

**Fotoaktív flavoproteinek funkcionális fehérjedinamikájának vizsgálata
ultragyors spektroszkópai módszerekkel**

MTA Doktori értekezés tézisei

Lukács András



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2023

Tartalom

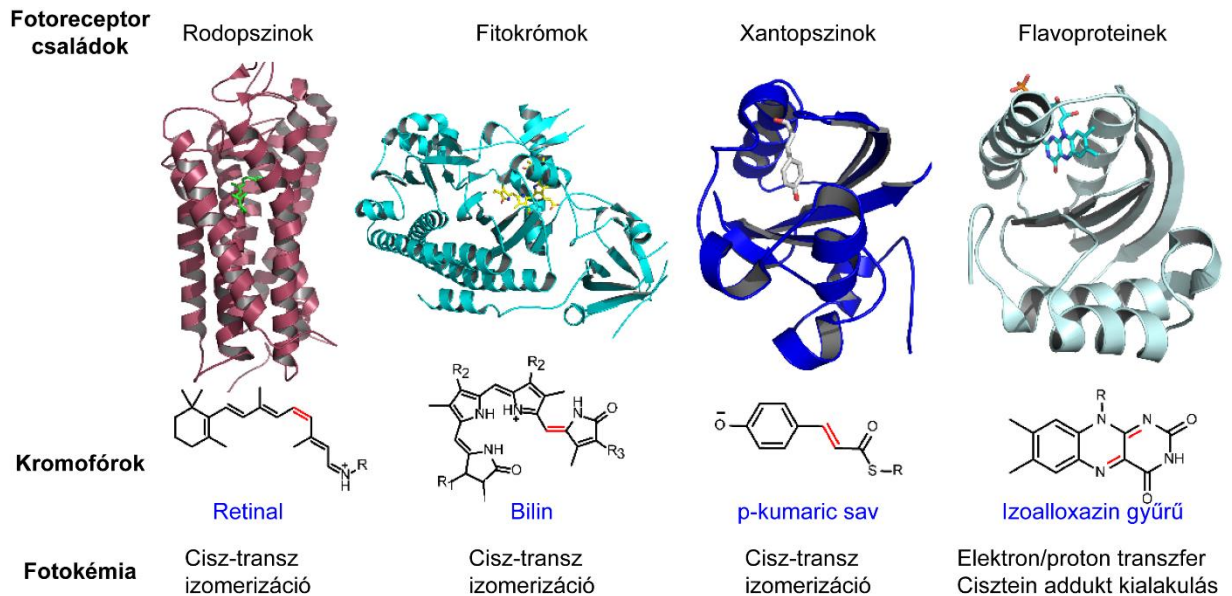
1. Bevezetés	3
<i>BLUF domén fehérjék</i>	5
<i>Fotoliázok és kriptokrómok</i>	5
Célkitűzések	7
2. Módszerek és eszközök.....	9
2.1 Tranziens abszorpciós spektroszkópai rendszer.....	10
2.2 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia.....	14
2.3 Infravörös tranziens abszorpciós spektroszkópia	15
3. Új tudományos eredmények.....	17
3.1 A fehérjemátrix ultragyors strukturális változásai az AppA esetében	17
3.2 Tirozin gyökök vibrációs markereinek azonosítása	19
3.3 Tirozin és triptofán gyökök azonosítása glükóz oxidázban.....	23
3.4 Fotoaktiváció triptofán nanodrótton keresztül.....	29
3.5 Miért különbözik a fotoliázok és kriptokrómok funkciója?	32
3.6 Az AppA funkciója nem függ az elektron transzfertől.....	40
3.7 Az OaPAC funkcionális dinamikájának vizsgálata.....	46
<i>Proton-kapcsolt elektron transzfer</i>	46
<i>Az OaPAC fotociklusának vizsgálata fluorotirozin analógok segítségével</i>	53
6. Irodalomjegyzék	59

1. Bevezetés

Az élő szervezetek széles körében játszik fontos szerepet a fény érzékelése, vagy azért, hogy energiaforrásként használja, vagy azért, hogy elkerülje káros hatásait. Az elmúlt évtizedekben számos fotoreceptort fedeztek fel, amelyek közül talán a leghíresebbek a retinában található fotoreceptorok, a rodopszinok.^{1,2} A közelmúltban számos új fotoreceptort fedeztek fel. Néhány esetben, mint például a fotoaktív sárga fehérje, a fény érzékelése a rodopszin fotoizomerizációjához hasonló módon a gerjesztett állapotban végbemenő szerkezetváltozástól függ.^{3,4} Sok más receptorban azonban a flavin adenin-dinukleotid (FAD) vagy a flavin-mononukleotid (FMN) kék fényt elnyelő izoalloaxazin gyűrűje működik kromofórként.⁵⁻⁹

A fotoreceptorok iránti érdeklődés jelentősen növekedett az elmúlt években, ezek a fotoaktív fehérjék ugyanis kiválóan alkalmazhatók az *optogenetika* vagy általánosabban az *optobiológia* újonnan kialakulóban lévő területén.¹⁰⁻¹²

Az 1.1 ábrán a legismertebb fotoreceptor családok néhány tagja látható, rodopszinok, fitokrómok, xantofinok és flavoproteinek. Míg az első három esetben a fény érzékelése a kromofórban bekövetkező cisz-transz izomerizációt követően valósul meg, a flavoproteinek esetében ez legalább három különböző módon történik.



1.1 ábra A legismertebb fotoreceptorok és a funkció alapját képező mechanizmus. Míg az első három család esetében a funkció elsődleges lépése a cisz-transz izomerizáció, a flavoproteinek esetében ez több fajta is lehet.

Az egyik legismertebb ilyen jelenség, amely segítségével a kék fény érzékelése történik a fotoliáz/kriptokróm családban megfigyelt elektron transzfer folyamat, amelynek során a foton abszorpciót követően a fehérjéhez hidrogén kötésekkel kötött flavin adenin dinukleotid (FAD) egy triptofán hármastól (egy esetben négyes) kap egy elektront és ez valósítja meg a fehérje funkcióját¹³, amely lehet DNS javítás, a cirkadián ritmus szabályozása vagy a föld mágneses terének érzékelése^{14,15}.

Gyökeresen más mechanizmus figyelhető meg a növények fototropizmusában – vagyis a fény irányába való fordulás, és növekedés – részt vevő flavoproteinek az úgynevezett LOV (light-oxygen-voltage) esetében. Ezek a fehérjékben a fényabszorpciót követően a flavin (ez esetben FMN) először triplétt állapotba kerül, majd ezt követően a C4-es atomja és egy közeli cisztein között kovalens kötés jön létre, amely a fehérjében egy konformációs változást indít el. A LOV fehérjének ezt a tulajdonságát használják ki az optogenetikai alkalmazások során^{8,16}. A fényabszorpciót követően létrejött cisztein addukt idővel megszűnik és a fehérje visszakerül az úgynevezett sötét állapotába, a visszatérésnek a gyorsasága organismusonként nagyon változó, lehet néhány perc, de akár közel egy nap is.¹⁷

Egy megint teljesen különböző folyamat figyelhető meg az úgynevezett BLUF domén fehérjék esetében, ahol a fehérje funkciója a flavin körüli hidrogénkötés-rendszer gerjesztést követő átrendeződésének köszönhető. Az elmúlt években mindhárom fehérjecsalád tulajdonságait intenzíven vizsgáltuk, de ebben a munkában területi okokból elsősorban a BLUF domén fehérjéken és a fotoliázokon végzett kísérleteket és a kapott eredményeket kívánom bemutatni.

BLUF domén fehérjék

A fotoaktív flavoptoteinek kiterjedt családját alkotják a BLUF domén fehérjék, ahol az elnevezés (BLUF = blue light sensing using FAD) arra utal, hogy a kék fény érzékelése az FAD-ot tartalmazó domén segítségével valósul meg. A BLUF domén fehérjék funkciója organizmusonként különböző: az *Euglena gracilis* nevű ostoros egysejtű fény hatására megváltoztatja az irányát, a PixD nevű fehérje pedig szintén egy BLUF domén segítségével valósítja meg a fototaxist cianobaktériumokban.

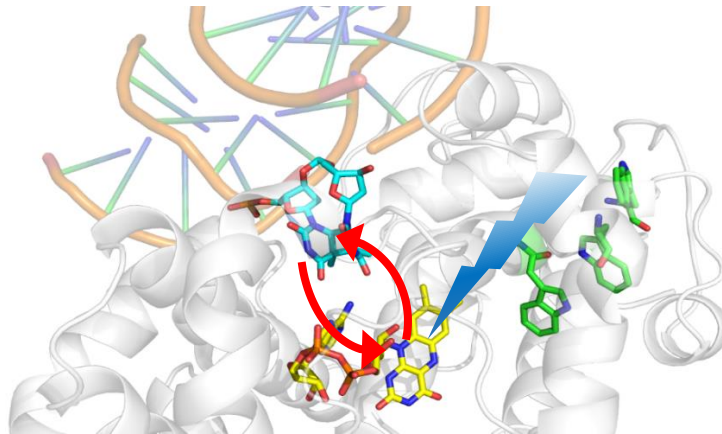
A BLUF domén fehérjék esetében a funkciót megvalósító fotokémiai folyamat sok esetben nem teljesen tisztázott. Konszenzus van abban, hogy az kék foton abszorpcióját követően a flavint körülvevő aminosavak flavinnal alkotott hidrogénkötés-rendszere átalakul (ennek köszönhető a FAD abszorpciós maximumának vörös eltolódása) és ez indítja el a nagyobb strukturális átrendeződést. Mivel ezzel párhuzamosan több esetben is fotoindukált elektron transzfer folyamatot is megfigyeltek, felmerült annak a lehetősége is, hogy maga az elektron transzfer is szükséges a BLUF domén fehérjék funkciójának megvalósításához.

Fotoliázok és kriptokrómok

A fotoaktív flavoproteinek harmadik nagy csoportját alkotja a fotoliáz/kriptokróm család, amelyben a fehérje funkció a flavin és a környezetében található triptofán vagy tirozin között lezajló elektron transzfer következtében valósul meg. A fehérjecsalád ismertebb tagja a fotoliáz, amelyet Claude Rupert még 1958-ban fedezett fel és megállapította, hogy az enzim az UV indukált DNS hibákat javítja fény-indukált módon¹⁸.

A fotoliáz működésének megértésében Aziz Sancar nyolcvanas években végzett kísérletei játszottak döntő szerepet, aki kimutatta, hogy a javítás fényindukált elektron transzfer hatására

valószínűleg meg. Az általa végzett kísérletek arra engedtek következtetni, hogy a fotoliáz a fényabszorpciót követően felhasítja az UV fény által létrehozott pirimidin dimereket. E mögött egy elegáns molekuláris folyamat áll: a fényabszorpciót követően a flavin kofaktorról egy elektron „ugrik” a pirimidin dimerre, aminek következtében a kötés felhasad – vagyis a DNS szál javítása megtörténik – majd az elektron visszakerül a flavinra (lásd az alábbi ábrán).



1.2 ábra A fotoliáz javítási mechanizmusa: a fényabszorpciót követően a flavinról egy elektron ugrik a ciklobután pirimidin dimerre, aminek következtében a kötés felhasad. Ezt követően az elektron visszakerül az izoalloxazin gyűrűre. (forrás: Pavel Müller, személyes közlés)

A javítási folyamat fontos feltétele, hogy a flavin kofaktor (FAD) teljesen redukált (FADH^-) állapotban legyen. A fotoliázban, az expresszálat és tisztítást követően azonban az FAD félig redukált (FADH^\bullet) állapotban van. Klaus Brettel és Marten Vos kollégáim az ezredfordulón fedezték fel, hogy látható fény hatására a flavin teljesen redukálódik, méghozzá egy elektrontranszfer segítségével, amelyben három közeli triptofán vesz részt¹⁹.

Fiziológiás körülmények között a fotoliázban erre a folyamatra nem biztos, hogy sor kerül, az általunk leírt jelenségnek azonban a kriptokrómokban van kiemelkedő szerepe. A kriptokrómok ugyanis olyan a fotoliázokkal homológ fehérjék, amelyek nem képesek a DNS szál javítására. Az általunk karakterizált triptofán lánc (vagy nanodrót) viszont az összes kriptokrómban jól konzervált és kulcsszerepet játszik a fehérje működésében.

Célkitűzések

Jelen dolgozatban három fotoaktív flavoproteinben (AppA, fotoliáz, OaPAC) vizsgáltam a fehérje működését meghatározó folyamatokat. Ennek során a következő kérdésekre kerestem a választ.

1. BLUF domén fehérjék esetében milyen strukturális változások valósulnak meg a flavin környezetében a kék foton abszorpciót követően és a strukturális változások hogyan vezetnek a fehérje működéséhez szükséges konformációs változásokhoz?

Az AppA működése kapcsán abban alakult ki konszenzus, hogy fény és oxigén hiányában az AppA komplexet alkot a PpsR nevű transzkripció faktorral. A fényabszorpciót követően az AppA-ban olyan konformációs változás következik be, amelynek következtében a komplex disszociálódik. Munkánk során azt szerettük volna feltérképezni, hogy melyek azok az elsődleges lépések, amelyek ehhez a konformációs változáshoz vezetnek.

2. Az elektron transzfer szerepe az AppA funkciójában

Az AppA működésének leírásakor több csoport, más BLUF domén fehérjék esetében megfigyelt jelenségek alapján, azt a javaslatot tette, hogy a kék foton abszorpcióját követően elektron transzfer következik be és végső soron ez valósítja meg a fehérje funkcióját. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy megvalósul-e és mi a szerepe az elektron transzfernek az AppA fotoaktivációja során.

3. A flavin és aminosav gyökök spektrális és vibrációs markereinek meghatározása

Az elektron transzfer következtében átmenetileg flavin és aminosav (többnyire triptofán és tirozin) gyökök jönnek létre a flavoproteinekben. Ezek spektrális és vibrációs markereinek a meghatározása segíthet az elektron transzfer folyamat lépéseinek nyomon követésében. Ennek érdekében célul tűztük ki FAD anion és semleges gyökeinek, valamint a triptofán és tirozin kation és semleges gyökeinek vibrációs módusainak a meghatározását.

4. A fotoaktiváció folyamatának leírása fotoliázban.

E. coli fotoliázban a fényabszorpciót követően a FAD egy elektron transzfer kaszkád folyamaton keresztül redukálódik; ezt a folyamatot neveztük el fotoaktivációnak, mert ezáltal kerül az enzim a DNS javításra alkalmas aktív állapotába. A fotoliáz esetében a fotoredukció folyamatának leírását tűztük ki célul, azokat a lépéseket a karakterizálását, amelynek során a FAD közelében található triptofán hármas, egyfajta nanodrótként játszik szerepet az elektron transzfer folyamatában.

5. Mi a különbség a fotoliázok és a kriptokrómok között?

A fotoliázok és a kriptokrómok nagy fokú homológiát mutatnak: mindkettő esetében megtalálható a FAD és a triptofán hármas, ennek ellenére a két fehérje fotofizikája és funkciója is különbözik. A szerkezeti hasonlóság ellenére megvalósuló funkcionális különbség miatt célul tűztük ki, hogy megtaláljuk ezeknek a különbségeknek az okát, valamint azt, hogy a fotoliázot kriptokrómmá alakítsuk.

6. OaPAC funkcionális dinamikájának karakterizálása

Az OaPAC egy a közelmúltban az *Oscillatoria acuminata* cianobaktériumban felfedezett fotoaktiválható adenilát cikláz, amelynek az N-terminálisánál egy BLUF domén a C-terminálisánál pedig egy AC domén helyezkedik el. Célunk azoknak a fotofizikai és strukturális folyamatoknak a meghatározása, amelynek során a BLUF domén által megvalósított fotoabszorpció az AC domén által megvalósított ATP-cAMP konverzióhoz vezet.

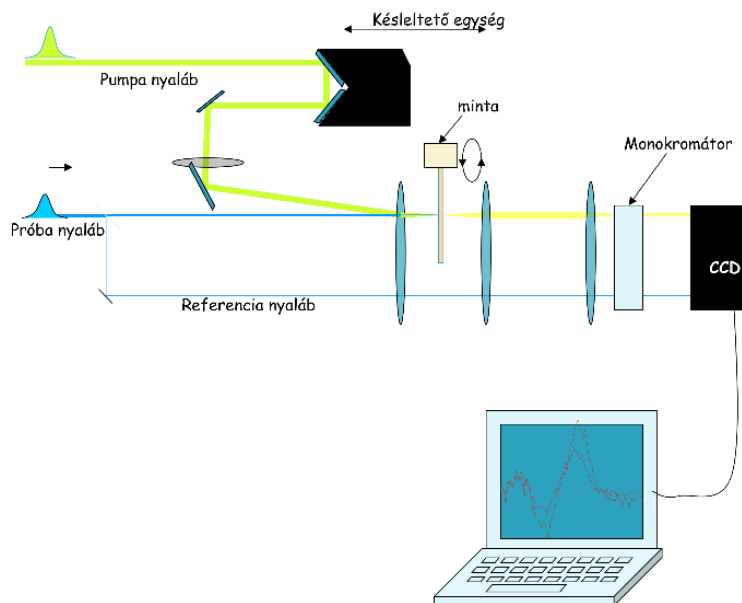
2. Módszerek és eszközök

Tekintettel arra, hogy a fényelnyelést követő molekuláris folyamatok első lépései nagyon rövid idő alatt (femto- és pikoszekundum) valósulnak meg, vizsgálatainkhoz ultragyors, úgynevezett femtoszekundumos lézereket – az impulzushossz tízezerszer rövidebb, mint a másodperc milliárdod része – kell használnunk. Ez érthető, ha arra gondolunk, hogy ha egy gyorsan mozgó tárgyról akarunk fényképet készíteni, akkor a zársebességnek nagyon rövidnek kell lennie, hogy a kép ne legyen elmosódott.

Az ultragyors spektroszkópia során a fényképezőgép szerepét egy úgynevezett próba impulzus játssza; minél rövidebb ez az impulzus annál rövidebb molekuláris folyamatokat vagyunk képesek megfigyelni. Fotoaktív fehérjékről lévén szó a mérésekhez szükségünk van egy úgynevezett pumpa impulzusra is, ez indítja el a fényaktivált folyamatokat. A mérőrendszer a pumpa – egyben gerjesztő – impulzus elindítása után bizonyos időközönként készít felvételt – abszorpciót mér például – a molekuláról a próba impulzus segítségével. Tekintettel arra, hogy nagyon rövid időskáláról (femtoszekundum-pikoszekundum) van szó, a pumpa és a próba impulzus közötti késleltetést nem lehet elektronikusan kontrollálni. Ennek a problémának a kiküszöbölésére egy pontosan állítható mozgatható tükörrendszert alkalmazunk, a fénysebesség ismeretében ugyanis könnyen kiszámolható, hogy a pumpa és a próba impulzus beérkezése között mennyi idő telt el, ha ismerjük az impulzusok által megtett távolságot. A mérések során tehát ezt a távolságot folyamatosan növelve a próbaimpulzus segítségével számos „pillanatfelvételt” készítünk, amelyekből összeáll végül a molekuláris mozi.

2.1 Tranziens abszorpciós spektroszkópai rendszer

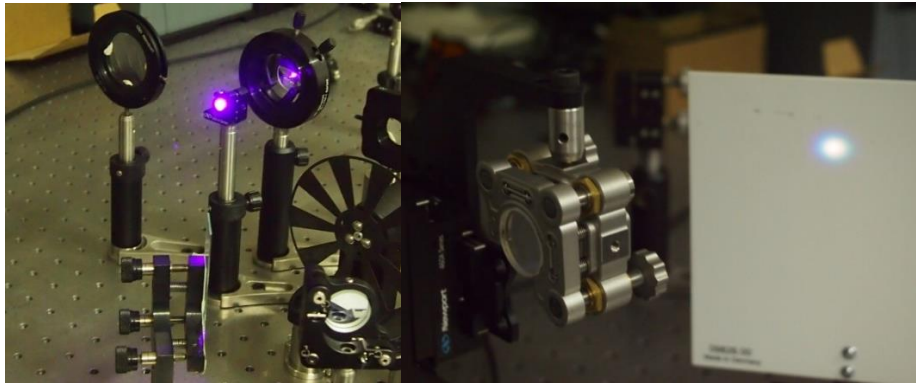
A tranziens abszorpciós pumpa-próba rendszer alapelve könnyen megérthető a következő ábrából: a gerjesztő pumpa impulzust követően, a mintát meghatározott időpontokban, úgynevezett próbaimpulzusokkal világítjuk meg, és detektáljuk a minta transzmisszióját. A pumpa és a próba impulzus között eltelt időt egy léptetőegységre szerelt tükörrendszerrel állítjuk be. Az általunk használt Newport (M-UTM150CC.1) transzlátor 1 μm -es pontoságú lépésekre képes, amely 3.3 fs-os késleltetést tesz lehetővé. A vázolt tranziens abszorpciós berendezés időbeli felbontását azonban nem a léptetőegység pontossága, hanem a lézer impulzushossza szabja meg, az általunk használt Spitfire Ace regeneratív erősítő által létrehozott impulzusok hossza 100 fs, ez tehát a rendszer végső felbontása. Az abszorpcióváltozás kiszámításához két mérési adatra van szükségünk: a próbaimpulzus transzmissziójára abban az esetben, ha volt pumpa impulzus és abban az esetben, ha nem volt.



2.1 ábra A tranziens abszorpciós rendszer sematikus elrendezése: a késleltető egység mozgatásával növeljük a pumpa és próba impulzus között eltelt időt.

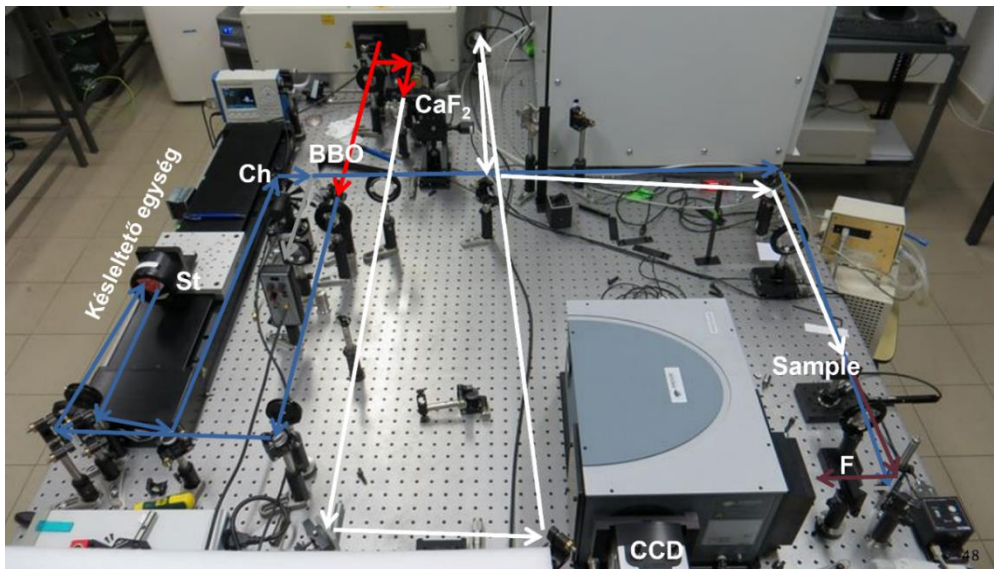
A pumpa impulzus a méréseink túlnyomó részében egy 400 nm-es 0.5-1 μJ energiájú 100 fs-os impulzus volt. Ezt az impulzust a regeneratív erősítóből kijövő 800 nm-es impulzusnak egy β -bárium borát (BBO) kristályban való frekvenciakétszerezésével érték el (lásd **2.2 ábra**).

A próba impulzust egy fehér fény kontinuum szolgáltatta, amelynek megvalósítása során az optikai Kerr-effektus következményét, az önfázis-moduláció jelenségét használtuk ki.



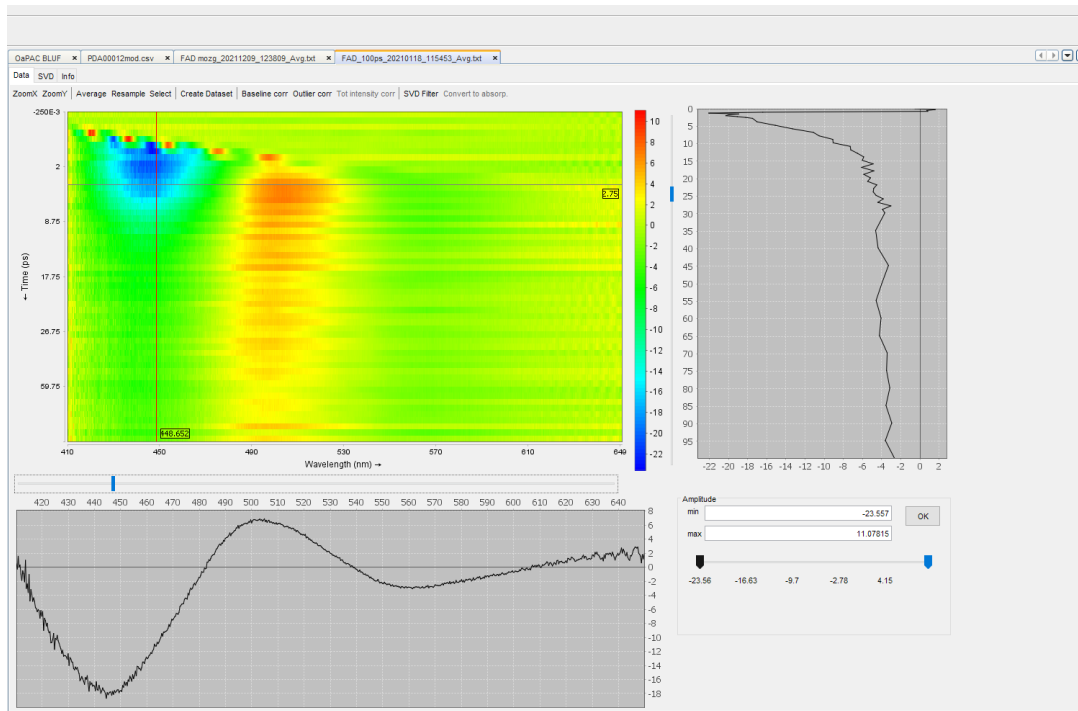
2.2 ábra A) Frekvenciakészerezés (SHG) 2mm-es vastagságú BBO kristályban B) Fehér fény kontinuum előállítása CaF_2 kristályban

A próba impulzust az esetek túlnyomó részében 2 mm vastag CaF_2 kristály segítségével állítottuk elő. A fehér fény kontinuum ugyanis szinte bármilyen anyagban megvalósítható – még vízben is – de leggyakrabban zafír kristályt alkalmaznak annak kedvező termális tulajdonságai miatt. A zafír esetében azonban a keltett kontinuum spektruma az 500-800 nm közötti tartományra korlátozódik. A flavoproteinek esetében a 400 és 500 nm közötti tartomány különösen fontos (mivel 450 nm körül van az egyik abszorpciós maximum) ezért inkább CaF_2 kristályt használtunk a próba impulzus létrehozásához. A CaF_2 kristály kedvező tulajdonsága ugyanis, hogy a keltett fehér fény kontinuum 400-800 nm tartományra terjeszthető ki, komoly hátránya azonban – például a zafírral szemben – hogy hővezetési tulajdonsága kedvezőtlen, ezért folyamatosan mozgatni kell.



2.3 ábra A Biofizikai Intézetben működő tranziens abszorpciós rendszer. Az erősítóből kilépő nyalábot egy nyalábosztóval (90:10) két részre osztjuk. Az intenzívebb nyalábot a BBO kristályba vezetjük, a kevésbé intenzív nyaláb segítségével valósul meg a fehér fény kontinuum keltés a CaF_2 kristályban

A tranziens abszorpciós mérések esetében a mintát többnyire 1 vagy 2 mm-es küvettába helyezünk, ezzel kerülve el az impulzushossz jelentős megnyúlását. 100 fs-os impulzus esetén az impulzushossz még a 2 mm-es küvetta esetében sem nyúlik meg jelentősen (nem éri el a 110 fs-ot) így méréseink során legtöbbször 2 mm-es küvettát használtunk a nagyobb abszorpció elérése érdekében. Tekintettel arra, hogy a mintáink a legtöbb esetben érzékenyek a gerjesztő impulzusra ezért a küvettát mozgatni kell. Erre több megoldást dolgoztunk ki: van egy elliptikus pályát leíró, hűthető mozgó egység, valamint egy két tengelyből álló Lissajoux mozgó is.



2.4 Ábra FAD abszorpcióváltozása 0-100 ps tartományban. A két dimenziós adat alatt a 2.75 ps-nál mért spektrum, jobboldalon pedig a kiválasztott 448 nm hullámhossznál mért kinetika látható.

A **2.4 ábrán** látható spektrum a FAD abszorpció változás a gerjesztést követően. A spektrum jól láthatóan három részre tagolódik:

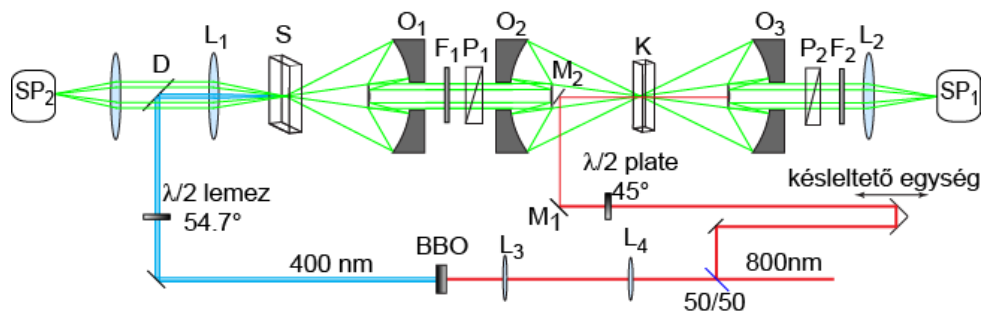
- A 450 nm körül megfigyelhető negatív abszorpcióváltozás az úgynevezett kifehéredés vagy „bleaching”. Ez a jelenség azoknál a hullámhosszaknál figyelhető meg, ahol a mintának abszorpciós csúcsa van. Mivel a gerjesztés következtében egy jelentős elektron populáció gerjesztett állapotban van, ezért ezen hullámhosszak esetében több fény jut a detektorra, mint gerjesztés előtt. Mivel ilyen módon a transzmittált fényintenzitás nő, ezért az abszorpcióváltozás negatív. Ha ennek a csúcsnak a kinetikáját figyeljük, akkor választ kapunk arra, hogy milyen hamar tér vissza alapállapotba a gerjesztett rendszer.
- 500 nm körül figyelhető meg a fotoindukált abszorpció vagy gerjesztett állapotú abszorpció („excited state absorption”, ESA). Ez esetben, a gerjesztett állapotban a minta abszorbeál, ennek megfelelően a mintán kevesebb fény megy át, a mért abszorpcióváltozás ezúttal tehát pozitív.
- 560 nm körül figyelhető meg az úgynevezett stimulált emisszió. A gerjesztett állapotban lévő mintából a próba impulzus hatására fotonok lépnek ki, ennek megfelelően a transzmisszió nagyobb, mint a gerjesztést megelőzően, vagyis a mért abszorpcióváltozás ezúttal is negatív. A stimulált emisszió spektrálisan abban a tartományban figyelhető meg, ahol a fluoreszcencia is.

Ennek megfelelően stimulált emisszió esetében mért kinetika azonos lesz a fluoreszcencia lecsengés kinetikájával.

2.2 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia

A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia az optikai Kerr-effektusra épül, amelyet röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy nagy intenzitású lézerpulzus hatására az adott anyag elforgatja a polarizált fény polarizációs síkját. Ez a hatás az adott anyagtól függ; nagyon erős Kerr-effektus figyelhető meg például CS_2 -ben, vagy benzolban, de ennél jóval gyengébb az elforgatás mértéke például üvegben.

A berendezés működésének elve látható a **2.5 ábrán**: a lézerezősítóből kijövő lézernyalábot 50/50 % arányban osztjuk meg. Az egyik része átmegy egy BBO kristályon, amelyben megvalósul a frekvenciakétszerezés. Ez szolgál majd az S küvettában található minta gerjesztéséhez. A keletkező fluoreszcencia két Cassegrain-objektíven keresztül áthaladva jut a K-val jelölt Kerr-ablakhoz, ami lehet benzol, CS_2 vagy Suprasil üveg. A Cassegrain objektív azért volt hasznos ebben az elrendezésben, mert hatékonyan gyűjti be a fluoreszcens fényt, amelyet párhuzamosít, a következő a Cassegrain objektívvel pedig hatékonyan tudtuk lefókuszálni a fluoreszcens nyalábot a Kerr-kapura. Mivel a P1 és P2 polarizátorok keresztállásban vannak, a fluoreszcencia csak akkor halad át a P2-es polarizátoron, ha létrejön a Kerr-effektus, azaz ha a Kerr-kapu az intenzív lézernyaláb hatására kinyílik. A lézerpulzus okozta Kerr-hatás következtében az áthaladó fény elliptikusan polarizálttá válik, így egy része áthalad a P2-es polarizátoron, ezt a fényt gyűjtjük be az O₃-as Cassegrain objektívvel. A mérés során a késleltető egység mozgatásával szabályozzuk, azt, hogy a Kerr-kapu mikor „nyisson” ki a gerjesztő impulzushoz képest.

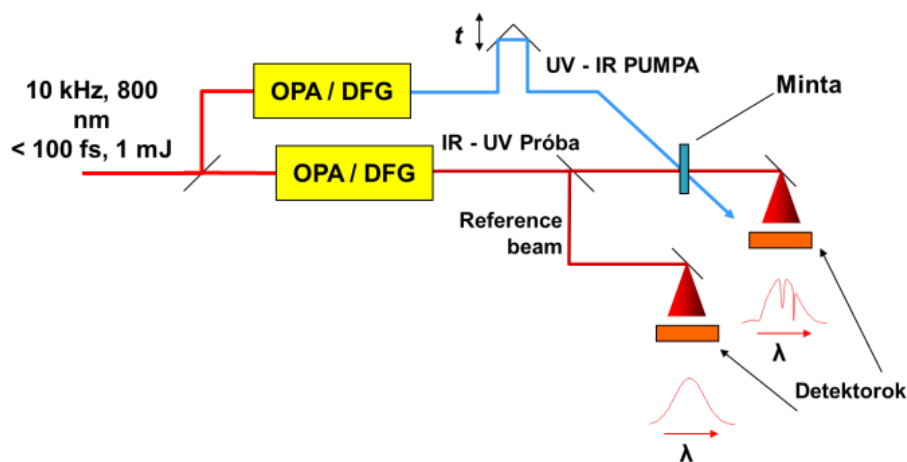


2.5 ábra: Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiai berendezés elvi rajza

2.3 Infravörös tranziens abszorpciós spektroszkópia

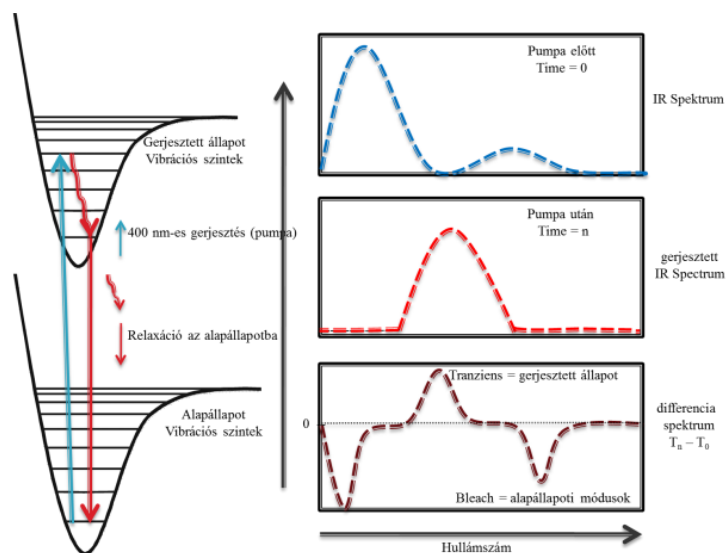
Az dolgozatban bemutatott mérések egy jelentős részét a Ruherford Appleton Laboratory, Central Laser Facility Lasers for Sciences nevű kutatóintézet ULTRA nevű berendezésén végeztük el²⁰. Az ULTRA központi eleme egy 10 kHz-es ismétlési frekvenciával működő lézer a francia Thales nevű cégtől, amely 100 femtoszekundumos hosszúságú és 1 mJ energiájú impulzusokat bocsát ki. A pumpa és próba impulzusokat a litván Light Conversion nevű cég frekvencia konvertáló berendezése (OPA= Optical Parametric Amplifier) hozza létre. A detektálás két egyenként 256 pixellel rendelkező higany-kadmium-tellurium (MCdTe) detektor segítségével valósul meg; ez a rendszer legköltségesebb része. Egy pixel felbontása körülbelül 3 cm^{-1} -nak felel meg.

A tranziens infravörös abszorpciós rendszer elve működési elve nagy mértékben hasonlít a látható tartományban működő tranziens abszorpciós rendszerhez. Alapesetben a Thales lézert használtuk a pumpa és a próbaimpulzusok előállításához egyaránt, a méréseink túlnyomó részében 450 nm-es pumpaimpulzust és egy $\sim 6500 \text{ nm}$ -re centrált próbaimpulzust használtunk. A késleltetést ebben az esetben is egy gyors Newport delay stage és egy retroreflektor segítségével valósítottuk meg. A vizsgált időtartományt ennek megfelelően a delay stage hossza határozta meg, és 3 ns-nak adódott.



2.7 ábra A tranziens infravörös abszorpciós spektroszkópiai rendszer egy úgynevezett pumpa-próba módszer, vagyis először gerjesztjük (ez a pumpa) a mintát, majd egyre növekvő késleltetéssel világítjuk át a próba nyalábbal. Ez alapján idő függvényében számolható az abszorpcióváltozás. (forrás: Greg Greetham, személyes közlés)

A spektrum alakját illetően az **2.8 ábra** ad eligazodást: azok a csúcsok, ahol a mintának volt abszorpciója a gerjesztést megelőzően is, negatív előjellel jelennek meg a spektrumban (ezeket a szaknyelv „bleach”-ként nevezi), azok a csúcsok viszont, amelyek a gerjesztést követően jöttek létre pozitívak lesznek (ez utóbbiakat tranzienseknek vagy indukált abszorpciónak hívjuk).



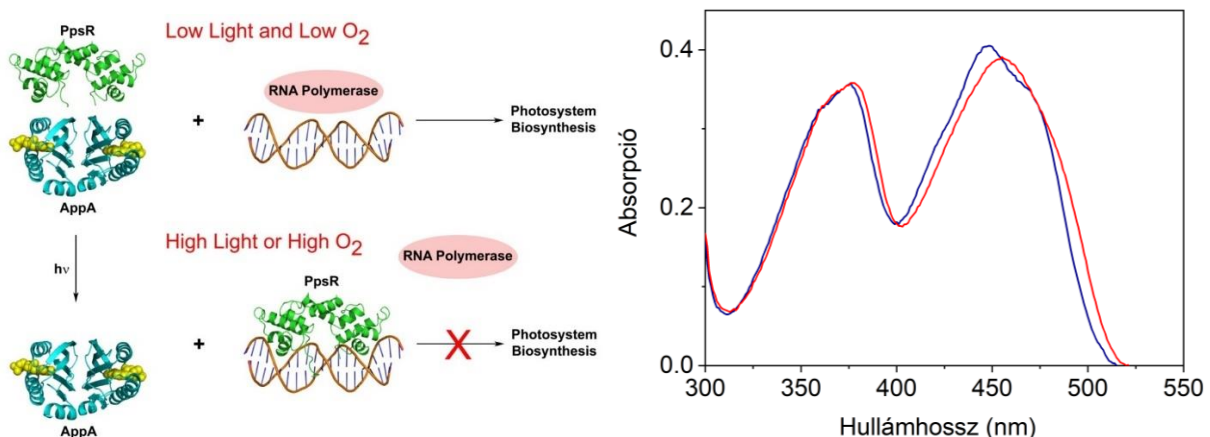
2.8 ábra Az infravörös abszorpcióváltozás modellje

3. Új tudományos eredmények

3.1 A fehérjemátrix ultragyors strukturális változásai az AppA esetében

A BLUF domén fehérjék számos organizmusban léteznek, a szekvenált baktériumok 10 százaléka rendelkezik BLUF doménnel, de csak kevés esetben ismert a funkciójuk⁷.

A BLUF domének felfedezésére 2002-ben került sor, amikor rögtön két organizmusban, az *Euglena gracilis* nevű egyszeltes ostorosban illetve *Rhodobacter sphaeroides* nevű fotoszintetikus baktériumban azonosították ezeket a flavint tartalmazó fotoaktív fehérjéket⁶. Az *Euglena* esetében a fényelkerüléséért felelős organelumban találtak egy BLUF domén típusú fehérjét (PAC- α/β) hetero-tetramer formában. Ugyanebben az évben fedezték fel azt, hogy a *Rhodobacter sphaeroides*-ben található AppA nevű fehérje felelős a fotoszintetikus gének expressziójáért. Az már korábban ismert volt, hogy kék fény hatására erőteljesen csökken a *Rhodobacter sphaeroides*-ben a fotorendszer szintézise, ez pedig egy kék fényt érzékelő fehérje létezésére utalt. Mint később kiderült ez a fehérje az AppA (Activation of Photopigment and puc expression A), amelyik az N-terminálisnál egy flavint (FAD) köt. Úttörő kísérleteik során két kutatócsoport bebizonyította, hogy a kék fény hatására az AppA konformációja megváltozik és az AppA-PpsR komplex disszociálódik, ahol ez utóbbi egy transzkripcionális represszor²¹.

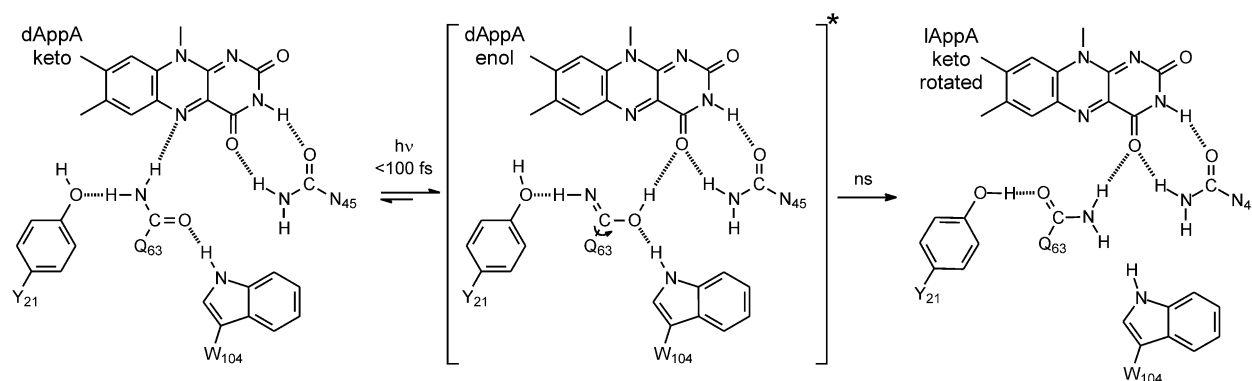


3.1 ábra A bal oldali ábrán az AppA működése látható: kék fény hatására az AppA-PpsR komplex disszociálódik (forrás: Peter J. Tonge, személyes közlés). A jobb oldali ábrán a vad típusú AppA abszorpciós spektruma látható sötét (kék) és világos (vörös) állapotban. Jól megfigyelhető, hogy világos állapotban a flavin 450 nm körüli csúcsa mintegy 10 nm-rel a hosszabb hullámhosszak fele tolódik.

Az elsődleges és a mai napig megválaszolatlan kérdés, hogy mi történik a FAD környezetében a kék foton abszorpcióját követően, illetve mi az a mechanizmus, amely a konformációváltást elindítja. Tizenöt év kiterjedt kutatást követően is gyakorlatilag ugyanaz a három modell vetélkedik egymással. Az első modell szerint – amelyik az Anderson-féle röntgenkristallográfiás szerkezetet²² fogadta el szerint – a közeli glutamin (az AppA esetében Q63) 180 fokkal elfordul. A másik modell szerint a megvilágítást követően közvetlen proton transzferre kerül sor: a közeli tirozin (AppA esetében Y21) egy protont kölcsönöz a glutaminnak. A harmadik modell szerint a FAD közeli hidrogénkötés-rendszer a glutaminban lejátszódó keto-enol tautomerizáció hatására valósul meg.

A hidrogénkötés-rendszer átrendeződésének tanulmányozása érdekében több mutánson végeztünk méréseket és egy olyan modellt javasoltunk, amely a keto-enol tautomerizációs modellt támogatta²³.

Az AppA Q63E mutánson végzett méréseink alapján az látható, hogy a Q63E mutánsához hasonlóan a Q63-as glutamin világos állapotban hidrogén kötést alkot a flavin C4=O karbonil csoportjával, ehhez azonban a glutamin amid csoportjának enol állapotban kell lennie. Az általunk alkotott modell szerint sötét állapotban a keto és az enol állapot is előfordulhat, de a gerjesztés következtében az elektron sűrűség megnövekszik a C4=O esetében (ahogyan ez az 5.8 ábrán is látszik) aminek következtében az enol tautomer lesz erősebb, ezt követően kerül sor a Q63 elfordulására²³ és ez vezet hosszabb távon az AppA-PpsR komplex disszociálódásához.



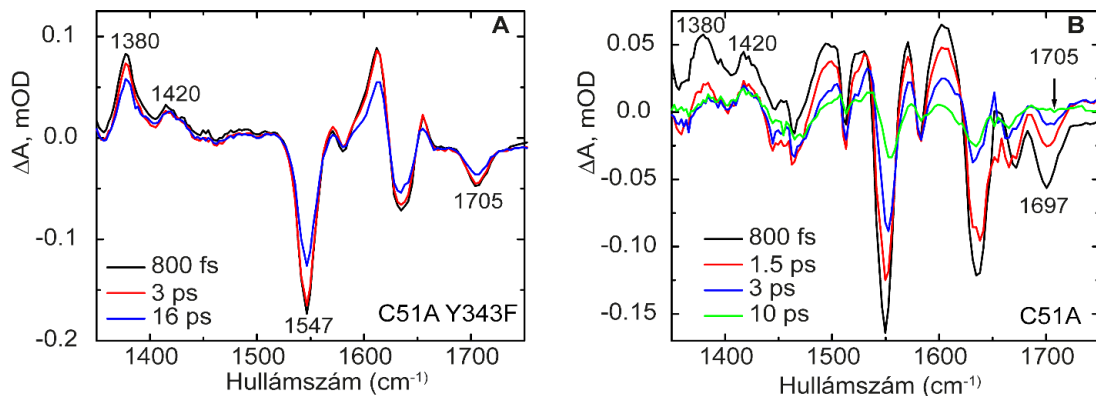
3.2 ábra A fotoaktiváció modellje az AppA-ban a Q63E mutánson végzett mérések alapján. A Q63-as glutamin amid csoportja sötét állapotban keto állapotban van, a gerjesztés következtében az enol állapot válik dominánssá. Ezt követően kerül sor a Q63 elfordulására.

3.2 Tirozin gyökök vibrációs markereinek azonosítása

A tirozin gyökök vibrációs markereinek ismerete különös jelentőséggel bír a BLUF domén fehérjék esetében; a fotoaktív flavoproteineknek ennél a csoportjánál ugyanis egy közeli tirozin a lehetséges elektron donor²⁴⁻²⁸. Az elektron transzfer folyamat megfigyelése érdekében tehát nagy segítséget jelent, ha közvetlen módon sikerül megfigyelni a tirozin gyökök kialakulását. A tirozin kation gyök kialakulásának közvetlen megfigyelése egészen a közelmúltig nem volt lehetséges. Még a II-es fotorendszerben sem sikerült megfigyelni tirozin kation gyököt, pedig jól ismert, hogy a Tyr_Z ebben az esetben másodlagos elektron donorként viselkedik, és ebben az esetben először elektron transzferre majd egy proton transzferre kerül sor. A tirozin kation gyök megfigyelésének nehézsége mögött az áll, hogy a TyrOH⁺ pK értéke – 2 körül van, vagyis nagyon rövid ideig létezik csak és nagyon gyorsan deprotonálódik. Erre a problémára a közelmúltban talált megoldást Marten Vos – egykori mentorom egyben jelenlegi kollaborációs partnerem – aki a Trmfo nevű flavoenzimben figyelte meg a tirozin kation gyök kialakulását ultragyors transziens abszorpció segítségével²⁹. A *Thermus thermophilus*-ban található Trmfo több szempontból is különlegesnek mondható: a flavinhoz közeli cisztein kovalens kötést képez a FAD-dal, és szemben a *Bacillus subtilis*-ből származó Trmfo-val amelyben az addukt a tisztítást követő órákban disszociálódik, a *T. thermophilus*-ból származó Trmfo-ban az addukt stabil marad, a fehérje pedig gyengén fluoreszcens, a fluoreszcencia élettartam 1.2 ps körül van. Egy másik lényeges különbség a *B. subtilis* Trmfo-val szemben, hogy ennek a fehérjének ismert a szerkezete és ez óriási előny volt a kísérletek megtervezésénél és értelmezésénél. A kísérletek a C51A Trmfo mutáns lettek kivitelezve, így a folyamat fotokémiája a tirozintól induló elektron transzfer irányába lett eltolva. Ahogy a szerkezeten is látszik a FAD izoalloxazin gyűrűje párhuzamos a tirozin síkjával, a tirozin és a FAD közötti távolság mindössze 3.9 Å ami nagyon hatékony elektron transzfert feltételez. Marten Vos és munkatársai ultragyors transziens abszorpciós méréseket végeztek a látható tartományban és megállapították, hogy a tirozin kation gyök a gerjesztést követően 1.1 ps alatt jön létre, ezt követően pedig mintegy 3 ps alatt deprotonálódik. A transziens abszorpciós spektrumok spektrális dekompozíciójával sikerült meghatározni a tirozin kation gyök spektrumát a látható tartományban²⁹.

A sikeres tranziens abszorpciós kísérleteket követően természetesen az volt a célom, hogy ezeket az infravörös tartományban is megismételjük és azonosítsuk a tirozin gyök vibrációs módusait.

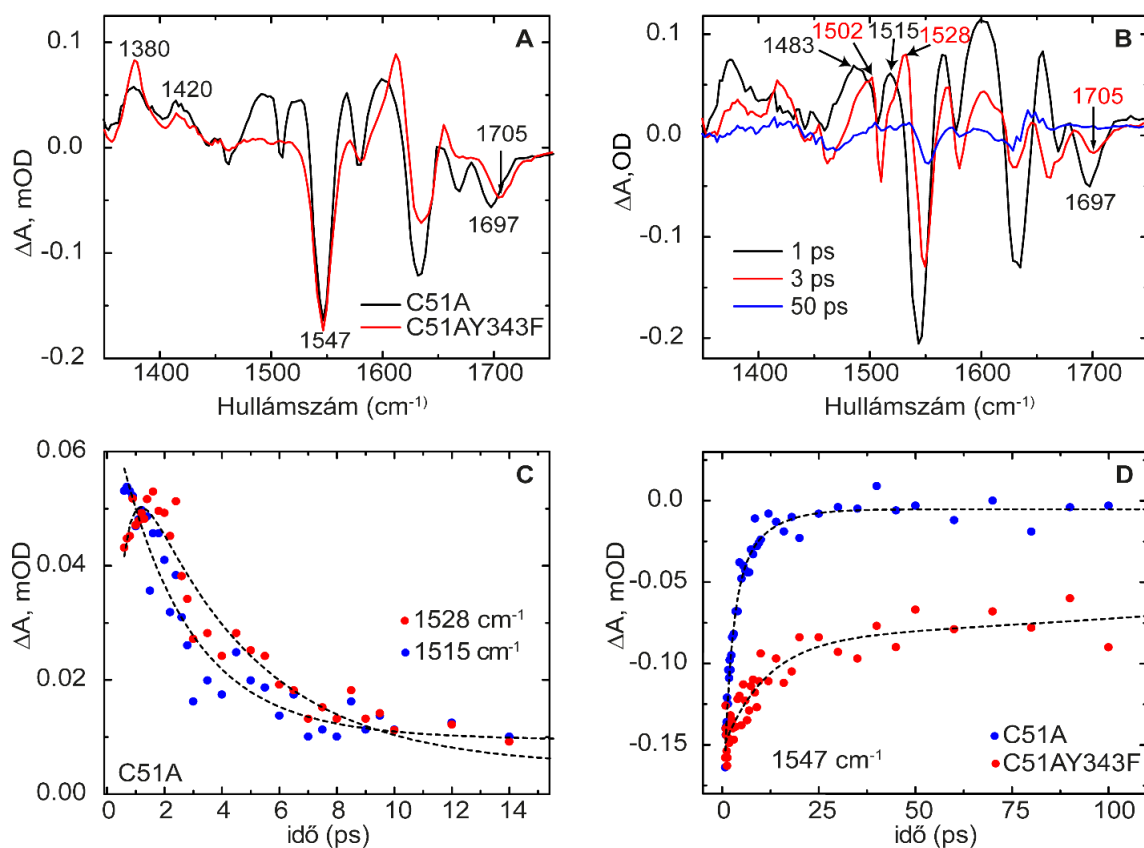
A TRIR kísérletek során két Trmfo mutánst vizsgáltunk, a C51A és a C51AY343F mutánsokat. Ez utóbbi esetében a tirozin egy fenilalaninre lett cserélve, így ez nem volt képes elektron transzferre, ennek köszönhetően sem a FAD gyökök, sem tirozin gyökök nem figyelhetőek meg, ahogyan ez a **3.3 ábrán** látható.



3.3 ábra Infravörös tranziens vörös spektroszkópiai mérések a C51AY343F (A) és a C51A (B) mutánsban. A tirozin mentes mutáns esetében (A) a flavin megszokott TRIR spektruma látható a tirozint tartalmazó mutáns esetében (B) a spektrumban addicionális csúcsok jelennek meg az 1450-1530 cm^{-1} tartományban

A C51A mutáns esetében az elsődleges elektron donor a 343-as pozícióban található tirozin; a két mutáns spektrumai között a különbség látványos. A tirozint nem tartalmazó mutáns esetében a tranziens abszorpciós spektrumok leginkább az oxidált FMN spektrumához hasonlóak: a spektrumban az ismert domináns módusok, 1640 cm^{-1} és 1705 cm^{-1} valamint a gerjesztett állapot módusai figyelhetőek meg 1380 cm^{-1} és 1420 cm^{-1} -nél. A tirozint tartalmazó mutáns esetében a spektrum jóval komplexebb és látványos különbségek figyelhetőek mindkét frekvenciatartományban. Az 1547 cm^{-1} -nél megfigyelt kinetikából jól látszik (**3.4 D** ábra), hogy amikor a tirozin jelen van, az alapállapotba való visszatérés sokkal gyorsabb, mint abban az esetben, ha a tirozin nincs jelen; ez támasztja alá azt a feltevésünket, hogy a tirozin valóban az elsődleges elektron donor a Trmfo esetében.

A 800 fs-nál felvett differencia spektrumok esetében a legmarkánsabb különbség az 1480-1500 cm^{-1} , valamint az 1510-1530 cm^{-1} tartományban megjelenő tranziensek esetében figyelhető meg. Annak érdekében, hogy ezeknek a tranzienseknek az eredetét azonosítsuk több fajta elemzést végeztünk el: a C51A mutánson először globális illesztést végeztünk szekvenciális folyamatot (A \rightarrow B \rightarrow C) feltételezve. Ilyen módon három EAS (Evolutionary Associated Spectra) spektrumot sikerült megkülönböztetni, 1 ps, 3 ps és 50 ps-os időállandókkal. Az 50 ps-os spektrum gyakorlatilag a végső vagy aszimptotikus spektrum, ezen a tartományon kívül ugyanis már nem figyelhető meg a spektrumokban semmilyen változás. Az 1 ps-hoz és a 3 ps-hoz tartozó EAS spektrumok azonban igen informatívak, a globális illesztés segítségével sikerült szétválasztani az 1480-1500 cm^{-1} és az 1510-1530 cm^{-1} tartományban található kiszélesedett tranziens csúcsokat és kiderült, hogy ezek több tranziens kombinációjából származnak (lásd **3.4 B** ábra). Az 1500 cm^{-1} felett megjelenő két csúcs, az 1515 cm^{-1} és az 1528 cm^{-1} a FAD anionos és semleges gyökének felelnek meg az előző fejezetben tárgyaltak alapján. A megfigyelt szekvencia megfelel a várakozásainknak: a gerjesztést követően először az anionos FAD gyök ($\text{FAD}^{\bullet-}$) jön létre majd ezt követi a semleges gyök (FADH^{\bullet}) kialakulása.

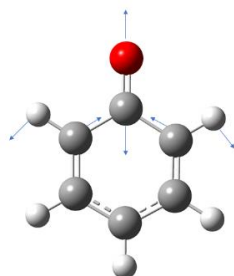


3.4. ábra A) A C51A és a C51AY343F Trmfó mutáns TRIR spektruma 800 fs-os késleltetésnél B) A C51A mutáns esetében a globális illesztés által számított EAS spektrumok. Az 1 ps és 3 ps-hoz tartozó spektrumok esetében markánsan szétválnak az 1515 cm^{-1} és az 1528 cm^{-1} flavin csúcsok, ami az anionos és a semleges flavin gyök szekvenciális megvalósulását mutatja C) A C51A mutáns esetében megfigyelt egyedi kinetikák 1515 és 1528 cm^{-1} -nél. Az 1515 cm^{-1} -nél megfigyelt csúcs a gerjesztéssel egy időben indul, az 1528 cm^{-1} csúcs viszont ehhez képest pár pikoszekundummal később alakul ki. D) A C51A és C51AY343F mutáns esetében megfigyelt egyedi kinetikák 1547 cm^{-1} -nél. A tirozint tartalmazó mutáns esetében a FAD gyorsabban tér vissza alapállapotba, mint a tirozin mentes mutáns esetében, vagyis a tirozin az elsődleges elektron donor.

A két frekvenciánál megfigyelt egyedi kinetikákat elemezve látszik, hogy az anionos gyök gyakorlatilag a gerjesztéssel együtt jön létre. Ez eltér a látható tranziens abszorpcióval végzett kísérletekhez képest, ahol az anionos gyök és ennek megfelelően a tirozin kation gyök közel 1 ps alatt jött létre. Ez leginkább azzal magyarázható, hogy a gerjesztéshez közeli idők esetében az infravörös tranziens mérések időfelbontása rosszabb, mint a használt látható tranziens abszorpciós rendszeré. Az 1528 cm^{-1} -nél detektált kinetika esetében megfigyelhető, hogy ennek a tranziensnek a kialakulásához közel 1 ps-ra van szükség, ami egybeesik a globális illesztés által meghatározott időállandóval. Az $1480\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ körüli tranziens csúcsot megfigyelve a globális illesztés ebben az esetben is két csúcsra választotta szét a 800 fs-nál megfigyelt széles tranziens. A látható tranziens abszorpciós méréseknél megfigyelt szekvenciát figyelembe véve az 1483 cm^{-1} tranziens felel meg a tirozin kation gyöknek. A gerjesztést követően ugyanis a $\text{FAD}^* \rightarrow \text{FAD}^{\bullet-} - \text{TyrOH}^{\bullet+}$ gyökpár jön létre.

A FADH^{\bullet} csúcs megjelenése viszont azt jelenti, hogy következő lépésként a tirozin kation gyök deprotonálódott, a proton pedig a flavin semleges gyök stabilizálásában vett részt, létrehozva a $\text{FADH}^{\bullet} - \text{TyrO}^{\bullet}$ gyökpárt.

Bár ez a lépés valószínűsíthető volt – mivel több flavoproteinben megvalósul – a látható tranziens abszorpciós mérések során nem sikerült megfigyelni²⁹, ez ugyanakkor jól rávilágít az infravörös tranziens abszorpciós egyben a vibrációs spektroszkópia előnyeire.

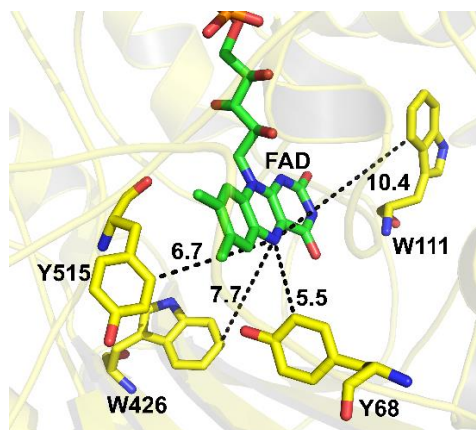


3.5 ábra Semleges tirozin gyök ν_{7a} vibrációs módusa 1502 cm^{-1} -nél

A globális illesztés segítségével egyúttal sikerült megállapítani a semleges tirozin gyök vibrációs módusát is, amely ebben az esetben 1502 cm^{-1} . Ez a módus melleleg megfelel az irodalomban található értékeknek: DFT számítások alapján a fenoxil gyök valamint a semleges tirozin gyök esetében a fenil gyűrű ν_{7a} (CO) nyújtó módusának (lásd **3.5 ábra**) frekvenciája 1505 cm^{-1} illetve 1510 cm^{-1} ^{30,31}. *Bacillus cereus*ból való ribonukleotid reduktáz esetében a semleges tirozin gyök Raman spektroszkópiával mért frekvenciája szintén 1502 cm^{-1} , *Synechocystis* sp. PCC6803 fotorendszer II esetében a Tyr_D[•] illetve Tyr_Z[•] FTIR-rel mért frekvenciája 1503 cm^{-1} és 1512 cm^{-1} volt ³².

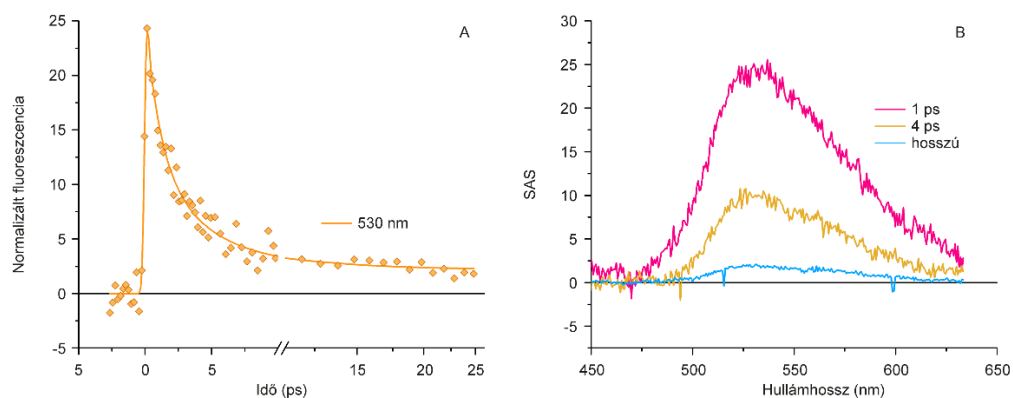
3.3 Tirozin és triptofán gyökök azonosítása glükóz oxidázban

A tirozin kation gyök Trmfo-ban való azonosítását követően Marten Vosszal elővettük a glükóz oxidáz problémakörét és megvizsgáltuk korábbi méréseinket az új eredmények tükrében. Korábbi munkámban a spektrális illesztés során a mért DAS komponenseket a FAD anionos gyök valamint a triptofán kation gyök spektrumainak lineáris kombinációjával közelítettem ³³. Az így kapott spektrum nem illeszkedett tökéletesen a mért spektrumokra, de mivel akkor még nem volt ismert a tirozin kation gyök spektruma, ezt nem sikerült figyelembe venni a kiértékelés során. A glükóz oxidáz szerkezetét vizsgálva azonban látszik, hogy a tirozinok elektron donor szerepe egyáltalán nem zárható ki. Ennek megfelelően úgy döntöttünk, hogy újra elvégezzük méréseinket először látható tartományban majd infravörös tartományban is és megvizsgáljuk, hogy megfigyelhető-e elektron transzfer valamelyik tirozintól.

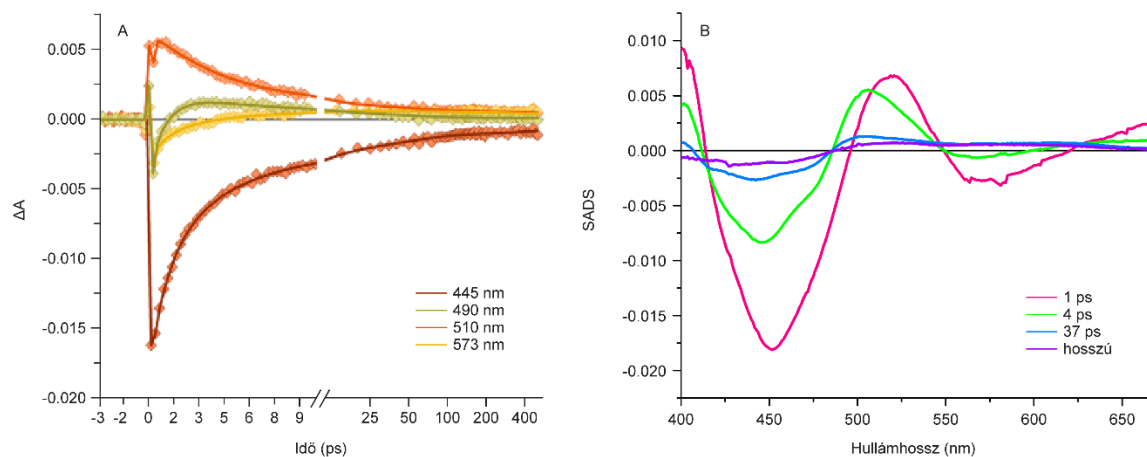


3.6. ábra Glükóz oxidáz szerkezeete, amelyen a FAD-ot és a kromofór körüli potenciális elektron donorokat tüntettük fel. A távolságokat megfigyelve az elsődleges elektron donor jelölt az Y68 tirozin volt.

Először Kerr-kapuzott tranziens fluoreszcencia spektroszkópai méréseket végeztünk, amelyekből jól látszott, hogy a FAD gerjesztett állapota a hatékony elektron transzfernek köszönhetően nagyon gyorsan relaxálódik (**3.7 ábra**). A globális illesztés három komponenst eredményezett, amelyeknek spektrális alakja azonban megegyezett. A populáció mintegy 70%-a 1 ps alatt relaxálódik, egy jelentős populáció 4ps alatt relaxálódik és van egy hosszabb aszimptotikus komponens.

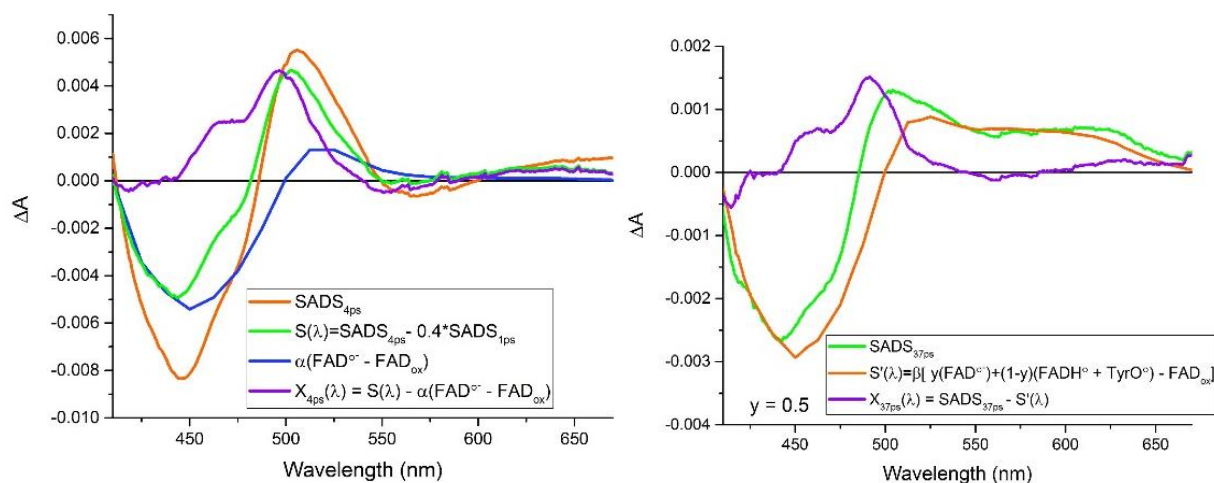


3.7. ábra Tranziens fluoreszcencia mérések glükóz oxidázon. Bal oldalon az 530 nm-nél megfigyelt fluoreszcencia relaxációja látszik, jobb oldalon pedig a globális illesztés által meghatározott spektrumokat és időállandókat. (Nag, Lukacs, Vos; *ChemPhysChem*, 2019)



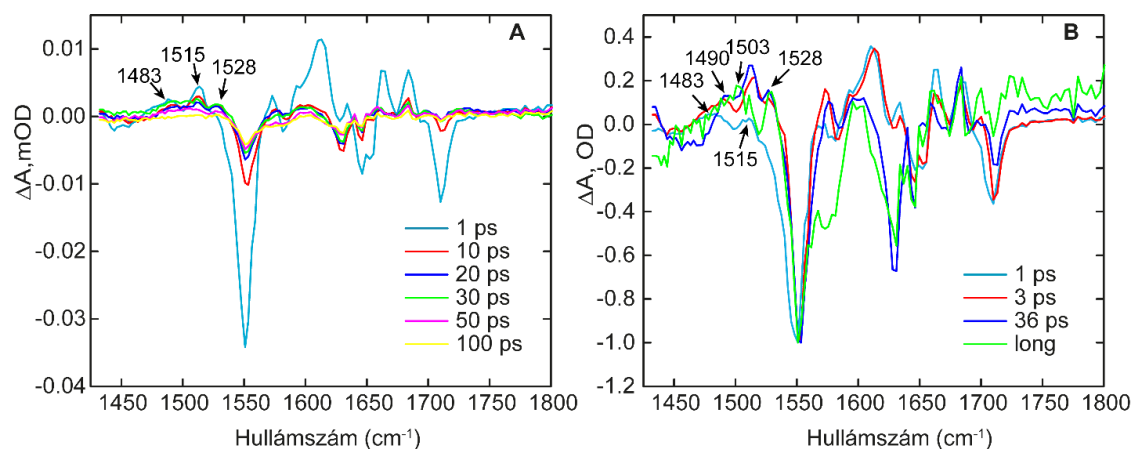
3.8. ábra A bal oldalon az egyes hullámhosszak esetében megfigyelt egyedi kinetikák látszanak. A jobb oldalsó ábrán a globális illesztéssel kapott SADS (Species Associated Difference Spectra). Az illesztésből jól látszik, hogy az 1 ps esetében megfigyelt spektrum a FAD gerjesztett állapotának felel meg. A többi spektrum analíziséhez spektrális modellezést használtunk.

A tranziens abszorpciós adatokon végzett globális illesztés hasonló eredményre vezetett, a rövid 1 ps és 4 ps-os időállandók mellett azonban megjelent egy 37 ps-os komponens, amely nem „látszott” a fluoreszcencia mérésekben (**3.8 ábra**). Az 1 ps-hoz tartozó spektrum egyértelműen a gerjesztett állapot és az oxidált állapot differencia spektrumának ($\text{FAD}^* - \text{FAD}_{\text{ox}}$) felel meg. Spektrális illesztéssel meghatározható, hogy a 4 ps-os és a 37 ps-os időállandókhöz tartozó spektrumok milyen termékekből állnak össze. A 4 ps-os spektrum illesztésénél azt használtuk ki, hogy a fluoreszcens tranziens mérésből megtudtuk, hogy a második időállandóhoz tartozó fluoreszcens spektrum az 1 ps-hoz tartozó spektrum 0.4-szerese. A keletkező gyökök spektruma tehát könnyedén megtalálható, ha levonjuk a 4 ps-hoz tartozó spektrumból. A megmaradt spektrum viszont már az anionos flavin gyök és a tirozin (vagy triptofán) gyök spektrumának lineáris kombinációja. A számítás után kapott spektrum alakja egyértelműen a tirozin kation gyök spektrumának felel meg. Ilyen módon sikerült azt igazolni, hogy az elektron transzfer során a tirozin a domináns elektron donor, a gerjesztést követően ugyanis ez keletkezik dominánsan. A 37 ps-os időállandóhoz tartozó spektrum spektrális dekonvolúciójából kiderül, hogy a flavin protonálódik és létrejön a FADH^* semleges gyök állapot, ez pedig úgy lehetséges, ha a tirozin deprotonálódik és létrejön a semleges tirozin gyök (**3.9 ábra**).



3.10 ábra A bal oldalon a 4 ps-os fázishoz tartozó SADS spektrum modellezése látható. A FAD^* állapothoz tartozó spektrum kivonása után az anionos gyök és a tirozin gyök spektrumával modellezhető a spektrum. A jobb oldalon a 37 ps-os fázishoz tartozó SADS spektrum látható, amelyben a FADH^* a domináns

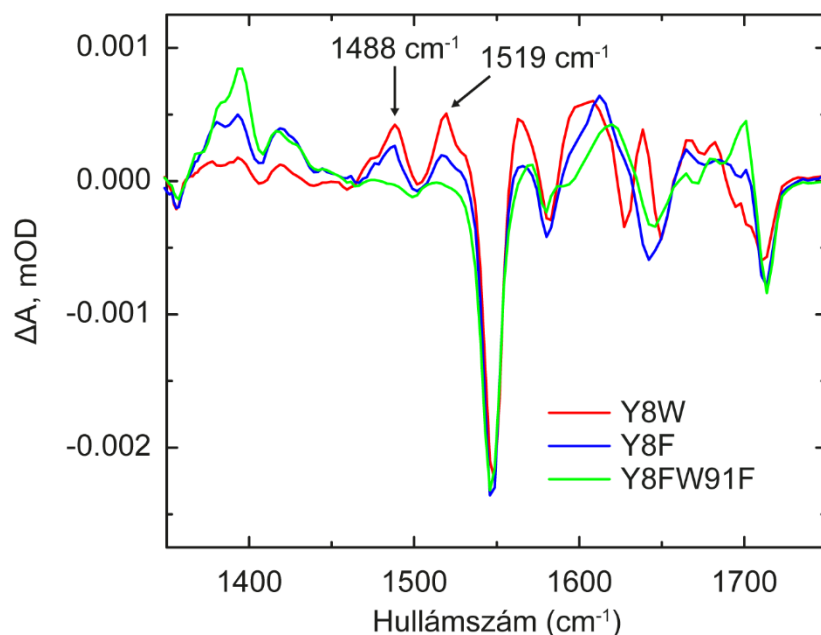
Azt követően, hogy látható tranziens abszorpciós mérésekkel sikerült leírni az elektron transzfer jelenséget glükóz oxidázban, újra infravörös tranziens abszorpciós méréseket végeztünk, az adatkiértékelés során pedig felhasználtuk a tirozin gyököknek a Trmfo fehérjén végzett mérések során felismert vibrációs markereit. A 3.11 A ábrán a nyers mérési adatok láthatóak 1 és 100 ps között, a B. ábrán a globális illesztésből a különböző időállandókhoz tartozó EAS spektrumok láthatóak.



3.11 ábra A) Glükóz oxidáz TRIR spektrumai különböző késleltetések esetén. A spektrumokban látszanak a flavin, valamint a tirozin és flavin gyökök vibrációs módusai B) A globális illesztésből számolt időállandók és az ahhoz tartozó EAS spektrumok

A Trmfo-n végzett TRIR mérésekhez hasonlóan, a glükóz oxidáz esetében is az 1ps-os időállandóhoz tartozó EAS spektrumban már megjelenik a két jellegzetes tranziens 1483 cm^{-1} és 1515 cm^{-1} frekvenciáknál. A Trmfo esetében megfigyeltekkel és a tranziens abszorpciós mérésekkel összhangban ez a két frekvencia a tirozin kation és az anionos FAD gyököknek felelnek meg. A 3 ps-hoz tartozó spektrumban két új tranziens csúcs jelenik meg, 1490 cm^{-1} és 1528 cm^{-1} . Ez utóbbi egyértelműen a FADH[•] vibrációs markere. A vibrációs spektroszkópia szenzitivitását mutatja, hogy a tranziens abszorpciós mérések során csak későbbi időállandó esetén sikerült kimutatni a semleges gyök jelenlétét. A 1490 cm^{-1} csúcs meghatározása viszonylag egyszerű: a glükóz oxidáz szerkezetét nézve az a várakozás, hogy leginkább triptofán gyöktől származik. A PixD nevű BLUF domén fehérje mutánsain végzett kísérletek egyértelművé teszik, hogy ez a csúcs

valóban a triptofán kation gyök egyik vibrációs módusa, úgyhogy ennek a gyök állapotnak a vibrációs markereként tudjuk alkalmazni vizsgálataink során.



3.12 ábra Az ábrán a PixD nevű BLUF domén fehérjén végzett TRIR spektrumok láthatóak 3 ps-nál. Az Y8FW91F mutáns esetében a FAD közeli triptofán és tirozin egyaránt el lett távolítva, a kapott spektrum a szokásos FMN spektrumhoz hasonlít. Az Y8F mutáns esetében az Y8 pozícióban levő tirozin lett eltávolítva, az Y8W esetében pedig a tirozin helyett egy triptofán található, így az elektron transzfer fel lett erősítve. Az 1519 cm^{-1} hullámszánál megfigyelhető tranziens abszorpciós csúcs az anionos flavin gyöknek felel meg, az 1488 cm^{-1} -nél megfigyelt csúcs viszont a triptofán kation gyök egyik rezgésével feleltethető meg.

Ez a megfigyelés megegyezik korábbi DFT számításokkal, amelyekből az állapítható meg, hogy ez a frekvencia a fenol gyűrű Φ_{19a} módusának és a C2-C3 nyújtó módusnak felel meg^{34,35}. A közelmúltban végzett rezonáns Raman spektroszkópiai mérések azt állapították meg, hogy a triptofán $W5^{+}$ módusa vízben 1497 cm^{-1} -nél jelenik meg, nehézvízben pedig 1488 cm^{-1} -nél. Ez egybevág a mi megfigyelésünkkel, mivel a glükóz oxidáz minták (is) nehéz vízben lettek megmérve. A triptofán kation gyököt tranziens infravörös abszorpciós mérések során először Blanco-Rodríguez és munkatársai³⁶ határozták meg azurinban. A mérés érdekessége, hogy ugyanazon a TRIR rendszeren (ULTRA) végezték, mint mi. Az általuk meghatározott két vibrációs marker 1278 cm^{-1} és 1497 cm^{-1} ; az eltérés abból adódik, hogy mérés során az azurin minták DCM-ben lettek beoldva.

A triptofán kation gyök vibrációs markerének ismeretében tehát megállapítható, hogy a glükóz oxidázban az elsődleges elektron donor valóban tirozin, de a gerjesztést követő néhány pikoszekundumnál megfigyelhető a triptofán kation gyök megjelenése.

A Trmfo-n és Glükóz oxidázon végzett méréseink során sikerült meghatároznunk a tirozin kation és semleges gyök, valamint a triptofán kation gyök vibrációs markereit.

Vizsgált gyök	Hullámszám	Rezgési módus
FADH [•]	1528-30	C-C (I), C4aN5 és C10aN1 nyújtó módusok
FAD ^{•-}	1515-1518	
TrpH ^{•+}	1488-1490	Φ_{19a} , C2-C3
TyrOH ^{•+}	1483	
TyrO [•]	1502-1512	ν_{7a} (CO) nyújtó módus

3.1 Táblázat Flavin, triptofán és tirozin gyökök esetében meghatározott vibrációs módusok

3.4 Fotoaktiváció triptofán nanodrón keresztül

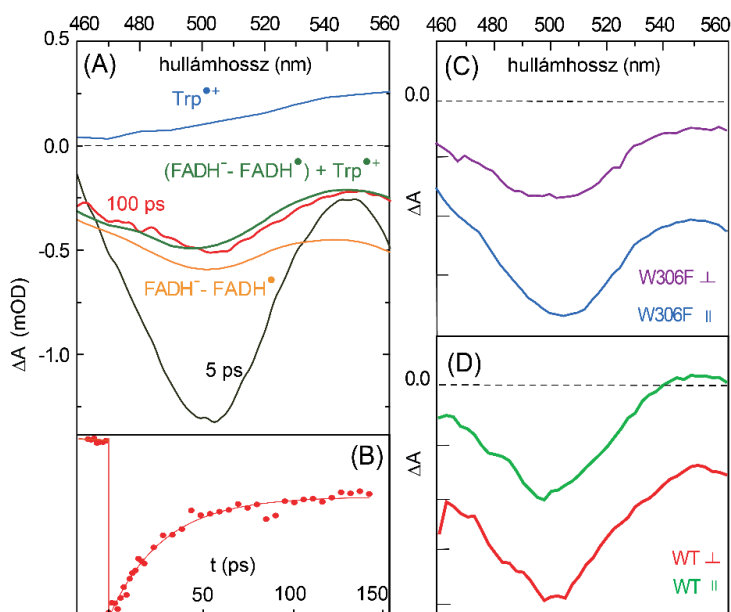
Korábbi spektroszkópiai vizsgálatok kimutatták, hogy *E. coli* fotoliázban a W₃₈₂ triptofán az elsődleges elektron donor³⁷, amely azonban nem marad oxidált állapotban, mivel <4 ps alatt redukálódik a W₃₅₉ által³⁸. Felmerül tehát az érdekes kérdés, hogy a töltés valóban 30 ps alatt átkerülhet-e a W₃₀₆ triptofánra, ez ugyanis egy nagyon hatékony elektron transzfer folyamat és ebben az esetben a triptofán lánc egyfajta "drónak" tekinthető. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a töltés melyik triptofánon helyezkedik el polarizált tranziens abszorpciós spektroszkópiát alkalmaztunk.

A W306F mutáns fotoliázban a gerjesztést követő néhány pikoszekundum utáni tranziens spektrum (**3.13 ábra**) nagyon hasonló a vad típus, a W382F illetve a W359F mutánsok esetében megfigyelt spektrumokhoz^{37,39}, és megfelel a gerjesztett FADH^{•*} állapotnak. Ez az állapot mono-exponenciális módon 27 ps alatt relaxálódik, hasonlóan a vad típusban és a W359F mutáns esetében megfigyeltékhez^{37,39,40}. A vad típusú fehérje és a W359F mutáns esetében is az elsődleges donor a W382 triptofán, ilyen módon a relaxáció sebességét a FADH^{•*}W382 → FADH W382^{•+} töltésszétválasztási reakció határozza meg. Az izotróp körülmények között végzett tranziens abszorpciós mérések esetén a W306F mutánsban a 27-ps fázist követően megvalósuló aszimptotikus spektrum nagyon hasonló alakú (**3.13 ábra**), mint a vad típusban kapott spektrum és jól modellezhető a (FADH⁻–FADH[•]) és a W^{•+} spektrum összegeként (a semleges triptofán nem abszorbeál a látható tartományban). Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy a kezdeti FADH⁻W^{•+} képződés sebessége és hozama független a W306 terminális elektrondonor jelenlététől. Mivel a FADH⁻ W382^{•+} állapot instabil és néhány ps alatt rekombinálódik, a W306F mutáns fehérjében a hosszú életű állapotnak a FADH⁻ W359^{•+}-nak kell lennie, így a W382^{•+} W359 általi redukálódás stabilizálja a töltésszétválást.

A 100 ps-os időskálán a vad típusú fehérje esetében a gyök a W359 vagy a W306 triptofánon is elhelyezkedhet. A megkülönböztetéshez polarizációs fotoszelekciós kísérleteket végeztünk, a fotoliáz szerkezetéből ugyanis ismert, hogy a W306-os triptofán dipólusa más szöget zár be a FAD elektromos dipólusával, mint a W382 vagy a W359-es triptofán. A polarizációs méréseket úgy végeztem, hogy a minta után egy forgatható polarizátort helyeztem el. A próba impulzus polarizációja párhuzamos volt (mivel megegyezett a gerjesztő lézer polarizációjával). Vertikális

irányban beállított polarizátor esetében mért tranziens abszorpciós értéket a ΔA_{\perp} -nak, a vízszintes polarizátor esetében mért abszorpcióváltozást nevezzük ΔA_{\parallel} -nak. (Mivel a FADH^{\bullet} széles spektrumon nyeli el a fényt, gerjesztő fényként egy ~ 620 nm-es nyalábot használtam, amihez a tranziens abszorpciós rendszerbe egy NOPA-t építettem).

Míg az izotróp aszimptotikus spektrumok nagyon hasonlóak a WT és a W306F PL esetében (4.6 ábra), a megfelelő polarizált ΔA_{\parallel} és ΔA_{\perp} spektrumok viszont nem (3.13 B ábra), ami arra utal, hogy különböző triptofán gyökökről van szó.



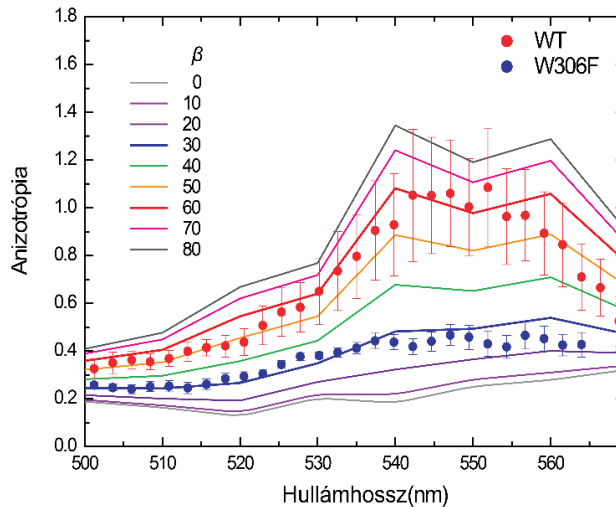
3.13 ábra. A) A W306 mutáns esetében a gerjesztést követő 5 ps illetve 100 ps késleltetésnél mért tranziens spektrum. A narancs és a kék a modell spektrumok, a zöld a spektrális illesztésből kapott spektrum, amely jó átfedést mutat a mért spektrummal. B) Az 500 nm esetében megfigyelt kinetika, időállandó 27 ps C) A W306F mutáns esetében párhuzamos és vertikális polarizáció mellett mért tranziens spektrum D) A vad típus esetében párhuzamos és vertikális polarizáció mellett tranziens spektrum

A ΔA_{\parallel} és a ΔA_{\perp} értékek ismeretében kiszámolható az anizotrópia (r) értéke:

$$r(\lambda) = (\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}) / (\Delta A_{\parallel} + 2 \Delta A_{\perp})$$

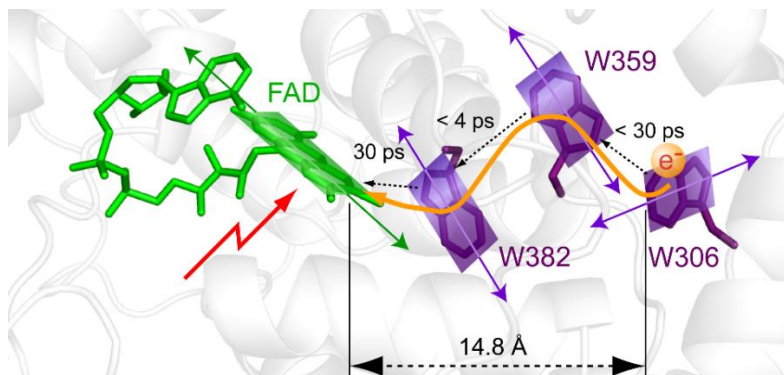
Az anizotrópia ismeretében azonban kiszámolható a tranzíciós dipólusok által bezárt szög az

alábbi képletnek megfelelően^{13,38}: $r = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{5}$



3.14 ábra A folytonos vonalak az elméletileg számolt anizotrópia értékek az egyes hullámhosszaknál. A körök a mérés során kapott anizotrópia értékek. A mért értékek alapján a bezárt szög $50-70^\circ$ a vad típusú minta esetében, $20-30^\circ$ a W306F mutáns esetében

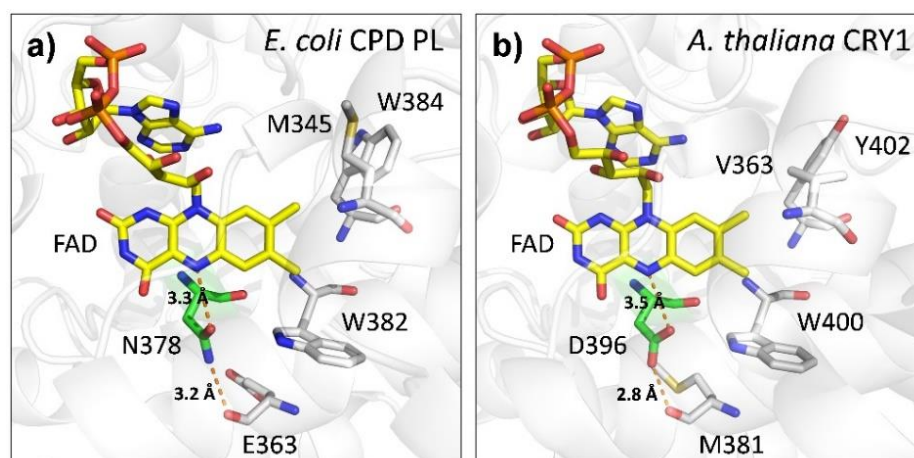
A szög meghatározásához fordított eljárást alkalmaztunk és először a különböző szögekhez tartozó elméleti értékek lettek meghatározva⁴¹, majd ezt vetettük össze a kapott anizotrópia értékekkel. Ennek megfelelően a vad típusú fehérje esetében kapott szög $\beta = 50-70^\circ$ volt, míg a W306F mutáns esetében ez $\beta = 25-30^\circ$ -nak adódott. A kapott értékek a szerkezetből számolt értékekkel: a W306-os triptofán 79° -os a W359-es triptofán pedig 35° -os szöget zár be a FAD tranzíciós dipólusával. Összességében adataink egyértelműen bizonyítják, hogy a vad típusú fotoliázban a ~ 30 ps-os fázis után a pozitív töltést a W306-os triptofánon helyezkedik el. Így a $\text{FADH}^- \text{W}^{\bullet+}$ töltéspár stabilizálódása a W306-ról a W359-en keresztül a W382-re történő elektron transzfer révén kevesebb mint 30 ps alatt történik, és az egész folyamatot a kezdeti $\text{FADH}^- \text{W}^{\bullet+} \rightarrow \text{FADH}^- \text{W382}^{\bullet+}$ töltésszétválasztási folyamat sebesség korlátozza. A $\text{W359}^{\bullet+} \rightarrow \text{W382}^{\bullet+}$ transzfer < 4 ps alatt valósul meg³⁹, a $\text{W306}^{\bullet+} \rightarrow \text{W359}^{\bullet+}$ transzfer pedig < 30 ps alatt történik, ami a teljes reakció időskálája (lásd **3.14 ábra**).



3.15 ábra A triptofán „nanodrót” keresztül megvalósuló elektron transzfer folyamat

3.5 Miért különbözik a fotoliázok és kriptokrómok funkciója?

A továbbiakban bemutatott kísérletek során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a nagy fokú homológia ellenére mi az oka a fotoliázok és kriptokrómok funkciójában tapasztalt jelentős eltérésnek. 2009-ben Martin Byrdin és Klaus Brettel kollégáim növényi kriptokrómokban és *A. nidulans* fotoliázban mérték a FAD redox potenciálját, amely jóval negatívabb volt kriptokrómokban, mint fotoliázban. Ennek alapján azt javasolták, hogy a funkcióban megjelenő különbség az N5-höz közeli aszpartát/ aszparagin a felelős. Ennek alapján azt javasoltam, hogy fotoliázban cseréljük ki az aszparagint egy aszparáttra – amitől a fehérje kriptokróm-szerű lesz – és vizsgáljuk meg, hogy ez milyen hatással van a fotociklusra. Érdekes módon az ellentétes mutáció következtében – *A. thaliana* kriptokrómokban az aszpartátot aszparaginre cserélték – a kriptokróm képes lett a DNS szál javítására⁴².



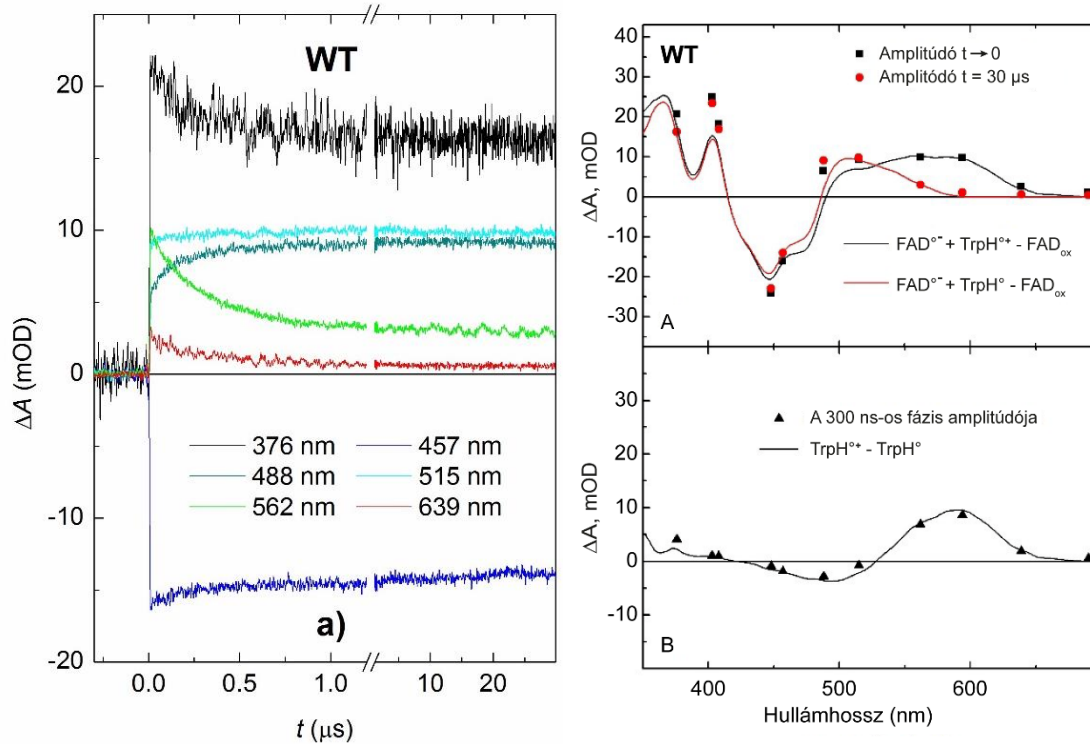
3.16 ábra FAD és környezete *E. coli* fotoliáz (a) valamint *A. thaliana* kriptokróm (b) esetében. Látványos különbség a FAD N5 atomjához közel elhelyezkedő aszparagin illetve aszparát.

Elsőként tehát létrehoztuk az N378D fotoliáz mutánst, amelynek esetében az aszparagint egy aszpartátra cseréltük. Ennek eredményeként a FAD oxidált állapotba került, szemben a vad típusnál megfigyelt félig redukált állapottal.

Az összehasonlíthatóság érdekében a méréseket olyan vad típusú fotoliázon végeztük el a mérések, amelyek esetében a FAD szintén oxidált redox állapotban volt. Ehhez a fehérjét négy órán keresztül 0.5 mM imidazolt tartalmazó pufferben inkubáltuk, majd sócserélő oszloppal az imidazolt eltávolítottuk.

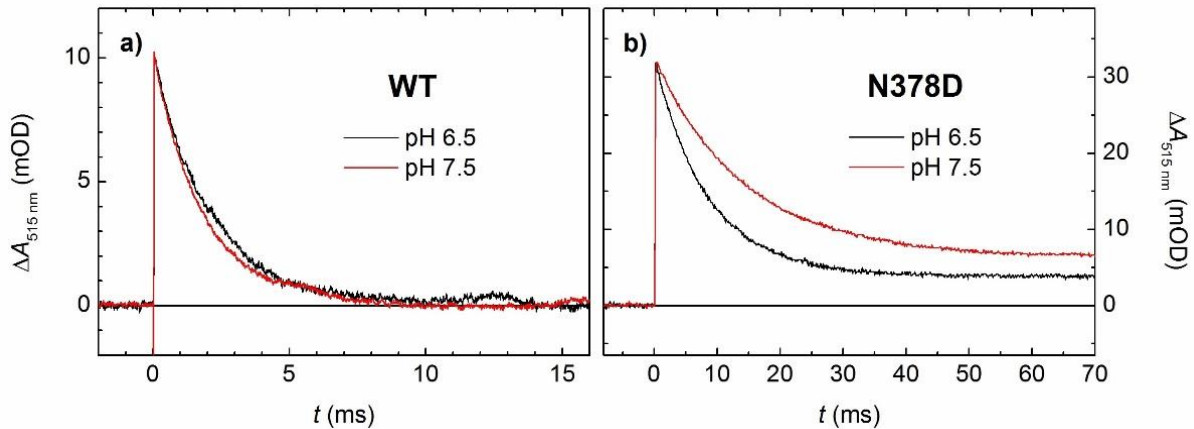
Ezt követően tranziens abszorpciós méréseket végeztünk vad típusú oxidált fotoliázon a ns-tól a több tíz másodpercig terjedő időskálán. Az utolsó triptofán kation gyök ($W_C H^{\bullet+}$) deprotonálódása ~300 ns alatt valósult meg, a töltés rekombinációja az így kialakult $FAD^{\bullet-} W_C^{\bullet}$ párban ~2 ms alatt, a $FAD^{\bullet-}$ protonálódása pedig (a W_C^{\bullet} külső redukálószer általi redukálását követően) ~4 s alatt történt meg.

A **3.17 ábra** hat jellemző hullámhosszon ns- és μ s-idős skálán mutatja be a vad típusú fehérje esetében megfigyelt tranziens abszorpciós kinetikát. Az egyes hullámhosszokon megfigyelt kinetikák amplitúdójából rekonstruáltuk a spektrumot (lásd 4.8 ábra). A $t=0$ időpillanatra számolt spektrum a $FAD^{\bullet-}$ - $TrpH^{\bullet+}$ gyökpár differenciaspektrumának felel meg összhangban a kriptokrómban megfigyeltekhez. (A $FAD^{\bullet-}$ - $W_C H^{\bullet+}$ pár kialakulásának kvantumhatásfoka ~65%.) A kezdeti – ugrásszerű – abszorpciós változásokat több hullámhosszon egy ~300 ns élettartamú kinetikus fázis követte (a globális illesztése szerint 315 ns). A vad típusú fehérjén végzett mérések esetén az 562 nm-en megfigyelt relaxáció és a 488 nm-en mért növekedés volt a leglátványosabb. Ez megfelel annak a korábbi mérésekből fakadó elvárásnak, hogy a triptofán kation gyök ~ 200-300 ns alatt deprotonálódik¹⁹. Az 562 nm-en megfigyelt relaxáció a triptofán kation gyök deprotonálódására, a 488 nm-es csúcs növekedése pedig a semleges triptofán gyök megjelenésére utal.



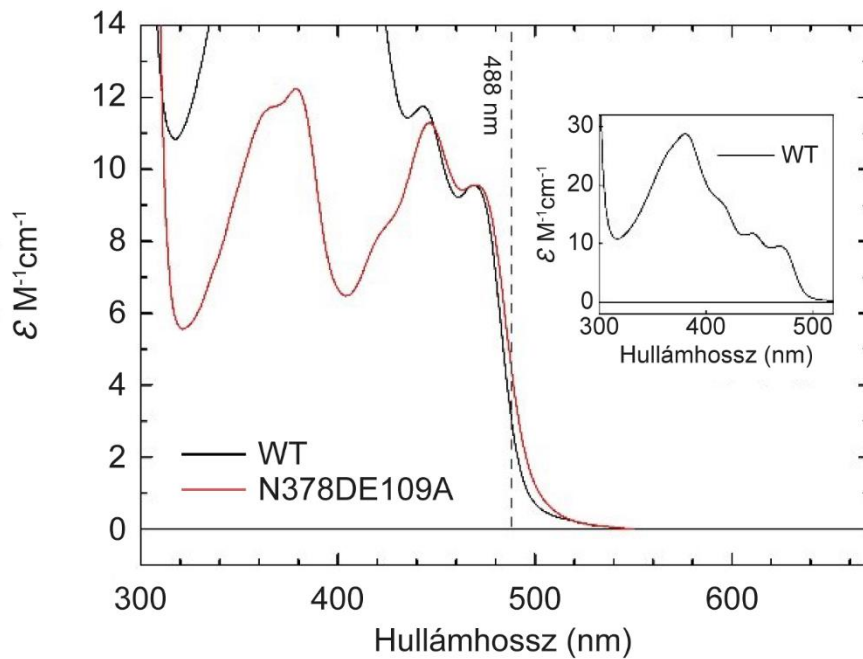
3.17 ábra A bal oldalon az oxidált vad típusú fotoliáz esetében különböző hullámhosszakon mért abszorpcióváltozások láthatóak. A jobb oldalon a kinetikák illesztésével kapott amplitúdókból kapott spektrális illesztés.

A 300 ns-os fázis befejeztével elért abszorpciós változások összhangban vannak egy $\text{FAD}^{\bullet-} - \text{Trp}^{\bullet}$ gyök párral (a 3.17 B ábrán piros vonalként ábrázolt várható különbségi spektrum). A 300 ns-os fázist követően egy lassú relaxáció volt megfigyelhető az összes hullámhosszon. Ezt a relaxációt 10 μs -os időfelbontással mértük közel 15 s-ig. Az 515 nm-en megfigyelt időállandó $\tau = 1,9$ ms volt, ezt a $\text{FAD}^{\bullet-} - \text{Wc}^{\bullet}$ gyök pár rekombinációjával azonosítottuk. Gyakorlatilag ugyanilyen relaxáció volt megfigyelhető pH 6,5-nél (fekete nyomvonal; illesztési eredmény $\tau = 2,0$ ms), ami pedig éles ellentétben áll a fotoliáz esetében megfigyelt $\text{FADH}^{\bullet} - \text{Wc}^{\bullet}$ pár, amelyet a pH csökkenésével jelentősen felgyorsul⁴³.



3.18 ábra A bal oldalon a vad típusú fotoliázban megfigyelt töltés rekombináció, a jobb oldalon ugyanezen a hullámhosszon megfigyelt rekombináció csak az N378D mutáns esetében.

Az aszparagin-aszpartát csere hatásának megfigyelése érdekében az N378DE109A mutánson hasonló tranziens abszorpciós kísérleteket végeztünk, mint a vad típuson. Az E109A mutáció következtében a fehérje elvesztette az MTHF antennáját, ezáltal is hasonlóbba vált a kriptokrómokhoz, hiszen kevés kivétel esetében nem rendelkeznek antennával. (A *Vibrio cholerae*-ből származó kriptokróm kivételt jelent, ez ugyanis kriptokrómnak számít, de antennával és DNS javítási funkcióval is rendelkezik^{44,45}). Az egyszerűség kedvéért az E109A mutációt a továbbiakban nem említem a szövegben, és mi kettős mutáns fehérjére csak N378D-ként hivatkozom. Megjegyzendő, hogy az N378D mutáns kék ($S_0 \rightarrow S_1$) abszorpciós sávjai ~ 3 nm-rel vörös felé tolódnak a WT-hez képest (**3.19 ábra**). Ez az eltolódás jelentős hatással van a 488 nm-en rögzített tranziens abszorpciós adatokra (lásd alább).

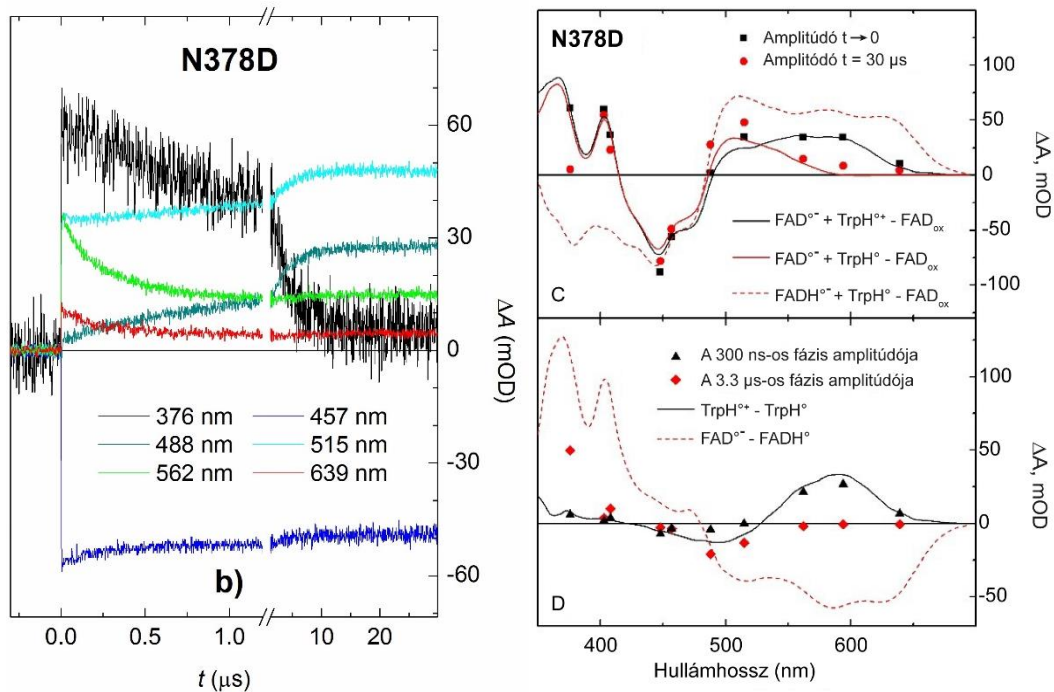


3.19 ábra A vad típusú (oxidált) és az N378DE109A fotoliáz abszorpciós spektruma. A pirossal jelzett spektrumon jól látható, hogy a mutáció következtében a fehérje elvesztette a ~ 380 nm abszorpciós csúccsal rendelkező MTHF antennát.

Az N378D mutáns esetében megfigyelt kezdeti spektrum megegyezett azzal, amit a vad típus esetében kaptunk: a $t=0$ időpillanatra jellemző fekete görbe szintén a $\text{FAD}^{\bullet-} \text{WCH}^{\bullet+}$ gyökpár létrejöttére utal. A triptofán deprotonálódására a mutáció nem gyakorolt különösebb hatás, az 562 nm-en megfigyelt lecsengés élettartama $\tau = 297$ ns. A 488 nm-en megjelenő jel sokkal kisebb kezdeti amplitúdóval rendelkezik a mutánsban, mint a vad típusú fehérjében. Ezt a különbséget feltételezhetően a $\text{FAD}_{\text{ox}} \text{S0} \rightarrow \text{S1}$ abszorpciós sávjának a mutáns fehérjében megfigyelt vörös eltolódásával magyarázzuk (lásd a 4.11 ábrát).

Az N378D mutáns esetében megfigyelt további kinetikák jelentősen eltértek a vad típusban mérttől. A különbség legjobban 376 nm-nél tűnt ki a legjobban: míg a vad típusú minta esetében 1 μs felett ezen a hullámhosszon a 30 μs -os időablakon belül csak minimális változás volt megfigyelhető, a mutáns esetében ezen az időtartományon az abszorpcióváltozás – 3.3 μs -os időállandóval – nullára csökkent. Előfeltevésünk szerint – amelyet a növényi kriptokrómokban megfigyelt fotociklusra alapoztunk – az aszpartát egy protont ad az anionos FAD gyöknek. A növényi kriptokrómokban erre 1.5 μs -mal a gerjesztést követően kerül sor. Az N378D mutáns

esetében az anionos FAD gyök 3.3 μs időállandóval relaxálódott, mindeközben azonban nem volt abszorpcióváltozás megfigyelhető az 500-700 nm-es tartományon, ami a semleges FAD gyök megjelenését jelezte volna. Az egyes hullámhosszakon megfigyelt lecsengések amplitúdójából megszerkesztett spektrumot megfigyelve a 30 μs -hoz tartozó spektrum az anionos FAD gyök és a semleges triptofán gyök lineáris kombinációjával illeszthető. Megszerkesztettük azt a spektrumot, amit akkor kellett volna megfigyelnünk, ha az anionos gyök protonálódása megvalósul (piros szaggatott vonal a 4.12 ábrán), de ez jelentősen eltért a megfigyelt spektrumtól.



3.20 ábra Az N378D esetében megfigyelt kinetikai görbék. A jobb oldalon (felül) a spektrális illesztés a gerjesztést követő $t=0$ illetve 30 μs esetében. A gerjesztést követően az anionos FAD gyök és a triptofán kation gyök spektruma látható. A 300 ns-os fázis a triptofán kation gyök és a semleges triptofán gyök különbségével illeszthető. A 30 μs -os fázis esetében azonban nem figyelhető meg a FAD protonálódása és a FADH \bullet megjelenése

Egy másik szembetűnő különbség a mutáns és a vad típusú fehérje között a milliszekundumos időskálán volt megfigyelhető: Míg a WT fehérjében a terminális FAD \bullet^- Wc \bullet gyökpár (515 nm-en megfigyelve) 2 ms alatt gyakorlatilag – pH-független módon – teljesen rekombinálódott, addig az N378D mutáns fehérjében ugyanez sokkal lassabban és pH-függő módon valósult meg (pH 7,5-nél 22 ms-os, pH 6,5-nél 10 ms-os időállandóval).

Összehasonlítva a vad típusú fehérjén és az N378D mutánsban végzett méréseket a következő következtetéseket tettük:

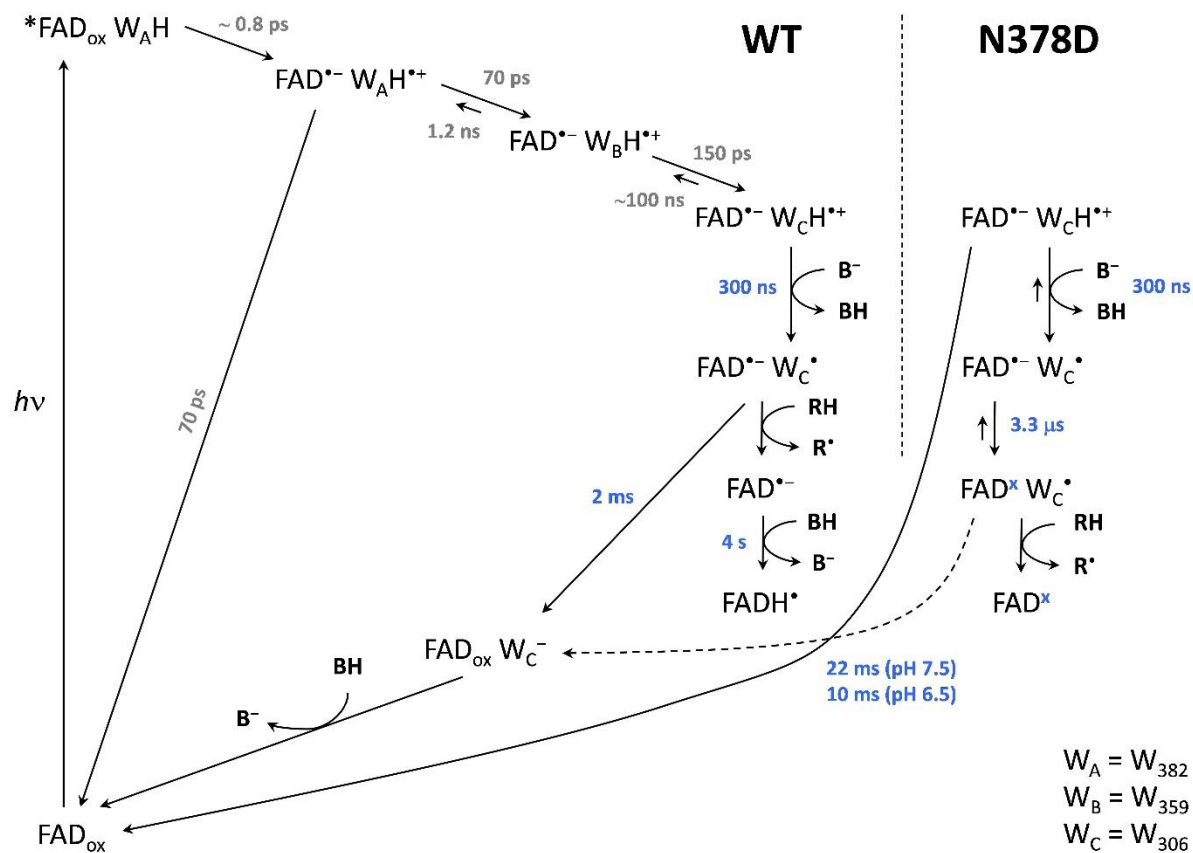
1. Az N378D mutánsban a terminális $\text{FAD}^{\bullet-}$ $\text{W}_\text{C}\text{H}^{\bullet+}$ gyökpár képződésének kvantumhatásfoka valamivel alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad típusú fehérjében (50% vs. 65%), de még mindig sokkal magasabb, mint az *Arabidopsis thaliana*-ból származó növényi kriptokrómban – AtCRY1 – (20% a legjobb ismert kísérleti körülmények között⁴⁶). Ezek a különbségek valószínűleg a $\text{FAD}^{\bullet-}$ $\text{W}_\text{C}\text{H}^{\bullet+}$ pár kialakulását megelőző (ultragyors) reakciók különbségeiből adódnak, amelyeket ezzel a kísérleti elrendezéssel nem tudunk felbontani.

2. A $\text{W}_\text{C}\text{H}^{\bullet+}$ deprotonálódásának kinetikáját nem befolyásolta az N378D mutáció – ugyanolyan volt, mint a vad típusú fehérje esetében (~300 ns) – hasonló volt az AtCRY1 esetében megfigyelt deprotonálódási sebességhez is (~200 ns)⁴⁷.

3. A $\text{FAD}^{\bullet-}$ gyök viselkedése nagyon eltérő a három összehasonlított fehérje esetében. A vad típusú fehérjében a protonálódása nagyon lassú (~ 4 s) és csak olyan külső redukálószer (cisztein) jelenlétében volt megfigyelhető, amely részben megakadályozta a $\text{FAD}^{\bullet-}$ és $\text{W}_\text{C}^{\bullet}$ közötti rekombinációt azáltal, hogy az utóbbit redukálta. A növényi kriptokrómban a $\text{FAD}^{\bullet-}$ ~1,5 μs alatt protonálódik⁴⁸, valószínűleg egy aszparaginsav (D396 a AtCRY1-ben), amely a FAD izoalloxazin gyűrű N5 atomjával szemben áll. Hasonló viselkedést feltételeztünk az N378D mutáns esetében is és megfigyeltünk egy hasonló időállandóval (3,3 μs) rendelkező kinetikai fázist, de annak spektrális jellemzői nagyban eltértek a $\text{FAD}^{\bullet-}$ protonálódásától vártaktól, mivel nem volt megfigyelhető a FADH^{\bullet} gyök létrejötte. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az N378D mutáns EcPL 3,3 μs -os fázisa a többé-kevésbé tipikus spektrumú $\text{FAD}^{\bullet-}$ gyököknek egy spektrálisan nem tipikus flavin gyökállapottá (vagy több állapot keverékévé) való átalakulását tükrözi, amelyet az egyszerűbb jelölés kedvéért FAD_X -nek neveztünk el.

4. Az N378D mutáns EcPL-ben a nem tipikus FAD_X flavingyök 22 ms alatt rekombinálódott 7,5 pH-n, 6,5 pH-n pedig lényegesen gyorsabban (10 ms) (4.10 b ábra). Mindkét sebesség sokkal lassabb, mint a pH-független rekombináció a vad típusban megfigyelt $\text{FAD}^{\bullet-}$ - $\text{W}_\text{C}^{\bullet}$ rekombináció (2 ms).

Eredményeinket a **3.21** ábrán összegeztük.

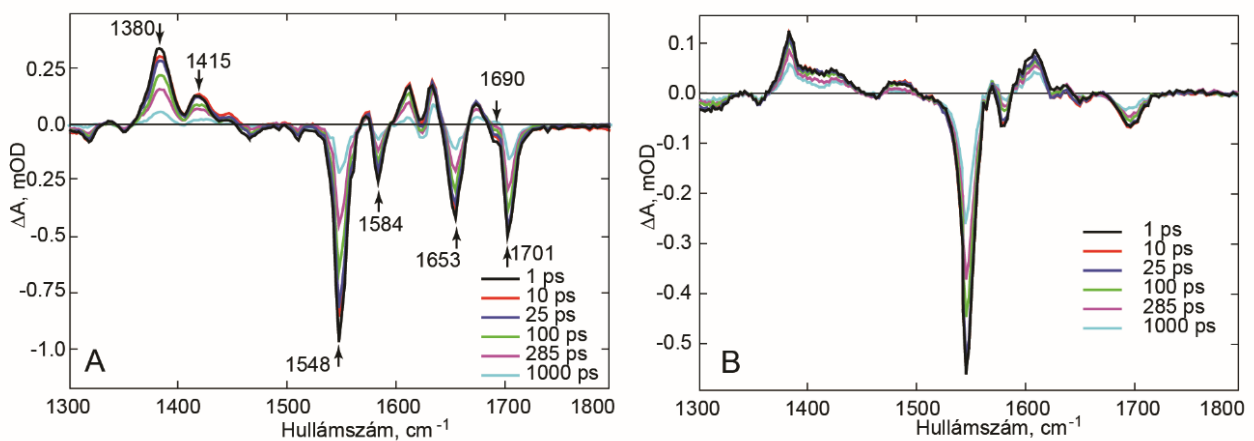


3.21 ábra A vad típusú oxidált fotoliáz esetében az anionos flavin gyök nagyon lassú (~4s) protonálódása figyelhető meg. Az N378D mutánsban a feltételezettől eltérően nem az anionos flavin gyök nem protonálódik, hanem egy nem jellegzetes FAD_x redox állapot valósul meg mintegy 3.3 μ s alatt, majd 22 ms (pH 7.5) alatt rekombinálódik.

A 3.21-es ábrán láthatóknak megfelelően az aszpargin aszpartátra való cseréje nem alakította a fotoliázt kriptokrómmá, a csere ellenére ugyanis nem figyelhető meg az anionos flavin gyök protonálódása, ami egy lényeges momentum a növényi kriptokrómok fotociklusában. Ezzel a mutációval tehát nem lehet kriptokrómmá kapcsolni a fotoliázt.

3.6 Az AppA funkciója nem függ az elektron transzfertől

Az PixD nevű BLUF fehérjén végzett kísérletek során a Kennis csoport elektron transzfer folyamatot figyelt meg ami alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az elektron transzfer jelensége meghatározó szerepet játszik a fotoaktiváció folyamatában ^{49,50}. Saját – az AppA esetében elvégzett – tranziens infravörös méréseinkben (3.22 ábra) nem láttuk az elektron transzfer megvalósulását. Az AppA TRIR spektrumai túlnyomórészt megegyeztek az FMN spektrumaival, ahol nem lép fel elektron transzfer. A FAD esetében ez már nem mondható el, a ribitil lánc végén elhelyezkedő adenin gyűrű a kromofór úgynevezett zárt pozíciójában át tud adni egy elektront az izoalloxazin gyűrűnek és ez a tranziens infravörös spektrumban látszódik is ⁵¹.

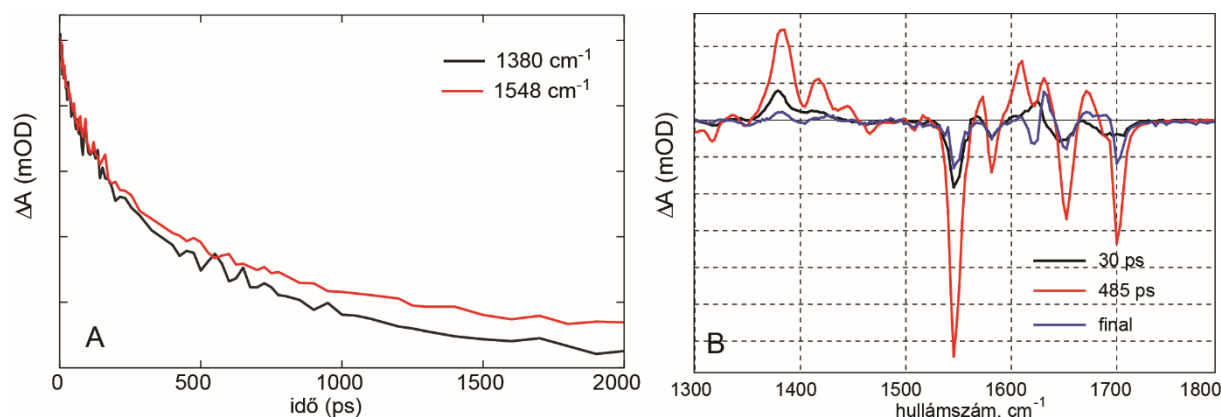


3.22 ábra A) AppA és B) FMN tranziens infravörös spektrumai különböző késleltetési időknél

Az 3.22-es ábrán jól látható, hogy az FMN és az AppA TRIR spektruma a legtöbb helyen átfed: a két legnagyobb frekvenciájú csúcs – ahogyan ezt az előző fejezetben tárgyaltuk - flavin C2 (1652 cm^{-1}) atomjánál illetve C4 (1701 cm^{-1}) atomjánál található karbonilcsoportok rezgéseitől származik. Az 1548 cm^{-1} -nél illetve 1584 cm^{-1} -nél található módusok pedig a flavin izoalloxazin gyűrűjének rezgései. Az 1380 cm^{-1} és 1415 cm^{-1} -nél található módusok a flavin gerjesztett állapotának rezgései – mivel mindkét spektrumban megtalálható – amelyet a gerjesztett állapot markereként használtunk.

Az 3.23 A ábrán látható a gerjesztett állapot abszorpciójának, illetve az alapállapot abszorpciójának a relaxációja vad típusú (egyben sötét állapotban levő) AppA esetében, amely

egészen a hosszú késleltetési időkig jól együtt fut. Ha a gerjesztést követő időknél jelentős különbség mutatkozna, azt jelentené, hogy a gerjesztést követően létrejött egy intermedier állapot, aminek következtében a FAD gerjesztett állapota megszűnik. A B. ábrán látható a vad típusú sötét állapotú AppA méréseken végzett globális illesztés eredménye, amely egy heterogén mintegy 30 és 500 ps-os relaxációs fázis létezését támasztja alá.

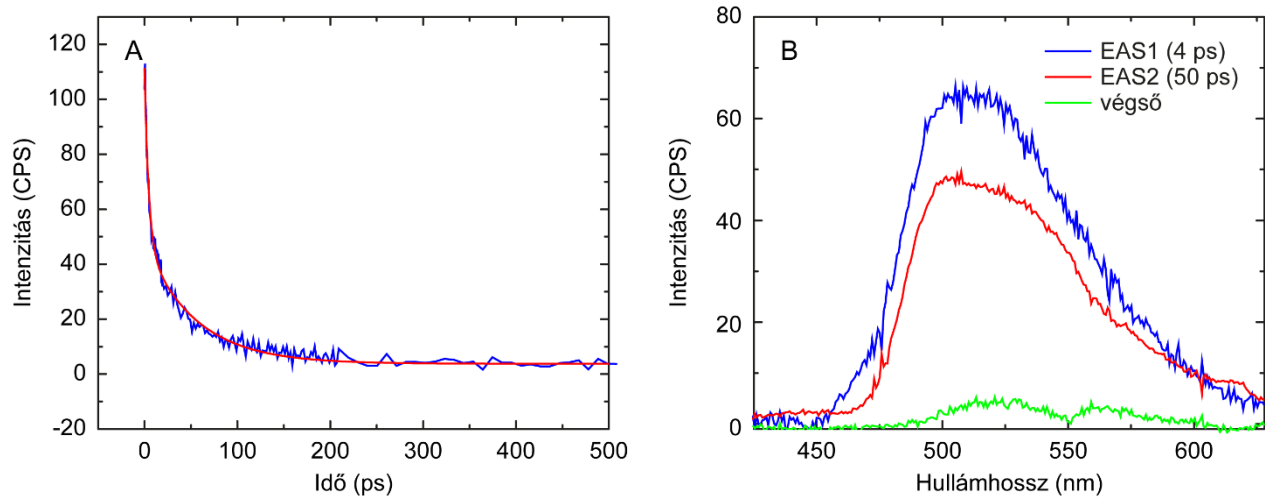


3.23 ábra. Az A) ábrán a gerjesztett állapot és az alapállapot abszorpciójának relaxációja látható. A B) ábrán a különböző időállandókhoz tartozó spektrumok (DAS=Decay Associated Spectra) láthatóak.

Annak érdekében, hogy az elektron transzfer természetét karakterizáljuk az AppA-ban két utat követtünk: létrehoztunk olyan mutánsokat amelyek kizárják az elektron transzfer lehetőségét, mivel a FAD környezetéből eltávolítottuk az összes olyan aminosavat, amely elektron donor lehet; ilyen a Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA_{BLUF} mutáns, amelyről a következő fejezetben lesz szó. A másik út olyan mutánsok létrehozása, amelyben biztosan megvalósul az elektron transzfer. Ebben az esetben a kézenfekvő választás az Y21W AppA mutáns volt, amelyben annak érdekében, hogy az elektron transzfer folyamat hatékonyságát felerősítsük a közeli tirozint (Y21) egy triptofánra cseréltük, a triptofán esetében ugyanis a töltésszétválás folyamatának szabad entalpia változása kisebb (negatívabb), mint a tirozin esetében ⁵². A fotoindukált elektron transzfer folyamat karakterizálása érdekében tranziens fluoreszcencia spektroszkópiái, valamint látható és infravörös tranziens abszorpciós méréseket végeztünk.

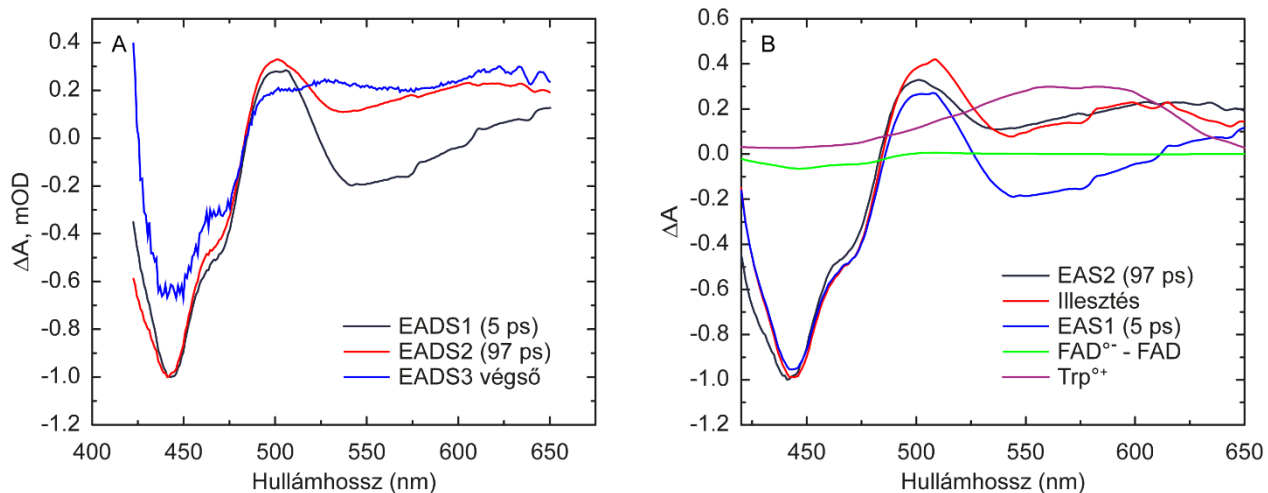
A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiái méréseink a mutáns esetében egy a gerjesztett állapot nagyon gyors relaxációját mutatták (**3.24 ábra**), szemben a vad típusú AppA-n végzett mérésekkel, amelynek esetében a fluoreszcencia lecsengés szintén heterogén volt, de a

domináns időállandók jóval hosszabbak voltak (150 ps és 670 ps). Abban az esetben, ha a FAD környezetéből eltávolítottuk a lehetséges elektron donorokat (Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA_{BLUF} mutáns), a fluoreszcencia élettartam teljes mértékben megegyezik az FMN fluoreszcencia élettartamával (3.8 ns).



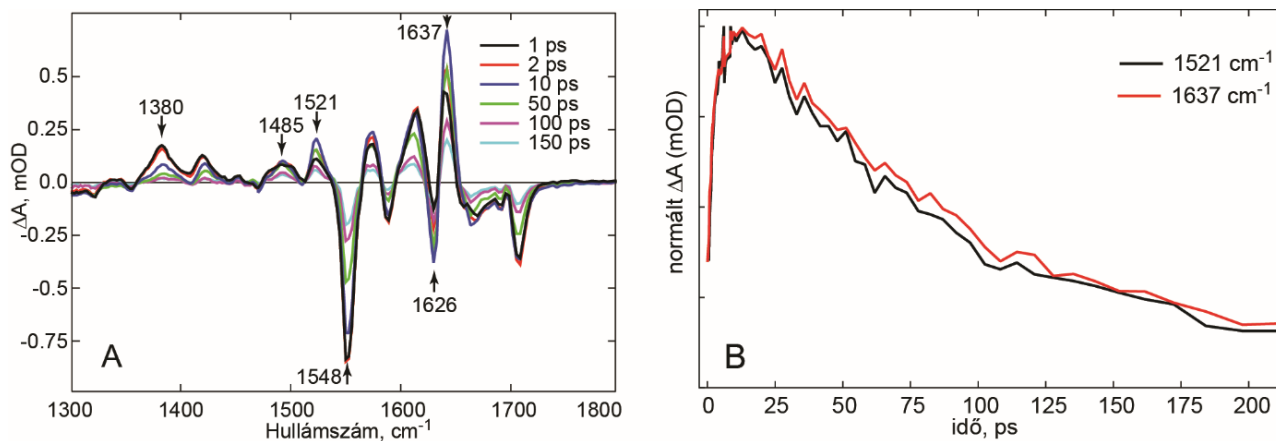
3.24 ábra Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiai mérések az Y21W mutánsban. A) 520 nm esetében megfigyelt kinetika két élettartammal volt illeszthető: $\tau_1 = 4.4 \pm 0.2$ ps, $\tau_2 = 54.5 \pm 2.4$ ps B) A globális illesztéssel kapott EAS spektrumok időállandói nagyon hasonlóak voltak az egyedi kinetikánál kapott időállandókkal

Az Y21W mutánsban végzett látható transziens abszorpciós kísérletek egy hasonlóan heterogén lecsengést eredményeztek, a spektrumok alakjából azonban következtetni lehetett a gerjesztést követő fotofizikai folyamatokra. A gerjesztést követően (EADS1) a gerjesztett állapot és az oxidált állapot különbségspektruma (FAD* - FAD) látható, amely 5 ps-ot követően alakul át az EADS2 spektrummá. Ez a spektrum jól modellezhető a flavin anionos gyök és a triptofán kation gyök spektrumával (3.3 ábra), ami megfelel annak a várakozásnak, hogy a gerjesztés következtében a gerjesztett flavin elvon egy elektront a közeli triptofánról, vagyis a következő folyamat játszódik le: $Y21-FAD \rightarrow Y21^{+}FAD^{\bullet-}$.



3.25 ábra A) Az Y21W mutáns transziens abszorpciós adatainak végzett globális illesztés során kapott adatok B) A második EADS spektrumot a flavin gerjesztett állapotának a spektrumával, az anionos gyökhöz kapcsolódó spektrummal valamint a triptofán kation gyök spektrum kombinációjával lehetett illeszteni

Az elektron transzfer folyamat részletesebb megismerése érdekében infravörös transziens abszorpciós méréseket végeztünk az Y21W mutáns (3.26 ábra).

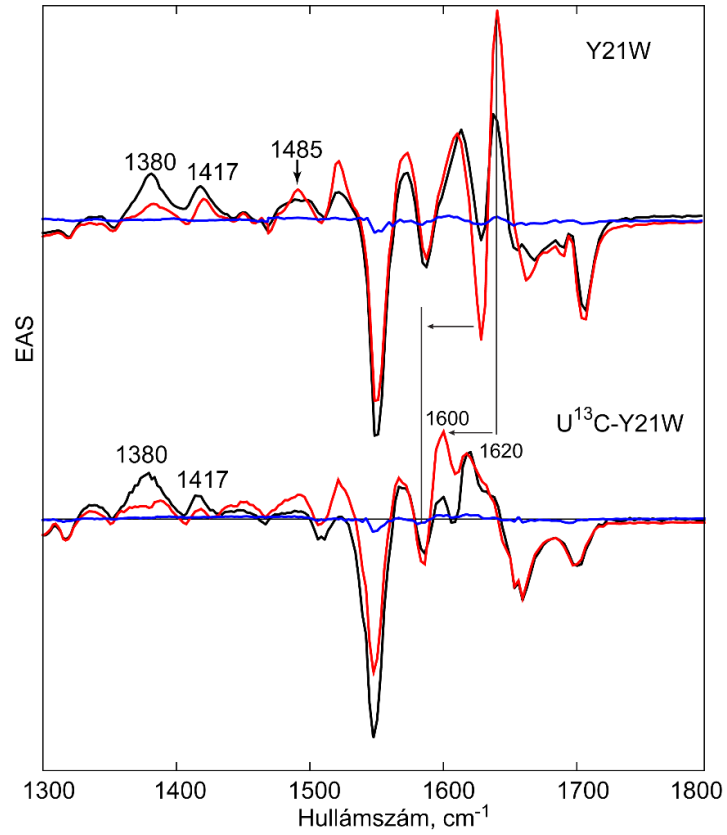


3.26 ábra A) Y21W TRIR spektrumok különböző késleltetéseknél B) Az 1521 cm^{-1} és 1637 cm^{-1} módusok kinetikája.

Az **3.26 A ábrán** jól látható, hogy a sötét állapotú AppA-hoz képest a mutánsban három intenzív csúcs (1521 cm^{-1} , 1626 cm^{-1} , 1637 cm^{-1}) jelent meg, amely 100 ps-on belül változik. Az 1621 cm^{-1}

¹ és 1637 cm⁻¹-nél megfigyelt csúcsok kinetikája gyakorlatilag megegyezik. A 3-as fejezetben tárgyaltak alapján az 1521 cm⁻¹-es csúcs a FAD⁻ gyök az 1485 cm⁻¹-es csúcs pedig triptofán kation gyök rezgési módusának feleltethető meg.

Annak érdekében, hogy a flavin rezgéseit elkülönítsük a fehérje módusoktól, ¹³C jelölést hajtottunk végre. Ennek során a fehérje összes szén atomját – kivétel a flavin kromofór – ¹³C izotópra cseréltük, így egyértelművé vált, hogy mely módusok tartoznak a fehérjéhez (leginkább a flavin körüli aminosavakhoz) illetve melyek az FAD-hez. Amint az várható volt az FAD izoalloxazin gyűrűjének két fő módusa (1548 cm⁻¹) változatlan maradt, az 1700 cm⁻¹-es módus mindössze négy cm⁻¹-es eltolódást mutatott, aminek az oka a C4=O karbonilcsoport és egy közeli aminosav közötti hidrogénkötés megerősödése lehet. Az 1521 cm⁻¹-nél megfigyelt módus nem tolódott el, ami egyértelműen azt mutatja, hogy ez a csúcs az FAD gyök állapotának egyik rezgési módusa. Az 1626 cm⁻¹-es csúcs teljes, az 1637 cm⁻¹-es csúcs részleges eltolódása az alacsonyabb frekvenciák felé arra utal, hogy ezek a módusok a fehérjéhez tartoznak és várhatóan vagy a triptofán gyök állapotának megjelenését mutatják. Az 1637 cm⁻¹-es csúcs csak részlegesen mozdul el a ¹³C jelölés következtében, ami arra utal, hogy ez a csúcs az FAD-hez is köthető. Az Y21W mutáns esetében tehát egyértelműen megfigyelhetőek az anionos flavin gyök állapot és a triptofán kation gyök megjelenése, szemben a vad típusú AppA-val, ahol ezek a gyök állapotok nem voltak megfigyelhetőek.



3.27 ábra A) Y21W TRIR EAS spektrumai B) A ^{13}C jelölt Y21W mutánson végzett TRIR mérések EAS spektrumai. A spektrumokból jól látható, hogy a flavin módusok nem tolódnak el, míg a fehérje módusok jelentős eltolódást mutatnak az alacsonyabb frekvenciák irányába

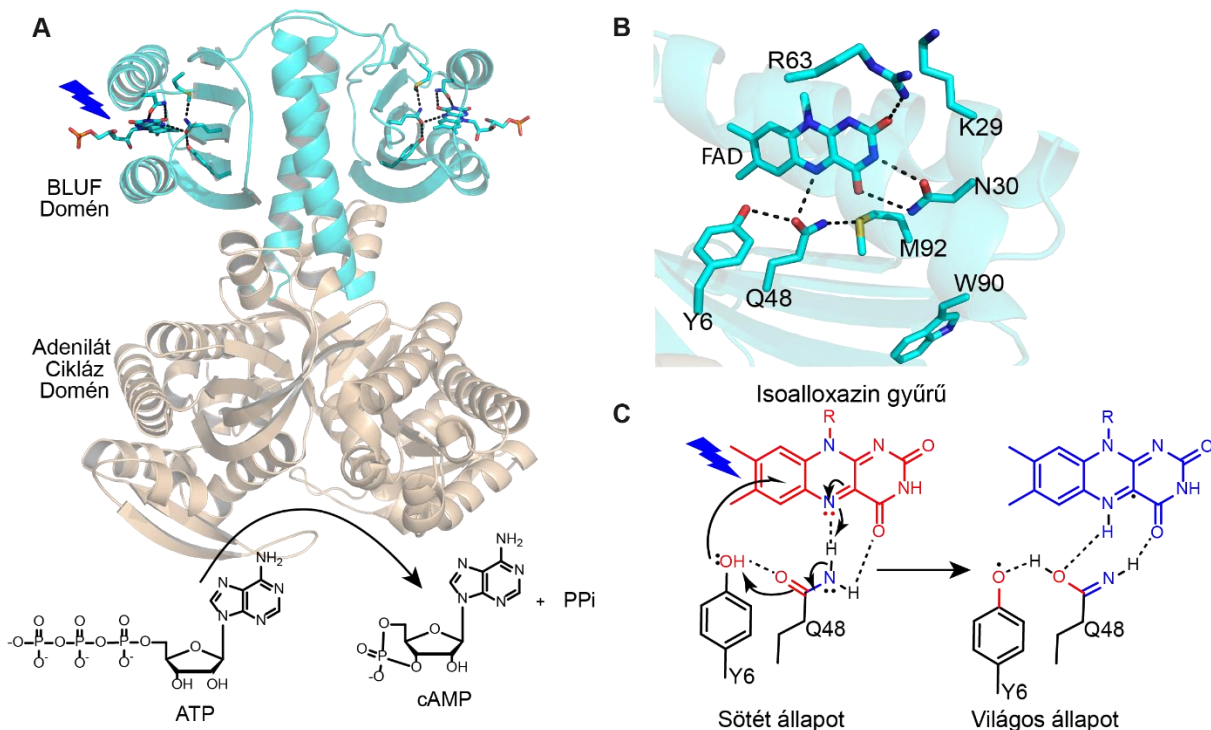
3.7 Az OaPAC funkcionális dinamikájának vizsgálata

Proton-kapcsolt elektron transzfer

Az adenilát-ciklázok (AC-k) az enzimek fontos osztályát alkotják, amelyek az adenzin-trifoszfát (ATP) ciklikus adenzin-monofoszfáttá (cAMP) és szervetlen pirofoszfáttá (PPi) való átalakításában játszanak meghatározó szerepet (**3.28 ábra**). A fotoaktivált adenilát-ciklázok (PAC) az adenilát cikláz enzimek egy olyan alcsoportját képviselik, ahol az ATP átalakítása G-protein segítségével alakul át cAMP-vé.

A kék fény által aktivált adenilát ciklázok működése általában egy BLUF vagy ritkábban egy LOV domén segítségével valósul meg. Az első ismert PAC az *Euglena gracilis* nevű csillós ostoros egysejtűből lett izolálva, és ennek megfelelően EuPAC-nak lett elnevezve. Az EuPAC egy 400 kDa méretű heterotetramer, amely két-két α és β egységet tartalmaz, amelyek egyenként két BLUF és két AC domént tartalmaznak. Az EuPAC felfedezését követően kisebb méretű bakteriális PAC-okat is találtak, amelyek esetében az AC aktivitást szintén BLUF domén szabályozza. Az egyik ilyen legismertebb ilyen enzim a bPAC, amely a szulfidoxidáló baktériumban (*Beggiatoa sp*) található meg. A bPAC-nek a kis mérete mellett kedvező tulajdonsága, hogy alacsony aktivitást mutat sötétben, és mintegy 300-szoros növekedést mutat kék fény abszorpciót követően.

Tekintettel arra, hogy a cAMP számos jelátviteli folyamatban játszik szerepet, a cAMP termelés fényvezérelt szabályozása a PAC enzimeket nagyon vonzó optogenetikai eszközzé teszi. Az EuPAC az *Aplysia* nevű tengeri haslábú neuronjaiban expresszálandóvá lehetővé vált a neuronstimuláció optikai kontrollja⁵⁶. A bPAC-ot a közelmúltban transzgenikus egerekben alkalmazták motilitásukat vesztett spermiumok flagelláris mozgásának helyreállítására⁵⁷. A közelmúltban egy újabb ígéretes fotoaktivált adenilát cikláz fedeztek fel: az *Oscillatoria acuminata* cianobaktériumban, amelynek különlegessége, hogy nagyon alacsony aktivitást mutat sötétben – a legalacsonyabb az eddig ismert PAC fehérjék közül – lehetővé téve a fotoindukált cAMP termelés finomabb szabályozását⁵⁸. Ennek megfelelően kiváló optogenetikai eszköz lehet, a sötétben ugyanis szinte nem mutat aktivitást, megvilágítás hatására azonban azonnal megindul a cAMP termelés. Az OaPAC (lásd 5. 29 A. ábra), egy 366 aminosavból álló homodimer, amely egy N-terminális BLUF doménből és egy C-terminális AC doménből áll ^{58,59}.



3.28 ábra A. OaPAC egy homodimer, amely egy BLUF doménből (cián) illetve egy adenilát cikláz (homok színű) doménből áll. Ez utóbbi felelős az ATP \rightarrow cAMP konverzióért. (PDB: 5x4t⁵⁹). B. A FAD körüli hidrogén kötés hálózat, amely a Y6, Q48 and N30 konzervált aminosavakat tartalmazza C. A fotoaktiváció javasolt modellje.

Az OaPAC röntgenkristallográfiás szerkezetét vizsgálva (PDB: 5x4t) megállapítható, hogy a flavinkötő zseb ugyanazokat a konzervált aminosavakat tartalmazza, mint a többi ismert BLUF fehérje. Az izoalloxazin gyűrű körül megtalálható a konzervált tirozin (Y6), glutamin (Q48) és aszparagin (N30), míg egy konzervált metionin (M92) hidrogénkötést hoz létre a Q48-as glutaminnal (5.22 B. ábra). A félig konzervált triptofán (W90) a Trp_{kinn} konformációban van, hasonlóan két másik BLUF fotoreceptor szerkezetében megfigyelt módon (PixD, PDB: 2HFN; BlsA PDB: 6W6Z). A FAD C2=O karbonilja hidrogénkötéssel kapcsolódik a 69-es argininhez (R69), míg a 29-es lizin oldallánca (K29) több mint 5 Å távolságra van, ami azt jelzi, hogy a C2=O egyetlen hidrogénkötést hoz létre ezzel szemben a PixD-ben két reziduum (N31 és R65) képez hidrogénkötést a C2=O csoporttal. A vad típusú OaPAC nagy felbontású kristályszerkezeteinek összehasonlítása világos és sötét állapotában azt mutatja, hogy fényelnyelés hatására a glutamin (Q48) C γ -C δ kötése körülbelül 40°-kal elfordul, míg a Q48 N ϵ 2 atomja eltávolodik az N5-től és közelebb kerül a flavin C4=O csoport O4-éhez. Világos állapotban a Q48 hidrogénkötést fogad el a szomszédos konzervált tirozintól (Y6). Ohki és munkatársai⁵⁹ egy olyan mechanizmust

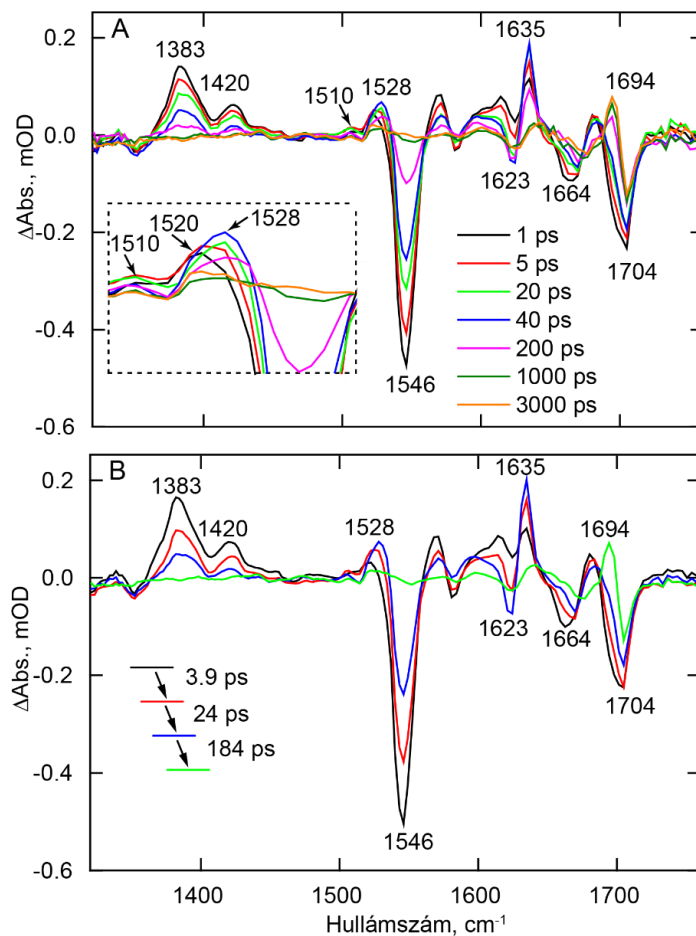
javasoltak, amely magában foglalja a Q48 oldallánc tautomerizációját, valamint a Q48 keto forma és az Y6 közötti hidrogénkötési kölcsönhatást (3.27 C. ábra). Ez a mechanizmus megköveteli az FADH• és Y6• gyökpár létrejöttét, amely becslésük szerint egy nanoszekundumon belül a világos állapot létrejöttéhez vezet.

Munkánk során első lépésként a fotoaktiváció mechanizmusát vizsgáltuk tranziens infravörös spektroszkópia (TRIR) valamint látható tranziens abszorpciós spektroszkópia alkalmazásával (TA). Vizsgálataink arra vezettek, hogy a vad típusú OaPAC-ban a tirozin protonkapcsolt elektrontranszfer (PCET) során elektront és közvetett módon protont ad a flavinnak, amely a semleges flavin gyök (FADH•) kialakulásához vezet. A fotoaktiváció vizsgálatának során fluorotirozin analógok beépítésével vizsgáltuk az Y6 tirozinnak a proton-kapcsolt elektron transzferben való szerepét. Ennek során az Y6 tirozint olyan tirozin analógokkal helyettesítettük, amelyekben a fenol gyűrűn különböző pozíciókban fluor helyezkedett el. A fluor jelenléte megváltoztatta a tirozin pK-ját, jelentősen befolyásolva a fotoaktiváció hatékonyságát. A TRIR kísérletek alapján csak a 3-FY6 analógot tartalmazó fehérjében valósult meg a világos állapot, de sokkal lassabban, mint a vad típusú fehérjében. A 3,5-F2Y6, 2,3,5-F3Y6 és 2,3-F2Y6 OaPAC variánsok esetében a világos állapot nem jött létre.

A **3.29 ábra** a vad típusú OaPAC TRIR spektrumának időbeli alakulását mutatja a gerjesztést követően. A TRIR különbségi spektrumok negatív és pozitív „csúcsokat” (vagy sávokat) tartalmaznak, ahol a negatív csúcsok legtöbbször („bleach” vagy kifehéredés) az izoalloxazin gyűrű alapállapotának kiürülésével hozhatóak kapcsolatba. A pozitív csúcsok (tranziens abszorpciók) az izoalloxazin gyűrűben a gerjesztés következtében létrejövő rezgési módusok.

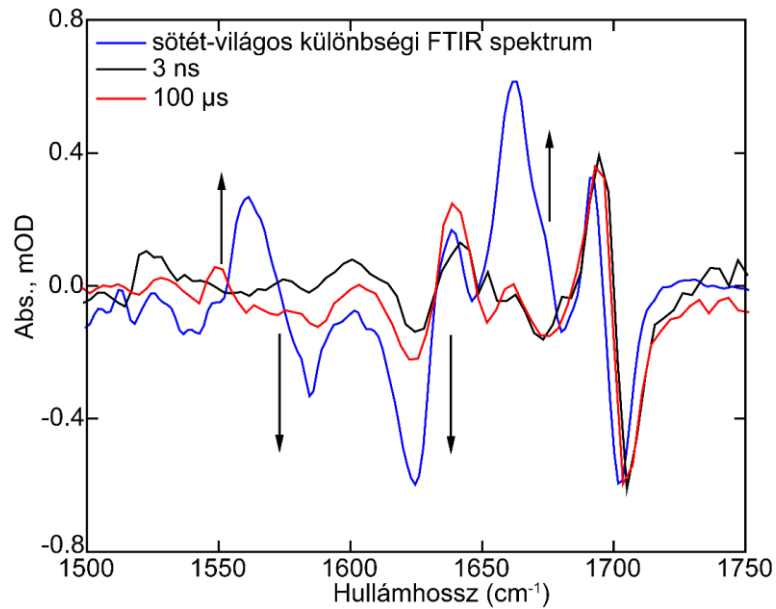
A vad típusú OaPAC TRIR-spektrumai hasonlóak az AppA és a PixD esetében megfigyelt BLUF domén infravörös spektrumokhoz^{49,53,54,60} Az 5.30 B. ábrán a globális illesztés eredményeként kapott EADS (Evolution Associated Difference Spectrum) spektrumok láthatóak. Az EADS spektrumok meghatározásához a legegyszerűbb szekvenciális modellt (A→B→C→D) alkalmaztuk. A globális illesztés során ilyen módon három időállandót kaptunk (3,9 ps, 24 ps és 184 ps), a negyedik komponens a végső vagy aszimptotikus állapothoz tartozik, amely az elméleti végtelen időállandó. Az első EADS a FAD gerjesztett állapotának (FAD*) feleltethető meg vad típusú OaPAC-ban. A gerjesztett állapotot 1383 és 1420 cm⁻¹-nél tranziens csúcsok, valamint az alapállapotot jellemző bleachek (~1546, ~1664 és ~1704 cm⁻¹-nél) jellemzik, amelyek az

izoalloxazin gyűrű C10a-N1, C2=O és C4=O rezgési módusainak felelnek meg (lásd 5.1 Táblázat).^{33,60} Szintén az első EADS spektrumban 1520 cm⁻¹-nél egy tranziens csúcs figyelhető meg, ami azt jelzi, hogy a FAD^{•-} intermedier a gerjesztés után nagyon korai időpontokban jön létre (5. 31 A. ábra, kis ábra)^{33,48}. A második EADS 3,9 ps időállandóval jön létre, és ezt a spektrumot egy új tranziens megjelenése jellemzi ~1528 cm⁻¹-nél, amely a félig redukált flavin (FADH[•]) rezgési markere, amely a flavodoxinban és a glükóz-oxidázban is megfigyelhetünk^{33,61}. Az FADH[•] tranziens 1528 cm⁻¹-nél 24 ps időállandóval fejlődik ki és 184 ps-os időállandóval relaxálódik. A FADH[•] képződéssel és relaxációval egyidejűleg 1635 cm⁻¹-nél egy másik tranziens képződését figyeljük meg, amely egybeesik az 1623 cm⁻¹-nél megfigyelhető bleach növekedésével. Az 1623 (-)/1635 (+) cm⁻¹ rezgési módusok egy flavin gyök rezgési módusának és/vagy egy Tyr gyöknek felelnek meg. A negyedik EADS spektrum 184 ps-os időállandóval jön létre, és az aszimptotikus végső spektrumnak felel meg. Az aszimptotikus spektrumban megfigyelhető legfőbb változás az ~1694 cm⁻¹-nél megfigyelhető tranziens csúcs kialakulása, ami a világos állapot megvalósulását tükrözi; ez a rezgési módus a flavin C4=O rezgésének felel meg. Az 1704 cm⁻¹-ről 1694 cm⁻¹-re történő eltolódás a flavin körüli hidrogénkötések gerjesztés utáni átrendeződését tükrözi, a frekvencia csökkenése összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy világos állapotban a C4=O karbonil egy második hidrogénkötésben is részt vesz.



3.29 ábra. Vad típusú OaPAC sötét állapotbeli TRIR spektrumai. A. A vad típusú OaPAC spektrumainak időbeli fejlődése a 450 nm hullámhosszú gerjesztést követően 100 fs és 3 ns között rögzítve. A beágyazott ábrán a FADH^{\bullet} -hoz (1528 cm^{-1}) és a $\text{FAD}^{\bullet-}$ -hoz (1520 cm^{-1}) tartozó tranziens csúcsok láthatók. **B.** Vad típusú OaPAC EADS spektrumai az (ábra A részén látható) TRIR adatok globális illesztéséből.

A vad típusú OaPAC esetében a TRIR időskálája (3ns) nem volt elegendő a világos állapothoz vezető fehérjemódusok teljes kifejlődésének megfigyeléséhez, ezért egy másik módszert (Transient Multiple Probe Spectroscopy = TRMPS) is alkalmaztunk a fehérjedinamika további nyomon követésére.

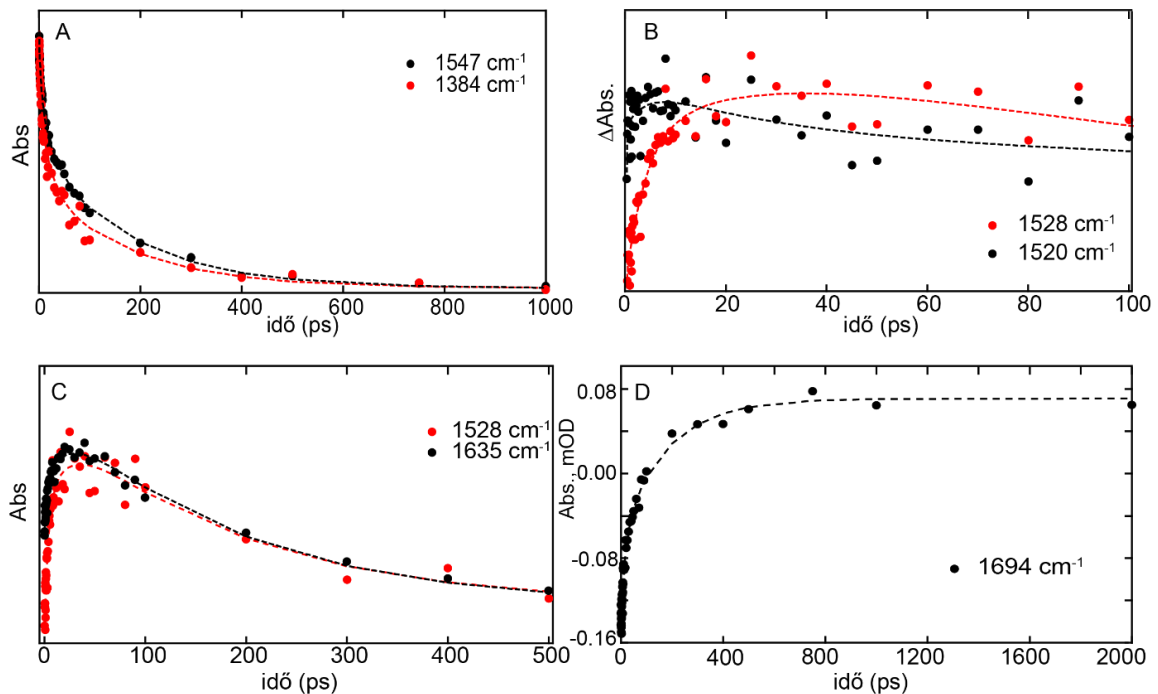


3.30 ábra A 3 ns-hoz tartozó TRIR, a 100 μ s-hoz tartozó TRMPS és a (világos – sötét) FTIR spektrumok összehasonlítása.

A 3 ns-os TRIR spektrumot, a 100 μ s-os TRMP spektrumot, valamint az FTIR differencia spektrumot szuperponálva (**3.30 ábra**) látszik, hogy bár a fotociklus során a leglátványosabb változások az első 3 ns-ban következtek be, a későbbiekben további fejlődés következik be. Az FTIR differencia spektrum és az időfüggő infravörös spektrumok közötti különbség az 1550-1660 cm^{-1} tartományban arra utal, hogy a fehérjében 100 μ s-ot követően is (a TRMPS módszer időablakán túl) is strukturális változások következnek be; ezek valószínűleg az AC doménben végbemenő strukturális változásoknak feleltethetők meg.

Annak érdekében, hogy további betekintést nyerjünk az OaPAC fotociklusába, összehasonlítottuk az egyes tranziens csúcsok és bleachek kinetikáját (**3.29 ábra**) Az 1383 cm^{-1} hullámszámnál megfigyelhető tranziens (ez a flavin gerjesztett állapotának rezgési markere) gyorsabban relaxálódik, mint ahogyan a bleach (1546 cm^{-1}), ami arra utal, hogy a gerjesztett állapot relaxációjában egy elektron transzfer folyamat vesz részt. Az 3.29 B. ábrán az anionos ($\text{FAD}^{\bullet-}$) és a félig redukált (FADH^{\bullet}) flavin gyök kinetikáját hasonlítottuk össze: a az ábrán az látszik, hogy az anionos gyök és a félig redukált gyök szekvenciálisan valósul meg, de nagyon gyorsan követik egymást. Összehasonlítva az 1528 cm^{-1} és az 1635 cm^{-1} tranziens csúcsok kinetikáját jól látszik, hogy ezek megegyeznek, ami arra utal, hogy az 1635 cm^{-1} rezgésmód a flavin FADH^{\bullet} állapotának

rezgési markere. Ezenkívül az 1694 cm^{-1} -nél megfigyelt tranziens (6D. ábra) a világos állapot kialakulásának kinetikáját írja le.



3.31 ábra A TRIR csúcsok időfüggő változása. A. A gerjesztett állapot lecsengésének (1384 cm^{-1}) és az alapállapot újrafeltöltésének (1546 cm^{-1}) kinetikái (az összehasonlíthatóság miatt invertálva). B. A vad típusú OaPAC fehérjében átmeneti gyökök létrejöttének és eltűnésének összehasonlítása. C. 1528 cm^{-1} -nél lévő tranziens gyök kialakulásának és lecsengésének összehasonlítása az 1635 cm^{-1} -es tranziens változásával. D. Az 1694 cm^{-1} hullámszámnál megfigyelhető tranziens kinetikája, ami a világos állapot kialakulásának feleltethető meg. A megfigyelt kinetika időállandója 184 ps.

Az OaPAC fotociklusát összehasonlítva a PixD fotociklusával az figyelhető meg, hogy a világos állapot hasonló lépésekkel valósul meg, de más időállandókkal. A PixD-ben az 1515 cm^{-1} -nél lévő anionos gyökre jellemző tranziens 2,5 ps alatt képződik, majd 20 ps körül relaxálódik, ezt követően jön létre (110 ps alatt) a FADH^\bullet állapot (1535 cm^{-1}). A PixD-ben tehát a $\text{FAD}^* \rightarrow \text{FAD}^{\bullet-} \rightarrow \text{FADH}^\bullet$ fotociklus figyelhető meg hasonlóan a növényi kriptokrómokhoz^{46,62}. A vad típusú OaPAC esetében nem figyelhető meg egyértelműen tranziens csúcs 1515 cm^{-1} -nél, mint a PixD esetében, és nem kanonikus aminosavak esetében (lásd később), ahol az 1515 cm^{-1} -nél megfigyelt csúcs az anionos flavin gyök kialakulására utal. A vad típusú OaPAC-ban az 1520 cm^{-1} -nél megfigyelt tranziens csúcs esetében valószínűleg arról van szó, hogy ez a csúcs az anionos és a félig redukált FAD gyökből együttes megjelenése miatt alakul ki. A FADH^\bullet populáció jelenlétét támasztja alá

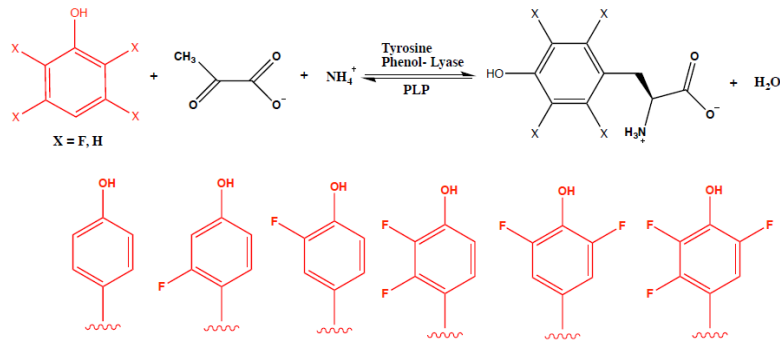
az $\sim 1510 \text{ cm}^{-1}$ -es tranziens gerjesztést követő gyors megjelenése. Mivel az 1510 cm^{-1} -es tranziens a semleges tirozin gyök rezgési markere⁶¹, ez arra utal, hogy a $\text{FADH}^{\bullet}-\text{Tyr}^{\bullet}$ gyökpár a gerjesztést követően nagyon gyorsan jön létre. Ez a feltevés összhangban van az Ohki és munkatársai által javasolt fotoaktivációs modellel⁶³. Az 1520 cm^{-1} tranziens jelenléte arra utal, hogy két lehetséges (párhuzamos) elektronátviteli út létezik, ahol az anionos és a semleges flavin gyök egyidejűleg létrejön.

Az OaPAC fotociklusának vizsgálata fluorotirozin analógok segítségével

Az Y6 egy szigorúan konzervált aminosav minden BLUF-domén fehérjében (Y21 AppA, Y8 PixD, Y7 bPAC, Y7 BlsA esetében), és kritikus a fotoaktivitás szempontjából, mivel bármely más aminosavval - beleértve a fenilalanint is - való helyettesítése fotoinaktív fehérjét eredményez. A tirozin elektron- és/vagy protondonor szerepe pH-függő, és a fenol pKa értéke attól függően változik, hogy a tirozin redukált (pKred) vagy oxidált (pKox). A tirozin pKred és a pKox értéke oldatban 9,9, illetve -2; pH 9,9 felett a tirozin deprotonálódik, és tirozinátot (Y^-) képez, így az elektronátvitel során a semleges tirozin gyök (Y^{\bullet}) keletkezik. A pKred és a pKox közötti pH-értékeknél a tirozin protonálódik, és az $\text{Y}^{\bullet}/\text{Y}$ redoxpár pH-függő potenciálja pH-egységenként 59 mV-tal nő. Végül, ha a pH savasabb, mint a pKox, az elektronátvitel a kationgyököt ($\text{Y}^{\bullet+}$) hozza létre⁶⁴.

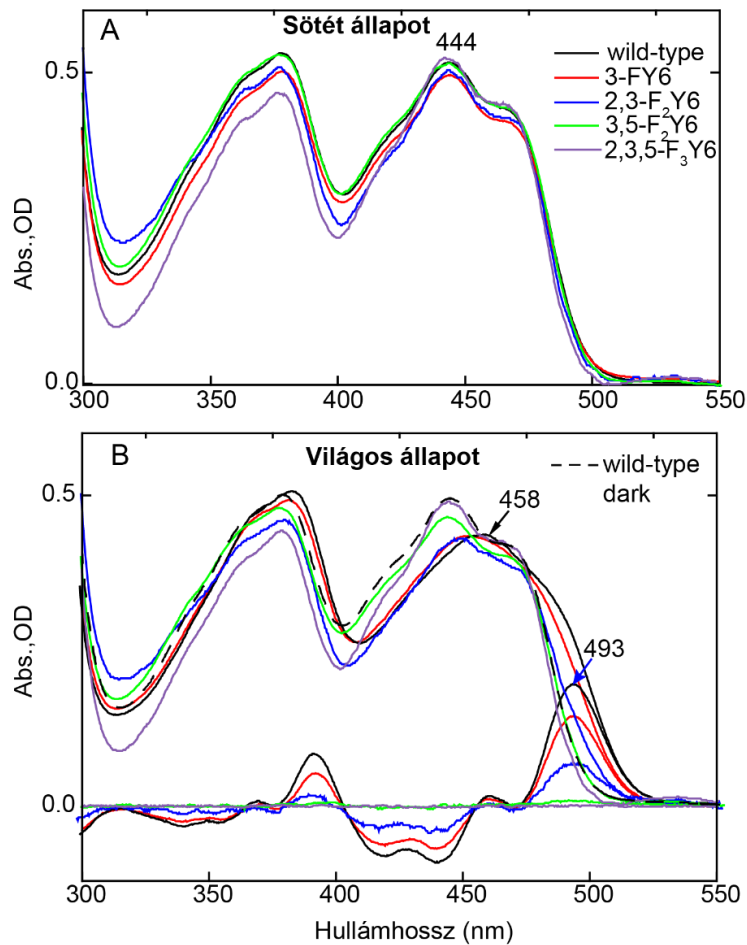
A tirozin pKa szerepének az OaPAC fotoaktiválására gyakorolt hatásának feltárása érdekében ezért az Y6-ot fluorotirozin-analógokkal (F-Tyr) helyettesítettük, hogy a fenol savasságát moduláljuk. A tirozinnal (pKa 9,9) ellentétben a 2,3,5-F3Tyr pKa értéke 6,4, így ~ 3000 -szer savasabb, mint a tirozin, redukációs potenciálja ($\text{Y}^{\bullet}/\text{Y}^-$) ~ 200 mV-val magasabb.

A fotokativáció folyamatának pontosabb megértése érdekében az elektron és egyben proton donor Y6 tirozint fluorotirozin analógokkal helyettesítettük, amelyek esetében a tirozin fenol gyűrűjének különböző pozícióiban egy fluor atom található (lásd **3.32 ábra**), aminek hatására a tirozin analóg pK értéke megváltozik. A legmagasabb pK érték (8.4) a 3-FY analóg esetében a legalacsonyabb pedig a 2,3,5-FY analóg esetében figyelhető meg, a vad típusú fehérje esetében a tirozin pK értéke 9.9.



3.32 ábra A fluorotirozin analógok szintézise (forrás: Seyedsayamdost et al. ⁶⁵) Ezt az eljárást alkalmazták 2-FY, 3-FY, 2,3-F2Y, 3,5-F2Y, and 2,3,5-F3Y fluorotirozin analógok szintézise esetében.

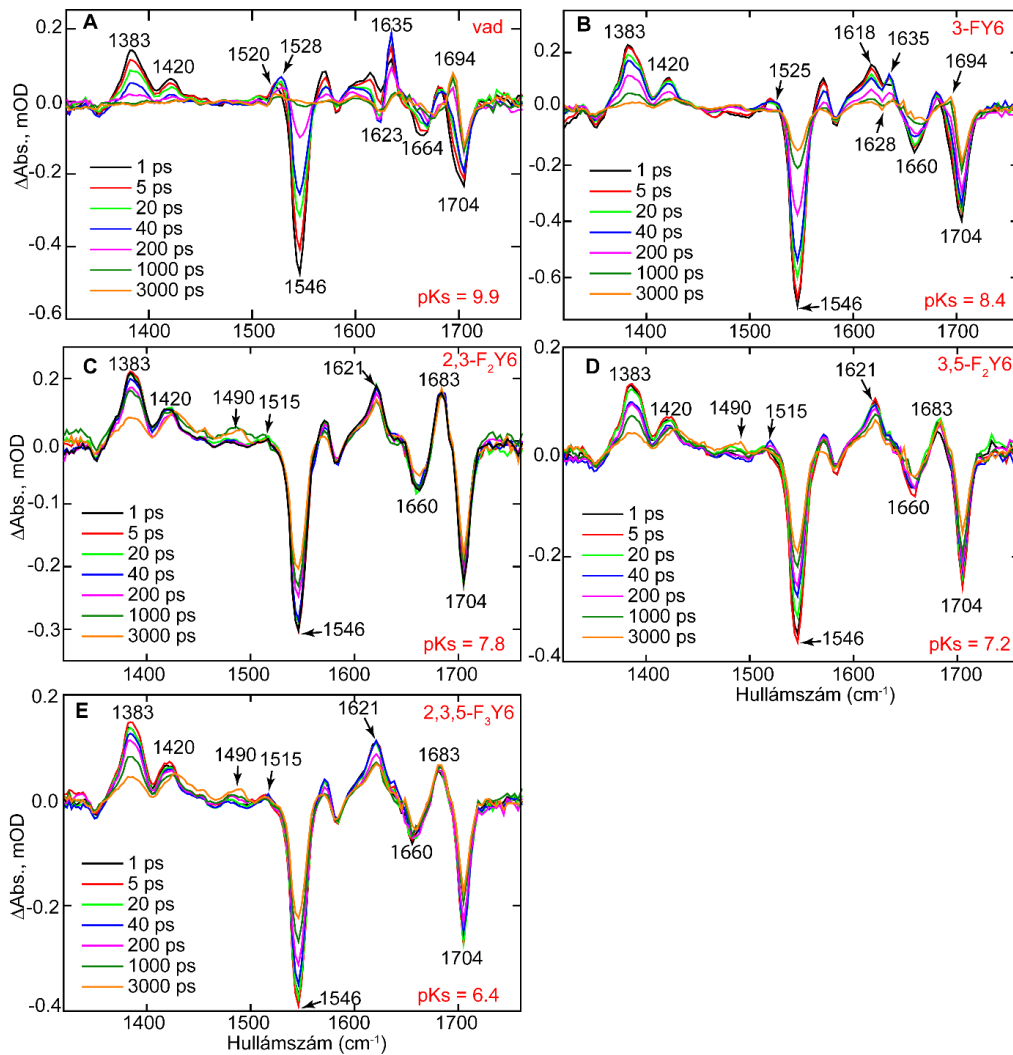
Elsőként a fluorotirozin analógokat tartalmazó OaPAC mutánsok abszorpciós spektrumát mértük meg sötét állapotban és megvilágítást követően. Az **3.33 ábrán** jól látható hogy minden esetben a λ_{max} 444 nm-en van, ami megegyezik a flavin abszorpciós spektrumával a vad típusú OaPAC esetében. Ez arra utal, hogy a fluorotirozin analógok nem zavarták meg drámai módon a flavinkötő zseb környezetét. A kék fényvel való megvilágítás azonban csak a 3-FY6 és 2,3-F2Y6 OaPAC fehérjék flavin abszorpciójában okozott vörös eltolódást. Az eltolódások 10 nm, illetve ~5 nm voltak, míg a kísérlet 10 ms-os időfelbontásán belül sem a 3,5-F2Y6, sem a 2,3,5-F3Y6 OaPAC esetében nem volt megfigyelhető vöröseltolódás. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pK csökkentése befolyásolja a világos állapot létrejöttét, illetve annak stabilitását.



3.33 ábra. Az n-FY6 OaPAC mutánsok elektromos (abszorpciós) spektruma vízben. A sötét és világos állapot abszorpciós spektrumainak összehasonlítása n-FY6 és vad típusú OaPAC esetében. Látható, hogy a flavin elektromos állapotát nem zavarta meg számottevően a fluorotirozin analóg jelenléte. Csak a 3 – FY6 és a 2,3 – F₂Y6 OaPAC mutánsok esetében valósult meg a vörös eltolódás a 450 nm hullámhosszú LED-es megvilágítás hatására.

Az n-FY6 OaPAC mutánsok fotoaktivációjának vizsgálata infravörös tranziens abszorpció spektroszkópia segítségével

A fluorotirozin analógoknak a fotociklusra gyakorolt hatását tranziens infravörös abszorpciós spektroszkópia segítségével is vizsgáltuk. Az **3.34 ábrán** a vad típusú, valamint a 3-FY, 2,3-FY 3,5 FY és a 2,3,5 FY fluorotirozin analógokat tartalmazó mutánsok infravörös tranziens abszorpciós spektrumait hasonlítottuk össze. Az kísérletek hasonló eredményre vezettek mint a PixD esetében, ahol a pK csökkenése megakadályozta a félig redukált FAD létrejöttét^{53,66}. A tranziens infravörös abszorpciós spektrumokból jól látszik, hogy 8-as pK érték alatt már csak az anionos FAD (1515 cm⁻¹) gyök jön létre, de a félig redukált (1528 cm⁻¹) már nem.

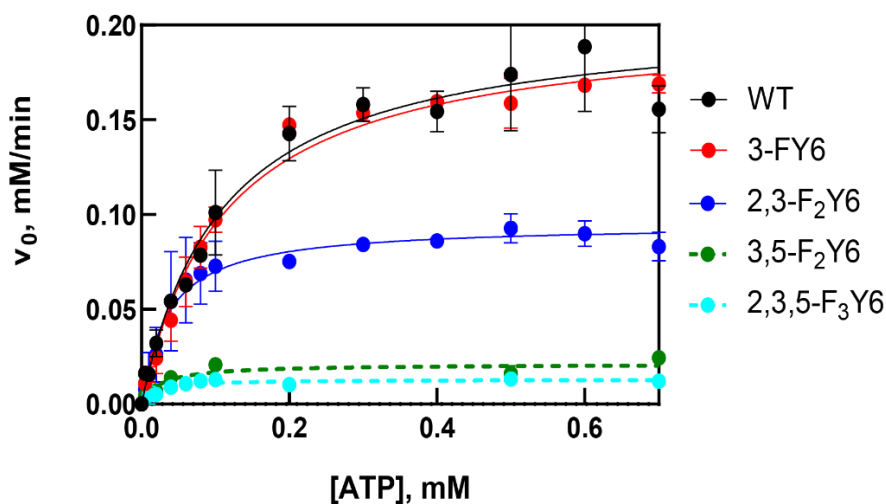


3.34 ábra. A vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok tranzien infravörös abszorpciós spektrumai. A spektrumok 1, 5, 20, 40, 200, 1000 és 3000 ps késleltetéseknél lettek rögzítve. **A.** vad típusú OaPAC esetében jelen van az 1520 és 1528 cm^{-1} csúcs **B.** A 3-FY6 analóg esetében az 1528 cm^{-1} helyett 1525 cm^{-1} csúcs figyelhető meg **C.** A 2,3-F₂Y6 analóg esetében már jól megfigyelhető a 1515 cm^{-1} módus (FAD^{•-}) **D.** 3,5-F₂Y6 és **E.** 2,3,5-F₃Y6

Ez valójában nem meglepő, alacsony pK értéknél ugyanis a tirozinok jelentős része már a gerjesztést megelőzően deprotonált állapotban van, vagyis nem képes a FAD protonálására. A fluorotirozin analógok segítségével végzett mérések bebizonyították azt, hogy a tirozin nemcsak az elektron hanem a proton donor is. Az UV/VIS abszorpciós, valamint az FTIR spektroszkópai mérések pedig arra világítottak rá, hogy a FAD protonálásához (vagyis a félig redukált FAD gyök létrejöttéhez) szükség van a világos állapot létrejöttéhez.

Annak érdekében, hogy a pK és/vagy a redox potenciál változásának az ATP → cAMP konverzió hatékonyságára gyakorolt hatását vizsgáljuk, enzimátikus esszétet végeztünk, melynek

során a pirofoszfát (PPi) képződést vizsgáltuk. Ezekből a mérésekből jól látszik, hogy csak a 3-FY6 és 2,3-F2Y6 fluorotirozin analógokat tartalmazó mutánsok mutattak megfigyelhető aktivitást, míg a 3,5-F2Y6 és 2,3,5-F3Y6-nak nem volt kimutatható aktivitása (**3.35 ábra**). Az adatok a Michaelis-Menten illesztése olyan k_{cat}/K_M értékeket eredményezett a 3-FY6 és 2,3-F2Y6 OaPAC esetében, amelyek összehasonlíthatók a vad típusal. Érdekes módon a 2,3-F2Y6 analógot tartalmazó mutáns aktivitást mutatott kék fény hiányában is, ami azt jelzi, hogy ennek a variánsnak a populációja pszeudo-világított állapotban van, amely képes az ATP-t cAMP-vé konvertálni fény hiányában is.



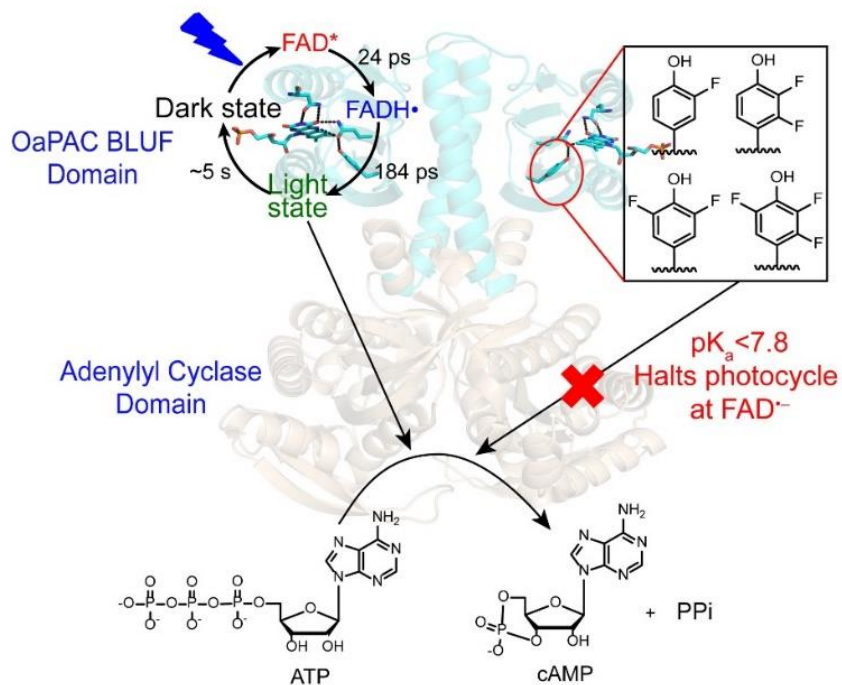
3.35 ábra. A vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok Michaelis-Menten görbéi. Az egyes ATP koncentrációkhoz tartozó sebességi állandók a 340 nm-en megfigyelt időbeni abszorpcióváltozás kezdeti lineáris szakasznak illesztéséből származnak.

Az OaPAC fotociklusa

Bár a BLUF fotoreceptorok fotokémiáját széles körben tanulmányozták több fajta spektroszkópai módszerrel, ezek a vizsgálatok nagyrészt a BLUF domén fehérjékre korlátozódtak, de ha a teljes hosszúságú fehérjét is vizsgálták nem volt jelen a fehérje funkciójához esszenciális partner fehérje^{53,54,67,68}. A teljes hosszúságú OaPAC esetében az a szerencsés helyzet, hogy mind a BLUF domén mind a funkcionális partner – az adenilát cikláz domén – jelen van.

Az előbbieken ismertetett eredmények alapján az PCET folyamat szerepet fontos szerepet játszik az OaPAC enzimatisz aktivitásában. Azokban az esetekben ugyanis ahol az alacsony pK érték

miatt csak a tirozin és a FAD közötti elektron transzfer és ennek következtében az anionos gyök létrejötte figyelhető meg a cAMP termelés nem jelentős. Az OaPAC esetében tehát fontos szerepet játszik a proton transzfer, hasonlóan a PixD-hez vagy PapB fehérjékhez, ahol szintén a megfigyelhető a FAD protonálása és a félig redukált flavin gyök létrejötte^{69,70}. Érdekes módon több BLUF domén fehérjében (például az AppA-ban, BlrB-ben és BlsA-ban) nem figyelhető meg az elektron transzfer folyamata sem, nem figyelhetőek meg a flavin gyökök a világos állapot kialakulása során^{52,71}.



3.36 ábra. Az OaPAC fotoaktivációjának mechanizmusa. A kék fény gerjesztés indítja el az ATP konverziót, ha a tirozin pK értéke lecsökken, a proton-kapcsolt elektron transzfer folyamat és egyúttal az ATP konverzió is leáll.

6. Irodalomjegyzék

- 1 Smith, S., Rees, D., Dill, K. & Jr, W. Structure and Activation of the Visual Pigment Rhodopsin. *Annual Review of Biophysics, Vol 39* **39**, 309-328 (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101209-104901>
- 2 Wand, A., Friedman, N., Sheves, M. & Ruhman, S. Ultrafast Photochemistry of Light-Adapted and Dark-Adapted Bacteriorhodopsin: Effects of the Initial Retinal Configuration. *Journal of Physical Chemistry B* **116**, 10444-10452 (2012). <https://doi.org/10.1021/jp2125284>
- 3 Schotte, F. *et al.* Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19256-19261 (2012). <https://doi.org/10.1073/pnas.1210938109>
- 4 Kim, T. W. *et al.* Protein structural dynamics of photoactive yellow protein in solution revealed by pump-probe X-ray solution scattering. *J Am Chem Soc* **134**, 3145-3153 (2012). <https://doi.org/10.1021/ja210435n>
- 5 Losi, A. in *Flavins: Photochemistry and Photobiology* Vol. 6 217-269 (The Royal Society of Chemistry, 2006).
- 6 Masuda, S. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant Cell Physiol* **54**, 171-179 (2013). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs173>
- 7 Losi, A. & Gartner, W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem Photobiol* **87**, 491-510 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00913.x>
- 8 Losi, A., Gardner, K. & Moglich, A. Blue-Light Receptors for Optogenetics. *Chemical Reviews* **118**, 10659-10709 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00163>
- 9 Conrad, K. S., Manahan, C. C. & Crane, B. R. Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nat Chem Biol* **10**, 801-809 (2014). <https://doi.org/10.1038/nchembio.1633>
- 10 Deisseroth, K. Controlling the Brain with Light. *Scientific American* **303**, 48-55 (2010). <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1110-48>
- 11 Deisseroth, K. Optogenetics. *Nature Methods* **8**, 26-29 (2011). <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324> | 10.1038/NMETH.F.324
- 12 Kim, B. & Lin, M. Optobiology: optical control of biological processes via protein engineering. *Biochemical Society Transactions* **41**, 1183-1188 (2013). <https://doi.org/10.1042/BST20130150>
- 13 Lukacs, A., Eker, A., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. Electron Hopping through the 15 angstrom Triple Tryptophan Molecular Wire in DNA Photolyase Occurs within 30 ps. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14394-+ (2008). <https://doi.org/10.1021/ja805261m>
- 14 Sancar, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237 (2003). <https://doi.org/10.1021/cr0204348>
- 15 Chaves, I. *et al.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 335-364 (2011). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103759>
- 16 Christie, J., Gawthorne, J., Young, G., Fraser, N. & Roe, A. LOV to BLUF: Flavoprotein Contributions to the Optogenetic Toolkit. *Molecular Plant* **5**, 533-544 (2012). <https://doi.org/10.1093/mp/sss020>

- 17 Iuliano, J. N. *et al.* Variation in LOV Photoreceptor Activation Dynamics Probed by Time-Resolved Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **57**, 620-630 (2018).
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01040>
- 18 Sancar, A. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *J Biol Chem* **283**, 32153-32157 (2008). <https://doi.org/10.1074/jbc.R800052200>
- 19 Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**, 586-590 (2000).
<https://doi.org/10.1038/35014644>
- 20 Greetham, G. *et al.* ULTRA: A Unique Instrument for Time-Resolved Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **64**, 1311-1319 (2010). <https://doi.org/10.1366/000370210793561673>
- 21 Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **45**, 827-836 (2002).
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03058.x>
- 22 Anderson, S. *et al.* Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **44**, 7998-8005 (2005).
<https://doi.org/10.1021/bi0502691>
- 23 Lukacs, A. *et al.* Photoexcitation of the blue light using FAD photoreceptor AppA results in ultrafast changes to the protein matrix. *J Am Chem Soc* **133**, 16893-16900 (2011).
<https://doi.org/10.1021/ja2060098>
- 24 Gauden, M. *et al.* Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* **44**, 3653-3662 (2005).
<https://doi.org/10.1021/bi047359a>
- 25 Laan, W. *et al.* On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochemistry* **45**, 51-60 (2006). <https://doi.org/10.1021/bi051367p>
- 26 Gauden, M. *et al.* Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10895-10900 (2006). <https://doi.org/10.1073/pnas.0600720103>
- 27 Gauden, M. *et al.* On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains. *Biochemistry* **46**, 7405-7415 (2007). <https://doi.org/10.1021/bi7006433>
- 28 Kennis, J. T. & Groot, M. L. Ultrafast spectroscopy of biological photoreceptors. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 623-630 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.09.006>
- 29 Nag, L., Sournia, P., Myllykallio, H., Liebl, U. & Vos, M. Identification of the TyrOH(center dot+) Radical Cation in the Flavoenzyme TrmFO. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 11500-11505 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b04586>
- 30 JOHNSON, C., LUDWIG, M. & ASHER, S. ULTRAVIOLET RESONANCE RAMAN CHARACTERIZATION OF PHOTOCHEMICAL TRANSIENTS OF PHENOL, TYROSINE, AND TRYPTOPHAN. *Journal of the American Chemical Society* **108**, 905-912 (1986). <https://doi.org/10.1021/ja00265a010>
- 31 QIN, Y. & WHEELER, R. SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN PHENOXYL AND TYROSINE PHENOXYL RADICAL STRUCTURES, VIBRATIONAL FREQUENCIES, AND SPIN-DENSITIES. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 6083-6092 (1995). <https://doi.org/10.1021/ja00127a022>
- 32 Berthomieu, C. & Hienerwadel, R. Vibrational spectroscopy to study the properties of redox-active tyrosines in photosystem II and other proteins. *Biochim Biophys Acta* **1707**, 51-66 (2005).
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.03.011>
- 33 Lukacs, A. *et al.* Excited state structure and dynamics of the neutral and anionic flavin radical revealed by ultrafast transient mid-IR to visible spectroscopy. *J Phys Chem B* **116**, 5810-5818 (2012). <https://doi.org/10.1021/jp2116559>

- 34 Walden, S. & Wheeler, R. Distinguishing features of indolyl radical and radical cation: Implications for tryptophan radical studies. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 1530-1535 (1996). <https://doi.org/10.1021/jp951838p>
- 35 Walden, S. & Wheeler, R. Structural and vibrational analysis of indole by density functional and hybrid Hartree-Fock/density functional methods. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 2653-2662 (1996). <https://doi.org/10.1039/p29960002653>
- 36 Blanco-Rodriguez, A., Towrie, M., Sykora, J., Zalis, S. & Vlcek, A. Photoinduced Intramolecular Tryptophan Oxidation and Excited-State Behavior of [Re(L-AA)(CO)(3)(alpha-diimine)](+) (L = Pyridine or Imidazole, AA = Tryptophan, Tyrosine, Phenylalanine). *Inorganic Chemistry* **50**, 6122-6134 (2011). <https://doi.org/10.1021/ic200252z>
- 37 Byrdin, M., Eker, A., Vos, M. & Brettel, K. Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in Escherichia coli DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8676-8681 (2003). <https://doi.org/10.1073/pnas.1531645100>
- 38 Byrdin, M., Villette, S., Eker, A. & Brettel, K. Observation of an intermediate tryptophanyl radical in W306F mutant DNA photolyase from Escherichia coli supports electron hopping along the triple tryptophan chain. *Biochemistry* **46**, 10072-10077 (2007). <https://doi.org/10.1021/bi700891f>
- 39 Lukacs, A. *et al.* Role of the middle residue in the triple tryptophan electron transfer chain of DNA photolyase: Ultrafast spectroscopy of a Trp -> Phe mutant. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 15654-15658 (2006). <https://doi.org/10.1021/jp063686b>
- 40 Wang, H., Saxena, C., Quan, D., Sancar, A. & Zhong, D. Femtosecond dynamics of flavin cofactor in DNA photolyase: Radical reduction, local solvation, and charge recombination. *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 1329-1333 (2005). <https://doi.org/10.1021/jp044652b>
- 41 Byrdin, M., Villette, S., Espagne, A., Eker, A. & Brettel, K. Polarized transient absorption to resolve electron transfer between tryptophans in DNA photolyase. *Journal of Physical Chemistry B* **112**, 6866-6871 (2008). <https://doi.org/10.1021/jp711435y>
- 42 Burney, S. *et al.* Single Amino Acid Substitution Reveals Latent Photolyase Activity in Arabidopsis cry1. *Angewandte Chemie-International Edition* **51**, 9356-9360 (2012). <https://doi.org/10.1002/anie.201203476>
- 43 Byrdin, M. *et al.* Intraprotein electron transfer and proton dynamics during photoactivation of DNA photolyase from E-coli: review and new insights from an "inverse" deuterium isotope effect. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1655**, 64-70 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.07.001>
- 44 Sokolowsky, K. *et al.* Spectroscopic and thermodynamic comparisons of Escherichia coli DNA photolyase and Vibrio cholerae cryptochrome 1. *J Phys Chem B* **114**, 7121-7130 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp102275r>
- 45 Gindt, Y. M., Connolly, G., Vonder Haar, A. L., Kikhwa, M. & Schelvis, J. P. M. Investigation of the pH-dependence of the oxidation of FAD in VcCRY-1, a member of the cryptochrome-DASH family. *Photochem Photobiol Sci* **20**, 831-841 (2021). <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00063-5>
- 46 Müller, P. *et al.* ATP binding turns plant cryptochrome into an efficient natural photoswitch. *Sci Rep* **4**, 5175 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep05175>
- 47 Cailliez, F., Müller, P., Gallois, M. & de la Lande, A. ATP binding and aspartate protonation enhance photoinduced electron transfer in plant cryptochrome. *J Am Chem Soc* **136**, 12974-12986 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja506084f>

- 48 Hense, A., Herman, E., Oldemeyer, S. & Kottke, T. Proton Transfer to Flavin Stabilizes the Signaling State of the Blue Light Receptor Plant Cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 1743-1751 (2015). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.606327>
- 49 Bonetti, C. *et al.* Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the BLUF photoreceptor observed by ultrafast infrared spectroscopy. *Biophys J* **95**, 4790-4802 (2008). <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.139246>
- 50 Bonetti, C. *et al.* The Role of Key Amino Acids in the Photoactivation Pathway of the Synechocystis Slr1694 BLUF Domain. *Biochemistry* **48**, 11458-11469 (2009). <https://doi.org/10.1021/bi901196x>
- 51 Li, G. & Glusac, K. D. The role of adenine in fast excited-state deactivation of FAD: a femtosecond mid-IR transient absorption study. *J Phys Chem B* **113**, 9059-9061 (2009). <https://doi.org/10.1021/jp905020u>
- 52 Lukacs, A. *et al.* BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J Am Chem Soc* **136**, 4605-4615 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja4121082>
- 53 Gil, A. A. *et al.* Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues. *J Am Chem Soc* **139**, 14638-14648 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07849>
- 54 Brust, R. *et al.* Ultrafast Structural Dynamics of BlsA, a Photoreceptor from the Pathogenic Bacterium. *J Phys Chem Lett* **5**, 220-224 (2014). <https://doi.org/10.1021/jz4023738>
- 55 Laptенок, S. P. *et al.* Electron transfer quenching in light adapted and mutant forms of the AppA BLUF domain. *Faraday Discuss* **177**, 293-311 (2015). <https://doi.org/10.1039/c4fd00189c>
- 56 Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S. & Iseki, M. Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into Aplysia sensory neurons. *Neurosci Res* **59**, 81-88 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.05.015>
- 57 Jansen, V. *et al.* Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *Elife* **4** (2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05161>
- 58 Ohki, M. *et al.* Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylyl cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*. *Acta Crystallographica A-Foundation and Advances* **72**, S251-S251 (2016). <https://doi.org/10.1107/S2053273316096194>
- 59 Ohki, M. *et al.* Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 8562-8567 (2017). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704391114>
- 60 Haigney, A. *et al.* Ultrafast infrared spectroscopy of an isotope-labeled photoactivatable flavoprotein. *Biochemistry* **50**, 1321-1328 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi101589a>
- 61 Pirisi, K. *et al.* Identification of the vibrational marker of tyrosine cation radical using ultrafast transient infrared spectroscopy of flavoprotein systems. *Photochem Photobiol Sci* **20**, 369-378 (2021). <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00024-y>
- 62 Immeln, D., Weigel, A., Kottke, T. & Lustres, J. Primary Events in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome: Intraprotein Electron and Proton Transfer Revealed by Femtosecond Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 12536-12546 (2012). <https://doi.org/10.1021/ja302121z>
- 63 Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylyl cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *PNAS* **113**, 6659-6664 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1517520113>
- 64 Tommos, C. & Babcock, G. T. Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1458**, 199-219 (2000). [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00069-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00069-4)

- 65 Seyedsayamdost, M. R., Reece, S. Y., Nocera, D. G. & Stubbe, J. Mono-, di-, tri-, and tetra-substituted fluorotyrosines: new probes for enzymes that use tyrosyl radicals in catalysis. *J Am Chem Soc* **128**, 1569-1579 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja055926r>
- 66 Lukacs, A., Tonge, P. J. & Meech, S. R. Photophysics of the Blue Light Using Flavin Domain. *Acc Chem Res* **55**, 402-414 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00659>
- 67 Gil, A. *et al.* Mechanism of the AppABLUF Photocycle Probed by Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues: Effect of the Y21 pKa on the Forward and Reverse Ground-State Reactions. *J Am Chem Soc* **138**, 926-935 (2016). <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11115>
- 68 Hasegawa, K., Masuda, S. & Ono, T. A. Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF(Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF). *Biochemistry* **45**, 3785-3793 (2006). <https://doi.org/10.1021/bi051820x>
- 69 Fujisawa, T., Takeuchi, S., Masuda, S. & Tahara, T. Signaling-State Formation Mechanism of a BLUF Protein PapB from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas palustris* Studied by Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem B* **118**, 14761-14773 (2014). <https://doi.org/10.1021/jp5076252>
- 70 Zirak, P. *et al.* Photodynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Photochem Photobiol B* **83**, 180-194 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.015>
- 71 Brust, R. *et al.* Ultrafast Structural Dynamics of BlsA, a Photoreceptor from the Pathogenic Bacterium *Acinetobacter baumannii*. *J Phys Chem Lett* **5**, 220-224 (2014). <https://doi.org/10.1021/jz4023738>