

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ БАКТЕРИОРОДОПСИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ИК-ФУРЬЕ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2018 г. Е.Л. Терпугов, О.В. Дегтярева, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: el_terpugov@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.07.18 г.

С помощью оптической и дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии обнаружен эффект воздействия микроволнового излучения на структуру бактериородопсина в пленках при 30% относительной влажности. Впервые показано, что в отсутствие фотовозбуждения при воздействии электромагнитным излучением сверхвысокой частоты при плотности потока менее 10 мВт/см^2 в режиме перестройки частоты в диапазоне 8–18 ГГц происходит переход из основного темноадаптированного состояния бактериородопсина BR_{560} в состояние, подобное светоадаптированному BR_{568} , представляющему смесь BR_{568} и других изомерных форм. Первоначальный ответ на воздействие сверхвысокочастотного поля включает в себя коллективное движение большей части белковых атомов, дающих сильный сигнал в спектральных областях $3700\text{--}3300$, $2400\text{--}2300$, и $800\text{--}600 \text{ см}^{-1}$. В области локализации фундаментальных частот ретинального хромофора и амидных полос (Амид I и Амид II) были выявлены относительно слабые эффекты, касающиеся изменений структуры хромофорного ретиналя и связанного с ним локального изменения микроокружения.

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

DOI: 10.1134/S0006302918050071

Мембранные белки играют ключевую роль во многих важных биологических процессах (например, дыхании, транспорте, внутриклеточной сигнализации). Биологическая функция мембранных белков, как и других белков в целом, тесно связана с их трехмерной структурой. Не только разрушение, даже небольшие изменения этих структур часто ведут к потере или резкому изменению их активности. Изучение природы таких изменений при использовании различных агентов может способствовать как лучшему пониманию молекулярной организации трехмерной структуры белка, так и структурных факторов, обеспечивающих ее стабильность.

Белок бактериородопсин (БР) вырабатывается галофильными бактериями *Halobacterium salinarium* в составе пурпурных мембран и представляет собой протонную транслоказу, кото-

рая использует свет в качестве альтернативного источника энергии [1,2]. Бактериородопсин представляет собой уникальную модельную систему, которая включает в себя свойства многих важных процессов, и поэтому БР широко используется в качестве модели в биофизических и биоэнергетических исследованиях. Белковая часть бактериородопсина представляет собой одну полипептидную цепь средней длины, которая не содержит других коферментов и простетических групп, кроме ретиналя. В светоадаптированном состоянии хромофорный ретиналь характеризуется широкой полосой поглощения в видимой области с максимумом при 568 (BR_{568}). Поглощение фотона BR_{568} вызывает циклическую фотохимическую реакцию, которая приводит к транспорту протона через бактериальную клеточную мембрану. Интермедиаты фотоцикла цикла БР были охарактеризованы их спектрами поглощения и реакционными кинетиками [3–5]. В темноте бактериородопсин переходит в темноадаптированное состояние,

Сокращения: БР – бактериородопсин, ИК – инфракрасный, СВЧ – сверхвысокие частоты.

которое имеет максимум поглощения при 558 нм и содержит практически равную смесь продуктов БР₅₆₈ и БР₅₄₈ соответственно с полностью-*транс*- и 13-*цис*-конфигурацией ретиналя [6–8]. В светоадаптированном состоянии БР₅₆₈ содержит исключительно полностью-*транс*-ретиналь. Следует отметить, что *цис*- и *транс*-состояния БР различаются также по конфигурации C=N⁺-связи шиффова основания [9]. В темноадаптированном состоянии, непосредственно связанном с конформационным изменением, так же как и в светоадаптированном состоянии, изомерный состав может быть изменен влиянием ряда факторов, включая рН среды [10–12], агрегацию белка [13], уровень гидратации [14,15], гидравлическое давление [16–18].

Таким образом, эта система представляет хорошую возможность проверить, как конформация белка подвержена влиянию микроволнового излучения. Насколько нам известно, такие исследования еще не проводились, и в настоящее время существует совсем немного работ, посвященных воздействию микроволн на белок БР. В работе, выполненной Бёрджем с соавторами [19], было показано, что в светоадаптированном состоянии БР₅₆₈ имеет сильное поглощение микроволнового излучения с максимумом возле 8 и 25 ГГц, тогда как деионизированная форма, так называемые голубые мембраны, микроволновой активностью не обладает. При этом было показано, что инициирование фотоцикла создает дополнительную микроволновую активность в низкочастотной области спектра. Разностный спектр между М-состоянием и светоадаптированной формой БР показывает резонанс на частоте 9,8 ГГц.

Исследование влияния микроволнового излучения на биообъекты представляет не только важный академический, но и практический интерес. За последние годы резко возросла обеспокоенность общественности по поводу проблем, связанных со здоровьем и безопасностью при воздействии электромагнитных полей на человека. Особый интерес представляют исследования с участием «неионизирующих» частот в диапазоне от 3 кГц до 300 ГГц, уровни энергии которых являются чрезвычайно малыми по сравнению с энергией, необходимой для ионизации ткани и разрушения клеточной ДНК, как это наблюдается на частотах рентгеновского излучения. Речь идет о полях с плотностью потока мощности ниже 10 мВт/см², при которой нет риска термического повреждения [20].

В последнее время большое внимание уделяется проблеме атермического действия микроволнового излучения, его отдаленных послед-

ствий и вопросу представляют ли они риск для здоровья человека. Это связано с тем, что все чаще стали появляться сообщения о влиянии на белки и живые организмы микроволнового излучения на нетермальном уровне [21–29]. В связи с этим интересно проверить, влияет ли это излучение на структуру бактериородопсина?

Основная цель данной работы состояла в обнаружении и детальном исследовании эффекта действия слабых электромагнитных полей сверхвысокой частоты на структуру и изомерный состав темноадаптированного бактериородопсина с использованием спектроскопических методов электронного поглощения и дифференциальной инфракрасной (ИК) Фурье-спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нативный белок бактериородопсин в пурпурных мембранах был выделен из клеток галофильных бактерий *Halobacterium salinarum* штамма ET-1001 по стандартной процедуре [30]. Пурпурные мембраны затем ресуспендировали в дистиллированной воде без добавления буфера. Чистота препарата была на уровне 1,75–1,80 (ее определяли по соотношению оптической плотности при 280 и 568 нм).

Для спектральных измерений пленки пурпурных мембран готовили из водной суспензии с концентрацией 10 мг/мл посредством высаживания аликвоты 5 мкл на подложку из CaF₂ с последующим высушиванием при комнатной температуре до тех пор, пока вода не испарится. Пленки имели оптическую плотность порядка 0,6 при $\lambda = 568$ нм. После этого влажность образца поддерживали на уровне 30% с помощью насыщенного солевого раствора [30] в криостате, описанном ранее в работе [31].

Световую адаптацию проводили с помощью непрерывного освещения светом ($\lambda > 500$ нм) от ксеноновой лампы (100 Вт). При темновой адаптации образец выдерживали в темноте в течение 24 ч. Спектральные измерения темноадаптированного БР проводили при полной световой изоляции образца.

Спектрофотометрические измерения в УФ-видимой области были выполнены на спектрофотометре Specord UV/VIS M-40 (Германия).

Дифференциальные ИК-Фурье-спектры поглощения записывали на двулучевом двухканальном ИК-Фурье-спектрометре ФС-02 («ЛОМО», Россия) с использованием охлаждаемых жидким азотом низкотемпературных МСТ-приемников, с германиевым окошком на криостате. Детально установка описана ранее в ра-

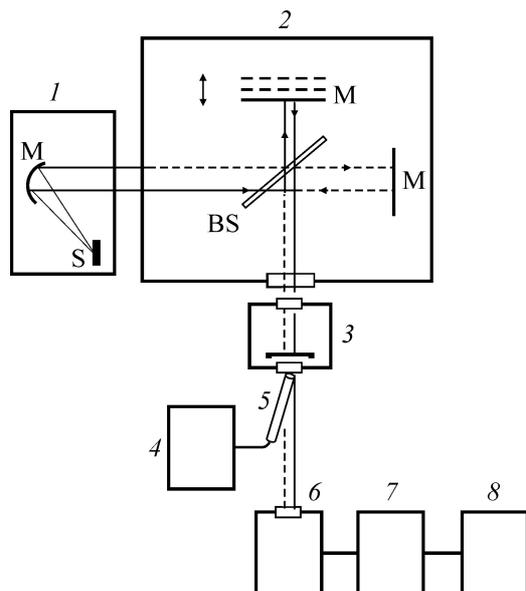


Рис. 1. Принципиальная схема эксперимента для измерения ИК-Фурье-спектров бактериородопсина при облучении СВЧ-полем: 1 – блок источника ИК-излучения, 2 – интерферометр Майкельсона, 3 – образец, 4 – СВЧ-генератор, 5 – стержневой излучатель, 6 – ИК-приемник, 7 – аналого-цифровой преобразователь, 8 – компьютер; BS – светоделитель; М – приборное зеркало; S – ИК-источник.

боте [[32]]. Методика измерения спектров поглощения была стандартной (рис. 1): излучение от инфракрасного источника (1), расположенного в обособленном блоке спектрометра ФС-02, проходя через входное окошко интерферометра Майкельсона (2), попадало на расположенный под углом к оптической оси прибора светоделитель (BS – beam splitter) – полупрозрачную плоскопараллельную пластину, разделяющую параллельный световой пучок на два и направляющую их на два зеркала (М), расположенные, как показано на рис. 1. Одно из двух зеркал неподвижно, а другое перемещается с постоянной скоростью во время сбора данных. Как видно на рис. 1, сначала ИК-лучи отражаются зеркалами (М), после чего каждый из пучков возвращается к светоделителю (BS), на котором снова делится на две части, одна из которых проходит через образец (3) и попадает в блок (4) на ИК-приемник (6), а вторая возвращается обратно к ИК-источнику (S). Одновременно проводится запись всех длин волн в ИК-диапазоне. Два пучка отличаются друг от друга оптической разностью хода, величина которой меняется в зависимости от положения подвижного зеркала. На выходе каждое монохроматическое излучение модулируется с частотой, пропорциональной волновому числу. Результатом является интерферограмма. После то-

го, как рекомбинированный луч пройдет через образец (3), детектор (6) будет записывать Фурье-образ исследуемого ИК-спектра. Полученные данные затем обрабатываются аналого-цифровым преобразователем (7) и компьютером (8), который воссоздает спектральный состав излучения путем обратного преобразования Фурье-интерферограммы в ИК-спектр [33]. После проведения Фурье-преобразования в полученном спектре наблюдается полоса пропускания образца, что далее можно математически трансформировать в спектр ИК-поглощения.

Каждый спектр записывали с накоплением 400 сканов и разрешением 4 см^{-1} .

При регистрации дифференциальных изменений проводили две последовательные записи – одну при выключенном, другую – при включенном генераторе сверхвысоких частот (СВЧ).

В качестве источника микроволнового излучения использовали генератор сантиметрового диапазона ГС-195 (Россия), дающий возможность автоматически менять частоту в пределах 8–18 ГГц. Интервал между двумя последовательными циклами составлял 1 с, выходная мощность на излучателе – 10 мВт/см^2 , время экспозиции – 40 мин. Цилиндрический ферритовый излучательный стержень диаметром 10 мм генератора ГС-195 был установлен на расстоянии 5 см от образца в кюветном отделении спектрометра. Излучение было направлено на образец под углом 15° к нормали плоскости образца.

Все измерения проводили при комнатной температуре и атмосферном давлении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена схема эксперимента. Все опыты с СВЧ-волнами проводили при непрерывном режиме облучения.

Адаптированный к темноте образец БР в нативном состоянии и при непосредственном воздействии СВЧ в диапазоне 8–18 ГГц в режиме автоматической перестройки частоты характеризовали с помощью оптической и дифференциальной ИК-Фурье спектроскопии.

Мы обнаружили эффект воздействия микроволнового облучения на темно-адаптированный образец, в результате которого изменилось соотношение изомерных форм в БР. В обычных условиях изомерный состав ретиналя в БР представляет смесь (0,66) 13-цис- и (0,34) полностью-транс-изомеров в темноадаптированном состоянии пигмента [34–37]. Оба БР₅₄₈ (13-цис-) и БР₅₆₈ (полностью-транс-) изомера претерпевают

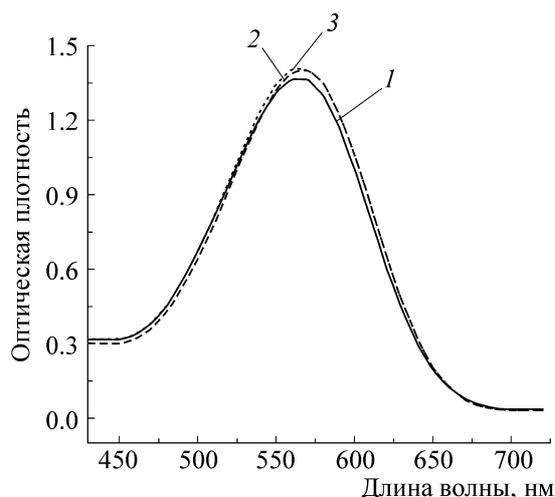


Рис. 2. Спектр поглощения пленки БР при относительной влажности ~30% в необлученном темноадаптированном состоянии (1), светоадаптированном состоянии (2) и облученном темноадаптированном состоянии (3). Кривая 2 записана после 20-минутной подсветки светом с $\lambda > 500$ нм, кривые 1 и 3 записаны после выдерживания образца в темноте в течение 24 ч при комнатной температуре.

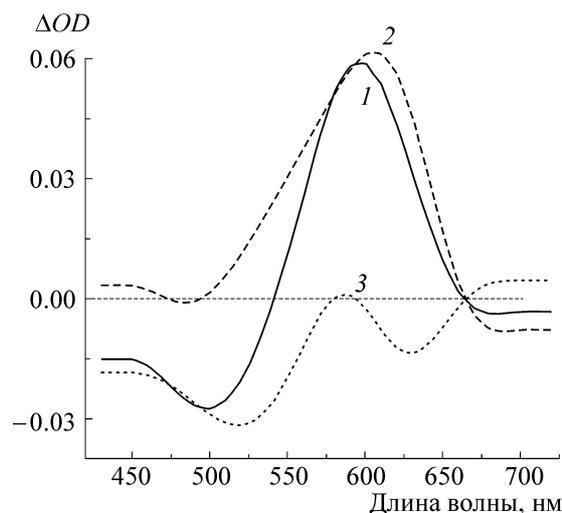


Рис. 3. Разностный спектр электронного поглощения БР: 1 – исходный (необлученный) образец (светоадаптированная форма БР568 минус темноадаптированная форма БР548); 2 – облученная темноадаптированная форма БР548 минус необлученная темноадаптированная форма БР548; 3 – необлученная светоадаптированная форма БР568 минус облученная темноадаптированная форма БР548).

характерный фотоцикл, инициируемый первоначальной изомеризацией, включающей вращение вокруг двойной C13=C14-связи. Однако перенос протона ограничен фотоциклом БР₅₆₈. Фотоцикл БР₅₄₈ не включает векторный перенос протона. Фотоцикл нативной формы БР₅₄₈ приводит к образованию БР₅₆₈, тогда как фотоцикл БР₅₆₈ приводит к восстановлению исходной формы. В результате под действием света любая смесь форм БР₅₄₈ и БР₅₆₈ приводит к светоадаптированному состоянию БР₅₆₈ (см., например, обзоры [38–41]). В адаптированном к темноте БР присутствует как БР с полосой поглощения при 548 нм, так и БР с полосой поглощения при 568 нм. В результате в темноте наблюдается суммарный спектр с полосой поглощения при 558 нм. Спектры поглощения светоадаптированной и темноадаптированной форм нативного образца, а также спектр поглощения облученного микроволнами темноадаптированного образца показаны на рис. 2. Их разностные спектры представлены на рис. 3. Разностный спектр (светоадаптированное состояние минус темноадаптированное состояние) пигмента имеет типичный вид с положительным максимумом возле 590 нм и отрицательным максимумом возле 500 нм.

Как видно, под действием СВЧ-поля темноадаптированный образец переходит в новое изомерное состояние, которое можно рассматривать как состояние, подобное светоадапти-

рованному БР (кривая 2 на рис. 3). Действительно, вместо ожидаемой гладкой кривой в разностном спектре двух темноадаптированных образцов проявляется положительный максимум большой амплитуды, подобный тому, который наблюдается в разностном спектре при световой адаптации из исходного темноадаптированного состояния БР. В то же время наблюдаемое новое изомерное состояние темноадаптированного образца не является в полном смысле светоадаптированным состоянием. Как видно, в разностном спектре между светоадаптированным и облученным темноадаптированным БР вместо гладкой кривой наблюдается два отрицательных максимума (кривая 3 на рис. 3) при 520 нм и 630 нм соответственно. Это свидетельствует об изменении не только содержания *транс*-формы в облученном образце, но также свидетельствует о появлении по крайней мере двух новых форм, изомерное состояние которых не известно.

Изменение в поглощении темноадаптированного бактериородопсина в ИК-области при воздействии микроволнами показано на рис. 4–7.

Напомним, что среди различных спектральных методов ИК-спектроскопия особенно востребована для исследования структуры бактериородопсина в ее активном центре [42]. ИК-спектроскопия связана с поглощением, которое приводит к усилению колебательных и враща-

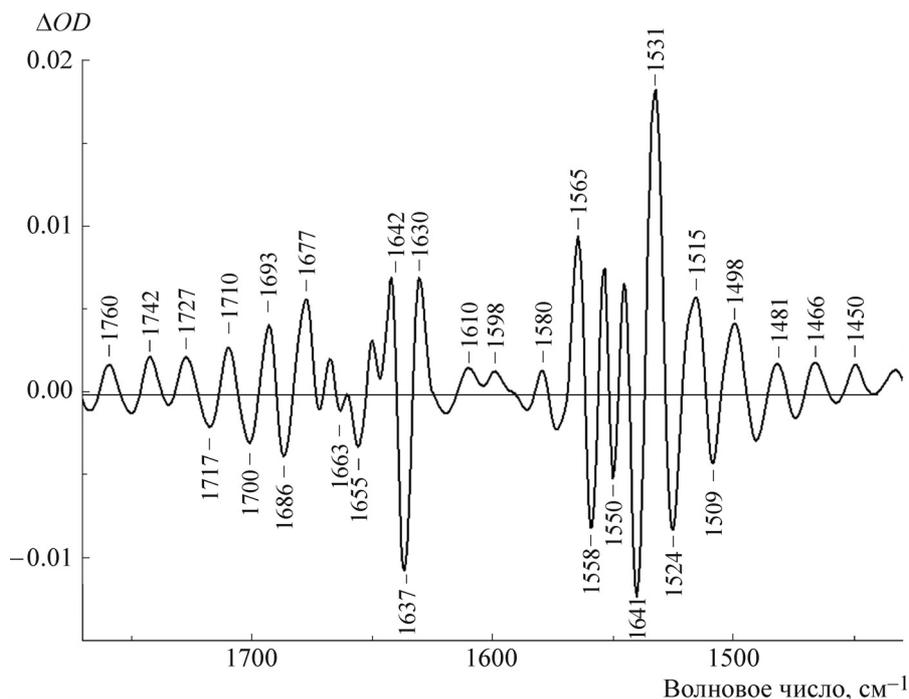


Рис. 4. Дифференциальный ИК-Фурье-спектр БР568 между облученным и необлученным образцом в спектральной области 1800–1400 см^{-1} . Спектры записаны при комнатной температуре.

тельных движений молекул [43]. Химические связи претерпевают различные формы колебаний, такие как растяжение, изгибы и вращение. Энергия большинства молекулярных колебаний соответствует энергии квантов с длиной волны 2,5–25 $\mu\text{м}$ или волновыми числами 4000–400 см^{-1} . Инфракрасные спектры белка обеспечивают огромным количеством информации о структуре и окружении белкового остова и боковых аминокислот. Поглощение в ИК-области усиливается при поляризации определенных химических связей. Следовательно, ИК-поглощение особенно высокое для сильно полярных связей, которые в бактериородопсине включают карбоксильные кислоты, Шиффово основание и колебания амидных групп белков, так же как и колебания молекул внутренней воды [42,44–46].

Исследования с помощью дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии показали, что воздействие СВЧ-частотами в диапазоне 8–18 ГГц в режиме автоматической перестройки частоты вызывало наибольшие изменения в четырех спектральных областях: 3670–3300, 2400–2300, 1780–1400 и 790–600 см^{-1} . Самые большие амплитуды наблюдались между 3600 и 3300 см^{-1} , 2400 и 230 см^{-1} и ниже 790 см^{-1} . Изменения малой амплитуды наблюдались в области между 1780 и 1400 см^{-1} , где локализованы преимущественно валентные колебания С=С-групп

хромофора (1560–1509 см^{-1}), шиффова основания (1642–1624 см^{-1}), а также белковые полосы Амид I и Амид II (1670–1550 см^{-1}). Как видно на рис. 4, в области 1780–1400 см^{-1} наблюдается целый ряд относительно интенсивных положительных и отрицательных пиков 1508(+)/1515(-), 1524(-)/1532(+)/1538(-) и 1564(+)/1559(-) см^{-1} . В литературе аналогичные полосы относят к валентным С=С-колебаниям хромофора. Положения максимумов этих полос и полос электронного поглощения проявляют линейную корреляцию вследствие того, что общей причиной сдвига полос является изменение степени делокализации электронной плотности полиеновой цепи остатка ретиналя. В колебательных спектрах комбинационного рассеяния и ИК-поглощения эти полосы имеют наибольшую интенсивность. Например, в ИК-спектре пленок БР₅₆₈ наиболее интенсивная полоса расположена возле 1528 см^{-1} , тогда как в спектре темноадаптированной формы она расположена возле 1536 см^{-1} [47,48]. В представленном разностном спектре двух темноадаптированных форм обе эти полосы присутствуют наряду с другими. Следовательно, расщепление основной полосы С=С-валентных колебаний темноадаптированного образца и наличие гетерогенности в частоте С=С-колебаний хромофора в представленном дифференциальном ИК-Фурье-спектре указывает на большую неоднородность облучен-

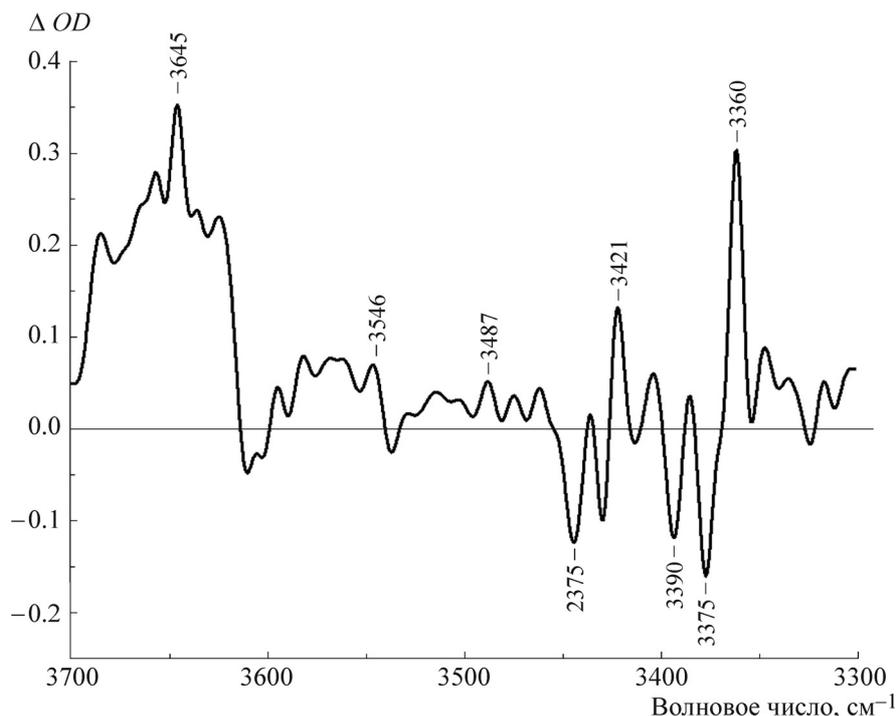


Рис. 5. Дифференциальный ИК-Фурье-спектр BR568 между облученным и необлученным образцом в спектральной области 3700–3300 см^{-1} . Спектры записаны при комнатной температуре.

ного образца. Этот вывод коррелирует с описанными выше данными, полученными с помощью оптической спектроскопии.

В области шиффоа основания также наблюдалось расщепление полосы (C=N)H-колебаний на два положительных и один отрицательный пик при 1630(+)/1637(-)/1642(+) см^{-1} . Обычно в этой области в спектрах комбинационного рассеяния и ИК-спектрах BR наблюдаются колебания, в которых принимают участие атомы, образующие связь ретиналя с белком. Ранее было установлено, что протонированному шиффову основанию в BR₅₆₈ соответствует валентное колебание C=NH⁺ при 1642 см^{-1} . В темноадаптированном состоянии это колебание проявляется при 1634 см^{-1} [47]. Как видно, в нашем случае присутствуют обе эти частоты, а также частота 1630 см^{-1} . Ранее сдвиг частоты колебания шиффоа основания в сторону 1630 см^{-1} был выявлен у формы BR₅₀₆, которая образуется при дегидратации образца BR₅₆₈ [31,49]. У этой формы после дегидратации альдиминная группа остается протонированной, а наблюдаемый сдвиг полосы в сторону 1630 см^{-1} объясняется изменением локального белкового окружения вблизи альдиминной группы [31]. К заключению о том, что микроволновое излучение воздействует локально, вызывая движение полярных или заряженных групп, можно прийти, анализируя также

и другие частоты. Так, например, в представленном спектре (рис. 4) можно видеть полосы 1692(+)/1686(-) и 1692(+)/1686(-) см^{-1} , которые обычно не наблюдаются в спектре нативного белка. Эти полосы могут быть обусловлены появлением заряженной CN₃H₃⁺-группы аргинина и/или валентными колебаниями свободной C=O-группы боковых аминокислотных остатков аспарагина (Asp) и глутамина (Gln) [50–52].

Интересно, что под воздействием микроволнового облучения в этом дифференциальном ИК-Фурье-спектре в высокочастотной области выше 1700 см^{-1} можно видеть ряд положительных полос при 1710, 1727, 1742 и 1762 см^{-1} и отрицательных полос при 1700 и 1717 см^{-1} , обусловленных валентными колебаниями протонированной C=O-группы. Как известно, в белках в этом диапазоне отсутствуют какие-либо другие ИК-полосы, и любое изменение в поглощении в этой области однозначно указывает либо на протонирование (депротонирование) карбоксильных аминокислотных остатков, либо на изменение микроокружения, влияющего на эти остатки [46]. Более того, недавно было показано, что положение частот COOH-групп в этой области находится в прямой зависимости от числа водородных связей: положение частоты в области ~1759–1776 см^{-1} , характерно для свободной COOH группы, в

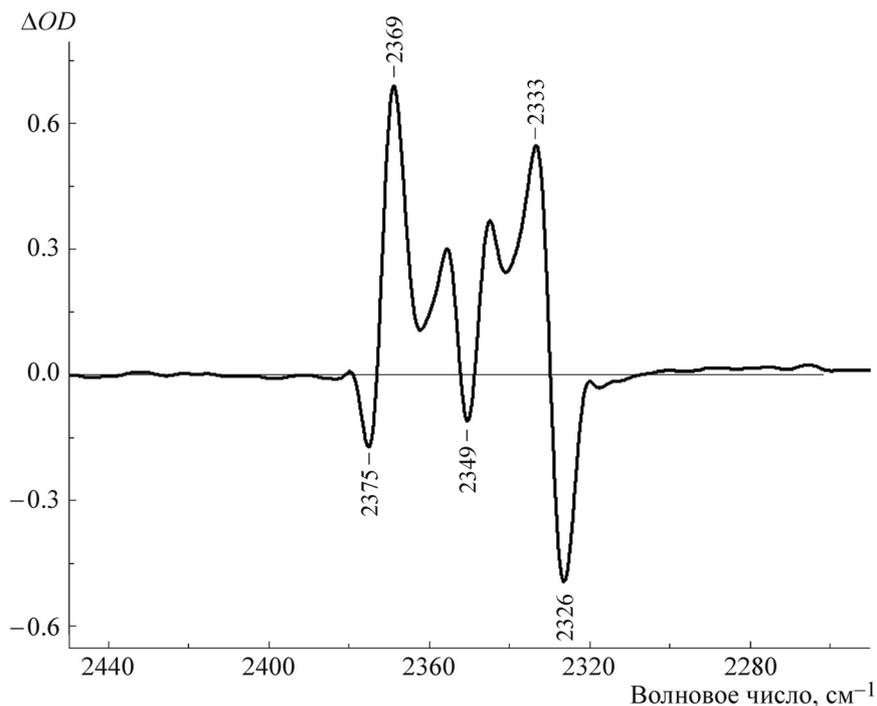


Рис. 6. То же, что на рис. 3, в области 2440–2280 cm^{-1} .

~ 1733 – 1749 cm^{-1} для одной водородной связи, и ~ 1703 – 1710 cm^{-1} для двух водородных связей [53]. Обычно в БР эти колебания возникают в результате изменений в активном центре при фотоциклировании *транс*-формы БР₅₆₈. Наиболее сильные линии в карбоксильной области принадлежат аспартатам Asp85, Asp96 и Asp112.

Таким образом, воздействие микроволн вызывает перемещение зарядов, а также перегруппировку водородных связей в активном центре БР, что, по-видимому, инициирует переход ретиналя из 13-*цис*- в полностью-*транс*-изомерное состояние, а также в другие изомерные состояния.

Со стороны полосы Амид I изменения интенсивности полос 1662 и 1655 cm^{-1} были едва заметными. В нативном состоянии α -спиральная структура БР характеризуется двумя пиками при 1662 и 1655 cm^{-1} полосы Амид I и при 1545 cm^{-1} полосы Амид II [54]. Полоса Амид I обусловлена преимущественно C=O-валентными колебаниями пептидной связи, а полоса Амид II обусловлена деформационными колебаниями, связанными с изгибом NH-связи [55, 56]. Отсутствие значительных изменений в полосе Амид I, которая обладает высокой чувствительностью к конформации белка, прежде всего указывает на то, что облучение микроволнами не влияет на спиральность белка. Не-

большие изменения в интенсивности ее полос могут быть обусловлены локальными изменениями, связанными с изомеризацией ретиналя, а также изменением в связывании водорода при взаимодействии между C=O-группой и донором водорода [57].

Дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия позволила также выявить полосы, обусловленные колебаниями молекул связанной воды внутри протонпереносящего канала, например, пик при 3645 cm^{-1} на фоне широкой положительной полосы 3680 – 3658 cm^{-1} , а также колебания триптофана Trp182 при 3486 cm^{-1} , возникающие при его взаимодействии с ретиналем [42,44] (рис. 5). К сожалению, в спектре облученного образца в области 3700 – 3300 cm^{-1} выявляется гораздо больше полос, чем те, которые описаны в литературе.

Совсем немного известно относительно колебаний в области 2400 – 2300 cm^{-1} , которые имеют самую большую амплитуду в нашем спектре. Это область, в которой отсутствуют фундаментальные белковые частоты. Спектральные изменения в области 2400 – 2000 cm^{-1} были обнаружены при использовании дейтерированной воды, в этом случае, как полагают, данные колебания связаны с водой, которая взаимодействует с отрицательными зарядами в области основания Шиффа [57–59].

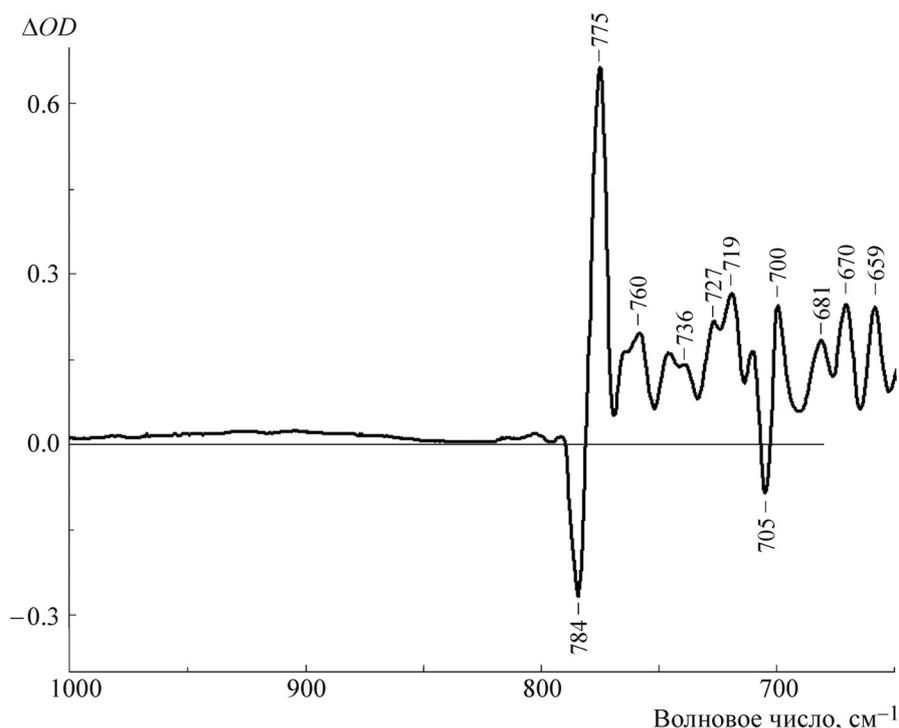


Рис. 7. То же, что на рис. 3, в области 1000–650 см⁻¹.

Не исключено, что подобные спектральные изменения могут быть также обусловлены колебаниями С=О-групп боковых аминокислотных остатков по аналогии с тем, что в этой области возле 2349 см⁻¹ присутствует одно из трех основных колебаний СО₂ [60].

Еще одна спектральная область, где воздействие микроволнами на белок проявляется наиболее сильно, – это низкочастотная область ниже 750 см⁻¹. В эту область попадают различные типы деформационных колебаний СОО⁻, СН₂-, ССN-групп разных аминокислот [61], а также амидные полосы Амид IV (625–767 см⁻¹), Амид V (640–800 см⁻¹) и Амид VI (537–606 см⁻¹), обусловленные деформационными колебаниями –ОСN-, связанными с изгибом связи, внеплоскостными деформационными колебаниями NH- и С=О-групп соответственно [55,56]. Эти колебания являются достаточно сложными. Они зависят от силовых полей, природы боковых цепей и водородных связей. В нативном белке бактериородопсине эти колебания имеют слабую интенсивность и не выявляются ни в спектрах комбинационного рассеяния, ни в ИК-спектрах, а потому практически не изучены. В нашем случае высокая интенсивность этих полос может свидетельствовать о деформациях во вторичной структуре белка, связанных с искажением отдельных связей, появлением или перемещением зарядов и/или пертурбациями в

сетке водородных связей. Очевидно, что по характеру наблюдаемых изменений в белке БР действие микроволн не связано с прогревом образца, который не влияет на изомерный состав и фотоактивность БР [18]. Для того чтобы ответить на вопрос, почему воздействие микроволн так влияет на ретиналь и полярные связи и группы, требуются дополнительные эксперименты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования, проведенные в сантиметровом диапазоне при плотности потока менее 10 мВт/см², выявили интересный специфический эффект воздействия сантиметрового излучения на структуру БР₅₆₈. Реакция белка на облучение электромагнитное излучение на частоте 8–18 ГГц в режиме автоматической перестройки частоты включала коллективное движение большого числа атомов белкового остова, хромофора, а также молекул воды в протонпереносящем канале.

Хотя мы не нашли каких-либо определенных изменений в α-спиралях и во вторичной структуре в течение облучения микроволнами, мы обнаружили в пигменте переход из одного изомерного состояния (13-цис-) в другое изомерное состояние (полностью-транс-), а также образование других отличающихся изомерных

состояний. Таким образом, в нашей работе мы наблюдали в отсутствие фотовозбуждения изомерный переход из 13-*цис*- в полностью-*транс*-состояние. С этой точки зрения излучение микроволнового диапазона можно рассматривать как принципиально новый агент, который, не вызывая непосредственных повреждений в молекуле БР, приводит к нарушению механизма регуляции световой-темновой адаптации, в частности, водородосвязанных элементов, что потенциально может стать перспективным инструментом для дальнейших фундаментальных исследований и будущих приложений в области биотехнологии и медицины

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, and W. Stoeckenius, *Biophys. J.* **15** (9), 955 (1975).
2. W. Stoeckenius, R. H. Lozier, and R. A. Bogomolni, *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 215 (1979).
3. L. A. Drachev, A. D. Kaulen, and V. P. Skulachev, *FEBS Lett.* **87** (1), 161 (1978).
4. С. П. Балашов и Ф. Ф. Литвин, *Биофизика* **26**, 557 (1981).
5. S. P. Balashov, *Isr. J. Chem.* **35**, 415 (1995).
6. B. M. Becher and J. Y. Cassim, *Prep. Biochem.* **5** (2), 161 (1975).
7. T. Kouyama, R. A. Bogomolni, and W. Stoeckenius, *Biophys. J.* **48** (2), 201 (1985).
8. P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, et al., *Biochemistry* **28** (2), 829 (1989).
9. G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (6) 1706 (1984).
10. D. L. Chen, G. Y. Wang, B. Xu, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **66** (3), 188 (2002).
11. A. Maeda, T. Iwasa, and T. Yoshizawa, *Biochemistry* **19** (16), 3825 (1980).
12. P. C. Mowery, R. H. Lozier, Q. Chae, et al., *Biochemistry* **18** (19) 4100 (1979).
13. N. A. Dencher, K. D. Kohl, and M. P. Heyn, *Biochemistry* **22** (6), 1323 (1983).
14. L. S. Brown and S. K. Chamorovsky, *Photochem. Photobiol. B: Biology* **18** (2-3), 123 (1993).
15. P. Hildebrandt and M. Stockburger, *Biochemistry* **23**, 5539 (1984).
16. M. Tsuda and T. G. Ebrey, *Biophys. J.* **30** (1), 149 (1980).
17. A. Schulte and L. Bradley, *Biophys. J.* **69** (4), 1554 (1995).
18. K. Bryl and K. Yoshihara, *Eur. Biophys. J.* **31** (7), 539 (2002).
19. R. R. Birge, D. S. K. Govender, K. Can Izgi, et al., *J. Phys. Chem.* **100** (23), 9990 (1996).
20. R. F. Cleveland and J. L. Ubase, *OET Bull.* **56**, 1 (1999).
21. H. Bohr and J. Bohr, *Phys. Rev.* **61** (4) 4310 (2000).
22. E. E. Fesenko and A. Yu. Gluvstein, *FEBS Lett.* **367**, 53 (1995).
23. R. K. Adair, *Bioelectromagnetics* **24** (1) 39 (2003).
24. E. E. Fesenko, V. I. Geletyuk, V. N. Kazachenko, et al., *FEBS Lett.* **366**, 49 (1995).
25. I. Y. Belyaev, Y. D. Alipov, and A. Y. Matronchik, *Bioelectromagnetics* **19** (5) 300 (1998).
26. A. B. Gapeev, V. S. Iakushina, N. K. Chemeris, et al., *Biofizika* **41** (1), 205 (1996).
27. A. B. Gapeev, V. S. Iakushina, N. K. Chemeris, et al., *Biofizika* **42** (5), 1125 (1997).
28. R. Goodman and A. S. Henderson, *Bioelectromagnetics* **1** (7), 23 (1986).
29. D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Methods Enzymol.* **31**, 667 (1974).
30. М. А. Берлинер, *Измерение влажности* (Энергия, М., 1973).
31. Е. Л. Терпугов, Ю. А. Лазарев и Л. Н. Чекулаева, *Молекуляр. биология* **16** (4), 8130 (1982).
32. A. A. Balashov, V. A. Vagin, A. V. Viskovatch, et al., *Proc. SPIE* **1575**, 182 (1991).
33. P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Wiley Interscience, New York, 1986).
34. A. Maeda, T. Iwasa, and T. Yoshizawa, *J. Biochem.* **82** (6), 1599 (1977).
35. K. Gerwert and F. Siebert, *EMBO J.* **5** (4), 805 (1986).
36. I. Logunov and K. Schulten, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9727 (1996).
37. I. Logunov, W. Humphrey, K. Schulten, et al., *Biophys. J.* **68** (4), 1270 (1995).
38. R. A. Mathies, S. W. Lin, J. B. Ames, et al., *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 491 (1991).
39. R. R. Birge, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1016** (3), 293 (1990).
40. D. Oesterhelt, J. Tittor, and E. Bamberg, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 181 (1992).
41. F. Gai, K. C. Hasson, J. C. McDonald, et al., *Science* **279** (5358), 1886 (1998).
42. A. Maeda, *Isr. J. Chem.* **35**, 387 (1995).
43. L. J. Bellamy, *The Infra-Red Spectra of Complex Molecules*, 3rd ed. (Halsted Press – J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1975).
44. А. Маеда, *Биохимия*, **66** (11), 1555 (2001).
45. K. J. Rothschild, *J. Bioenerg. Biomembr.* **24** (2) 147 (1992).
46. А. К. Дюмаев, *Биохимия* **66** (11), 1570 (2001).
47. S. O. Smith, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, *J. Membr. Biol.* **85** (2), 95 (1985).
48. S. O. Smith, A. B. Myers, J. A. Pardo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (7) 2055 (1984).
49. S. O. Smith, J. A. Pardo, J. Lugtenburg, et al., *J. Phys. Chem.* **91** (4), 804 (1987).
50. S. Y. Venyaminov and N. N. Kalnin, *Biopolymers* **30** (13-14), 1243 (1990).
51. Yu. N. Chirgadze and N. A. Nevskaya, *Biopolymers* **15** (4), 637 (1976).

52. Y. N. Chirgadze, O. V. Fedorov, and N. P. Trushina, *Biopolymers* **14** (4), 679 (1975).
53. B. Nie, J. Stutzman, and A. Xie, *Biophys. J.* **88** (4), 2833 (2005).
54. S. Krimm and A. M. Dwivedi, *Science* **216** (4544), 407 (1982).
55. T. Miyazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **83** (3), 712 (1961).
56. J. Bandekar, *Biochim. Biophys. Acta* **1120** (2) 123 (1992).
57. P. Hamm; M. H. Lim, and R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **102** (31), 6123 (1998).
58. H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* **1460** (1), 177 (2000).
59. H. Kandori, M. Shibata, and Y. Furutani, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4** (9), 661 (2005).
60. G. Herzberg, *Molecular Spectra and Molecular Structure. Part II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules* (Van Nostrand Comp., New York, 1945).
61. M. Wolpert and P. Hellwig, *Spectrochim. Acta Part A* **64** (4), 987 (2006).

Microwave-Induced Structural Changes in Bacteriorhodopsin: Studies by Optical and FT-IR Difference Spectroscopy

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

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

Using optical and FT-IR difference spectroscopy, it has been found that microwave radiation affects the structure of bacteriorhodopsin in films with a 30% relative humidity. This is the first study in which it has been shown that in the absence of external photo-excitation microwave radiation over the frequency range $8 \leq f \leq 18$ GHz with intensity below 10 mW/cm^2 the transition from the dark-adapted ground state of bacteriorhodopsin BR₅₆₀ to the state which is similar to light-adapted state of bacteriorhodopsin BR₅₆₈, representing a mixture of bacteriorhodopsin BR₅₆₈ and other isomeric forms, occurs. The initial response of dark-adapted bacteriorhodopsin to the microwave irradiation includes the collective motion of a large portion of protein atoms, that sends rather strong signal in the 3700–3300, 2400–2300, and 800–600 cm^{-1} regions of FT-IR difference spectra. Relatively weak amplitude responses were revealed in the frequency range characteristics of the retinal chromophore and amide bands (Amide I and Amide II). These effects were determined in response to changes in the retinal chromophore structure and the local change in the microenvironment around the chromophore.

Keywords: bacteriorhodopsin, dark-light adaptation, optical spectroscopy, FT-IR difference spectroscopy, microwave radiation, biological effect