearrangements of the hydrogen-bonding network. Well-resolved peaks of amide bands allow accurate determination of two different components (α -I and α -II) of an α -helical conformation of opsin. Irreversible conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membranes, detected by FTIR difference spectroscopy, suggest that regardless of temperature, microwaves induce protein structural rearrangements.

Keywords: bacteriorhodopsin, dark/light adaptation, optical spectroscopy, Fourier transform infrared difference spectroscopy, microwaves, biological effect