

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

Lukács András



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2023

## Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	4
Előszó .....	6
Bevezetés.....	7
1. Fotoaktív flavoproteinek .....	8
1.1 BLUF domén fehérjék .....	11
1.2 Fotoliázok és kriptokrómok.....	12
1.3 Molekuláris mozi.....	15
2. Módszerek és eszközök.....	16
2.1 Bevezetés .....	16
2.2 Tranziens abszorpciós spektroszkópai rendszer .....	18
<i>A regeneratív erősítő.....</i>	<i>18</i>
<i>Frekvencia kétszerezés.....</i>	<i>20</i>
<i>Fehér fény kontinuum keltés .....</i>	<i>20</i>
2.3 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia.....	25
2.4 Infravörös tranziens abszorpciós spektroszkópia .....	28
<i>Mintatartó, minta mozgatás .....</i>	<i>29</i>
3. Fotoindukált elektron transzfer flavoproteinekben .....	31
3.1 Fotoindukált elektron transzfer szerepe a fehérje funkciójában .....	34
3.2 Semleges és anionos flavin gyök spektrális tulajdonságainak karakterizálása .....	35
3.3 Tirozin gyökök vibrációs markereinek azonosítása .....	37
3.4 Tirozin és triptofán gyökök azonosítása glükóz oxidázban.....	42
4. Fotoliázok funkcionális dinamikájának vizsgálata tranziens abszorpciós spektroszkópiával .....	48
4.1 DNS károsodás UV-fény hatására, és a fotoliáz javítási mechanizmusa .....	48
<i>A fotoliáz szerkezete.....</i>	<i>49</i>
<i>Fotoreaktiváció illetve fotoaktiváció az E. coli fotoliázban .....</i>	<i>51</i>
4.2 Fotoaktiváció triptofán nanodróton keresztül.....	53
4.3 Miért különbözik a fotoliázok és kriptokrómok funkciója? .....	57
<i>Mikro és milliszekundumos tranziens abszorpciós mérések vad típusú fotoliázon..</i>	<i>59</i>
<i>Mikro és milliszekundumos tranziens abszorpciós mérések az N378D mutánsan ..</i>	<i>62</i>
5. BLUF domén fehérjék vizsgálata ultragyors spektroszkópiával.....	67

5.1 AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata tranziens abszorpció, valamint fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel .....	67
5.1.1 A FAD körüli hidrogénkötés-rendszer vizsgálata .....	70
5.1.2 Az AppA funkciója nem függ az elektron transzferől .....	81
5.1.3 Fehérjék akcióban .....	88
5.1.4 A W104 triptofán pozíciójának meghatározása .....	91
5.1.5 Az AppA szerepe az oxigén szint érzékelésében .....	98
5.2 Az OaPAC funkcionális dinamikájának vizsgálata .....	107
5.2.1 Proton-kapcsolt elektron transzfer .....	107
5.2.2 Az OaPAC fotociklusának vizsgálata fluorotirozin analógok segítségével ..	122
5.2.3 Az elektron transzfer szerepe az OaPAC funkciójában .....	128
5.2.4 A Q48 glutamin szerepe az OaPAC funkciójában .....	135
6. Kitekintés .....	143
Tranziens SAXS/WAXS mérések .....	143
Femtosekundumos röntgenkristallográfia (SFX) .....	145
Időfelbontásos röntgenkristallográfia szinkrotron impulzusokkal (SSX) .....	147
7. Összefoglalás .....	149
8. Irodalomjegyzék .....	151
9. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények .....	162
10. A témához tartozó egyéb közlemények .....	164
11. Köszönetnyilvánítás .....	167

## Rövidítések

**8-HDF** – 8-hidroxi-7,8-didemetil-5-deazariboflavin

**A** - alanin

**ADP** – adenzin 5'-difoszfát

**ATP** – adenzin 5'-trifoszfát

**AC** – adenilát cikláz

**AppA** - Activation of Photopigment and Puc expression A

**ATP** – adenzin trifoszfát

**BLUF** – Blue Light sensing using FAD

**BBO** –  $\beta$ -bárium borát (kristály)

**cAMP** – ciklikus adenzin monofoszfát

**CRY** – kriptokróm

**DAS** – Decay associated spectra

**E** - glutaminsav

**EAS** – Evolution associated spectra

**EADS** – Evolution associated decay spectra

**ET** - elektrontranszfer

**FAD** – Flavin adenin dinukleotid

**FAD<sub>ox</sub>** – Oxidált flavin

**FAD<sup>•-</sup>** - a flavin anionos gyök

**FADH<sup>•</sup>** - a flavin semleges gyök

**FADH<sub>2</sub>** – a flavin semleges hidrokinon

**FADH<sup>-</sup>** - a flavin anionos hidrokinon

**FMN** – Flavin mononukleotid

**FRET** – Förster-típusú fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer

**Gln** - glutamin

**GOX** – glükóz oxidáz

$\kappa^2$  – orientációs faktor

**NOPA** – Nemkollineáris optikai parametrikus erősítő

**OaPAC** – Fotoaktivált adenilát cikláz az *Oscillatoria acuminata* baktériumból



**PAC** – fotoaktivált adenilát cikláz

**Pi** – szervetlen foszfát

**Q** - glutamin

**SHG** – second harmonic generation

**SVD** – singular value decomposition

**TA** – Tranziens abszorpció

**TRIR** – Tranziens infravörös abszorpció

**TrpOH<sup>•+</sup>** – triptofán kation gyök

**Trp<sup>•</sup>** – triptofán semleges gyök

**TyrO<sup>•</sup>** – tirozin semleges gyök

**TyrOH<sup>•+</sup>** – tirozin kation gyök

**τ** – fluoreszcencia élettartam

**W** – triptofán

**W<sup>•</sup>** – triptofán semleges gyök

**W<sup>•+</sup>** – triptofán kation gyök

**Y** – tirozin

**Y<sup>•+</sup>** – tirozin kation gyök

**Y<sup>•</sup>** – tirozin semleges gyök

## Előszó

Szentgyörgyi Albert mintegy hat évtizeddel ezelőtt azt mondta, hogy „az élet az amikor egy elektron nyugalmat keres magának”<sup>1</sup>. Ez természetesen nagyon jelentős leegyszerűsítés, de az igaz, hogy a redox folyamatoknak, az elektron és a proton transzfernek nagyon nagy jelentősége van az élettani folyamatok során. Az elektron transzfer folyamatoknak egy speciális területe a fény hatására bekövetkező elektron transzfer folyamatok, amelynek legismertebb esete (természetesen) a fotoszintézis. Emellett azonban számos olyan biológiai folyamat van a fény irányába való növekedéstől, a mágneses térben való tájékozódásig, amelyek esetében a funkcióhoz vezető első lépés egy elektron transzfer folyamat.

Jelen dolgozatban bemutatott kutatások mindegyikében egy elektron „keres nyugalmat”. A tárgyalt flavoproteinek mindegyikében a kék foton abszorpcióját követően a flavin elvesz egy elektront a környezetében levő valamelyik aminosavtól, aminek a későbbiekben messzemenő következményei lesznek. A fotoliázok esetében a plusz elektron a fehérjéhez kötődő DNS szálaban a ciklobután pirimidin dimer felbomlásához vezet. A kriptokrómok esetében egy a triptofán láncon végigfutó elektron transzfer kaszkád redukálja a flavint és ez vezet például a cirkadián ritmus szabályozásához.

A fotoaktivált adenilát ciklázok esetében a flavin nem csak egy elektront, hanem egy protont is kap egy közeli tirozintól, amelynek következtében a flavinhoz közeli glutamin elfordul. Ez az apró strukturális változás vezet ahhoz a konformációs változáshoz, aminek következtében az ATP-cAMP konverzió megvalósul.

Mivel az elektron útja a keresett nyugalomig nagyon gyors időskálán valósul meg ennek megfigyeléséhez ultragyors lézerekre és spektroszkópiai berendezésekre van szükség.

Jelen dolgozatban az elektronnak a nyugalomig vezető útjáról, annak következményeiről, illetve a megfigyelés módszereiről lesz szó.

## Bevezetés

Jelen dolgozat az elmúlt bő tíz évnek az összefoglalója és elsősorban a posztdok időszak utáni munkáimat tartalmazza, de azok közül is csak a flavoproteinekkal kapcsolatos eredményeket. A terjedelemben nem fértek már be a fluoreszcens fehérjéken, elsősorban a fotokapcsolható Dronpa-n és GFP-n valamint a LOV domén fehérjéken végzett kísérletek és eredmények, amelyeket szintén nagy presztízsű újságokban (*Angewandte Chem.*, *Nature Chem.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, *J. Phys. Chem. Lett.*) publikáltunk.

A dolgozat felépítése nem időrendi sorrendben, hanem tematikusan mutatja be az elért eredményeket, kivéve az utolsó alfejezeteket, amelyek a legújabb – az időfüggő röntgenszórás és röntgenkrisztallográfiás – eredményeket mutatják be.

A bevezetést követő fejezet azokat a kísérleti berendezéseket, amelyekkel a bemutatott eredményeket sikerült elérni, elsősorban azért, mert ezek közül többnek a fejlesztésében vagy részt vettem vagy teljes egészében én építettem, úgyhogy reményeim szerint hasznára válhatnak azok számára, aki szintén ezen a területen dolgoznak vagy esetleg csak most lépnek az ultragyors spektroszkópia területére.

A posztdok időszak alatt már és azt követően is sokat foglalkoztam a flavoproteinekben lejátszódó fotoindukált elektron transzfer folyamatokkal. Ennek megfelelően a 3. fejezetben részletesen ismertetem az ezzel kapcsolatos kísérleteimet, amelynek során sikerült olyan spektrális jellemzőket meghatározni, amelyek alapján meghatározható, hogy a flavin milyen redox állapotban van.

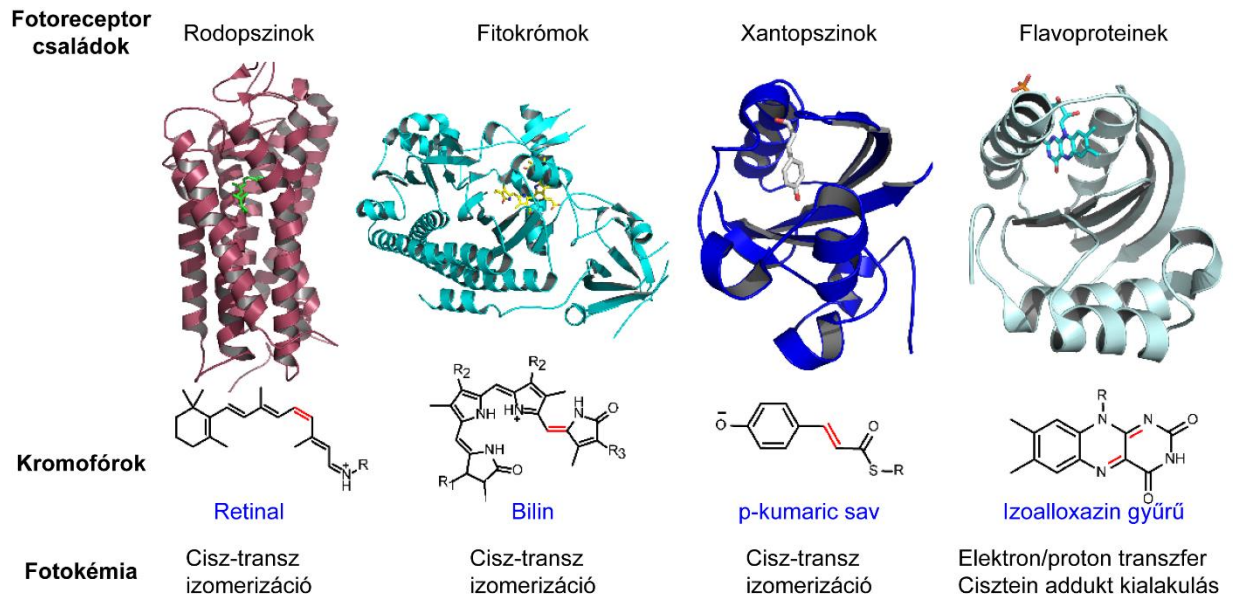
A 4. fejezet a fotoliázsal kapcsolatos eredményeket mutatja be. Az elmúlt években elsősorban arra kerestem a választ, hogy mi okozza a fotoliáz és a kriptokróm közötti különbséget a nagy fokú szerkezeti homológia ellenére.

Az 5. fejezet elsősorban BLUF (Blue Light sensing Using FAD) domén fehérjék – ezek közül az AppA és a nemrégiben felfedezett OaPAC – funkcionális dinamikáját tárgyalja. A BLUF domén fehérjék a fotoaktív flavoproteineknek olyan családját alkotják, amelyekben a kék fény abszorpcióját követően a flavin körüli hidrogén kötés rendszer átrendeződik és ez a kezdeti strukturális változás vezet ahhoz a konformáció változáshoz, amely a fehérje funkcióját meghatározza. A fejezet végén olyan új eredményeket mutatok be, amelyek ezeket a szerkezeti változásokat folyamatában ragadták meg.

## 1. Fotoaktív flavoproteinek

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.<sup>2,3</sup> 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.<sup>4,5</sup> Sok más receptorban azonban a flavin adenin-dinukleotid (FAD) vagy a flavin-mononukleotid (FMN) kék fényt elnyelő izoalloaxazin gyűrűje működik kromofórként.<sup>6-10</sup> Ezekben az esetekben nem teljesen tisztázott az a mechanizmus, amellyel ez a planáris aromás kromofór által elnyelt foton energiája szerkezetváltozást hoz létre a környező fehérjemátrixban. 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.<sup>11-13</sup> Sikeresen alkalmazták fény által aktivált ioncsatorna-rodopszinokat idegsejtekben való jelátvitelhez.<sup>14</sup> A kriptokrómok vagy LOV fehérjék optogenetikai alkalmazásában az elmúlt években komoly sikereket értek el. A kék-fény elnyelése ugyanis olyan strukturális változásokat indít el fehérjében, amelyek kiválóan alkalmazhatóak optogenetikai célokra. LOV fehérje alkalmazásával például fényvel lehetett aktiválni a Rac fehérje működését: ehhez egy olyan Rac-LOV fúziós fehérjét hoztak, amelynek a működését a LOV-ban fény abszorpció által indukált konformációs változás valósítja meg.<sup>15</sup>

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 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 funkcióját<sup>16</sup>, amely lehet DNS javítás, a cirkadián ritmus szabályozása vagy a föld mágneses terének érzékelése.

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<sup>9,17</sup>. 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.<sup>18</sup>

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 terjedelmi okokból elsősorban a BLUF domén fehérjéken és a fotoliázokon végzett kísérleteket és a kapott eredményeket kívánom bemutatni.

## 1.1 BLUF domén fehérjék

A fotoaktív flavoptoteinek kiterjedt családját alkotják a BLUF domén fehérjék, ahol az elnevezés (BLUF = blue light 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 legismertebb és legtöbbet vizsgált BLUF domén fehérje az AppA, amely a *Rhodobacter sphaeroides* nevű fotoszintetikus baktériumban található, feladata a transzkripció reguláció. Sötétben az AppA hozzákötődik a PpsR nevű transzkripció faktorhoz, intenzív kék színű fény hatására az AppA-PpsR komplex disszociálódik lehetővé téve a PpsR DNS-hez kötődését, leállítva a fotoszintetikus gének bioszintézisét. Ez a mechanizmus különlegesen érdekes, mivel az N-terminálisnál elhelyezkedő BLUF doménben végbemenő fotokémiai folyamatok, a C-terminálisnál olyan strukturális változásokhoz vezetnek, amelynek eredményeképpen a PpsR leválik az AppA-ról. Saját kísérleteink arra utalnak, hogy a fényabszorpciót követően az FAD körüli aminosavak hidrogén kötés hálózata átrendeződik és ez indítja el azt a strukturális átrendeződést, amelynek következtében az AppA-PpsR komplex disszociálódik<sup>19,20</sup>. A fotoaktiválódást és a strukturális átrendeződést különösen érdekessé teszi, hogy a fényabszorpciót követő hidrogén kötés rendszer átrendeződése a pikoszekundumos skálán valósul meg, míg a világos állapotba való teljes átmenet mikroszekundumok, sőt bizonyos esetekben milliszekundumok valósul meg. Az Oxford közeli Rutherford Appleton Laboratory-ban dolgozó kollégáimmal a közelmúltban elsőként végeztünk olyan kísérleteket, amelyek során ugyanazon mérés során a femtoszekundumos-mikroszekundumos skálán tudtuk nyomon követni a fehérjedinamikát tranziens infravörös spektroszkópia segítségével<sup>21</sup>.

A BLUF domén fehérjét tartalmazó fehérjék fontos csoportját alkotják az *Acinetobacter* családba tartozó baktériumok. Ez a család azért különösen érdekes, mert több tagja az évek során rezisztens „szuperbaktériummá” vált. Az *A. baumannii* például egy olyan kórházakban tenyésztő baktérium, amely mára már rezisztenssé vált a legtöbb ismert antibiotikummal szemben. Az *A. baumannii*-ban található BlsA fehérjéről néhány éve derült ki, hogy az AppA-hoz hasonló BLUF domént

tartalmaz, amely felelős a baktérium fényérzékeléséért. Kék fény hatására az *A. baumannii* motilitása és a biofilm képződés leáll, virulenciája viszont növekszik. A közelmúltban elsőként végeztük el az *Acinetobacter baumannii* nevű baktérium BlsA nevű fehérjének a spektroszkópiai karakterizálását<sup>22</sup>.

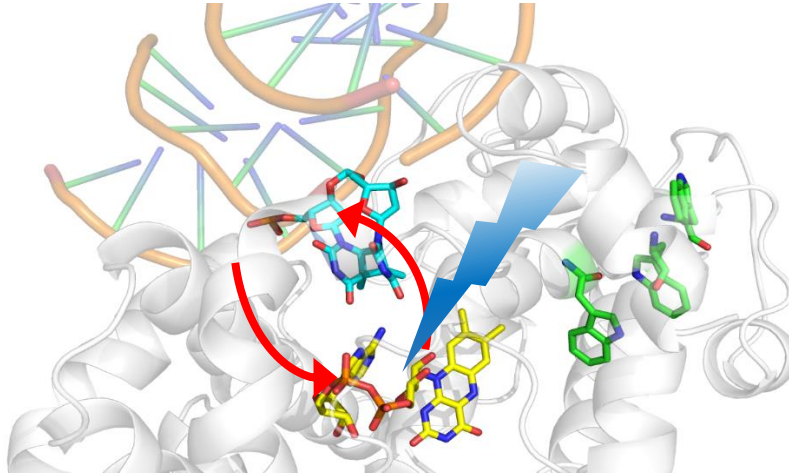
A BLUF domén fehérjék esetében a funkciót megvalósító fotokémiai folyamat sok esetben nem teljesen tisztázott. Konszenzus van abban, hogy az kék foton abszorpcióját követően a flavint körülvevő aminosavak flavinnal alkotott hidrogénkötés-rendszere átalakul (ennek köszönhető a FAD abszorpciós maximumának 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. Az elektron transzfernek a BLUF fehérjék funkcionális dinamikájában betöltött szerepét behatóan vizsgáltuk az AppA, a PixD és az OaPAC nevű fehérjék esetében; erre a dolgozat későbbi részében majd részletesen is kitérek.

## 1.2 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 módon<sup>23</sup>.

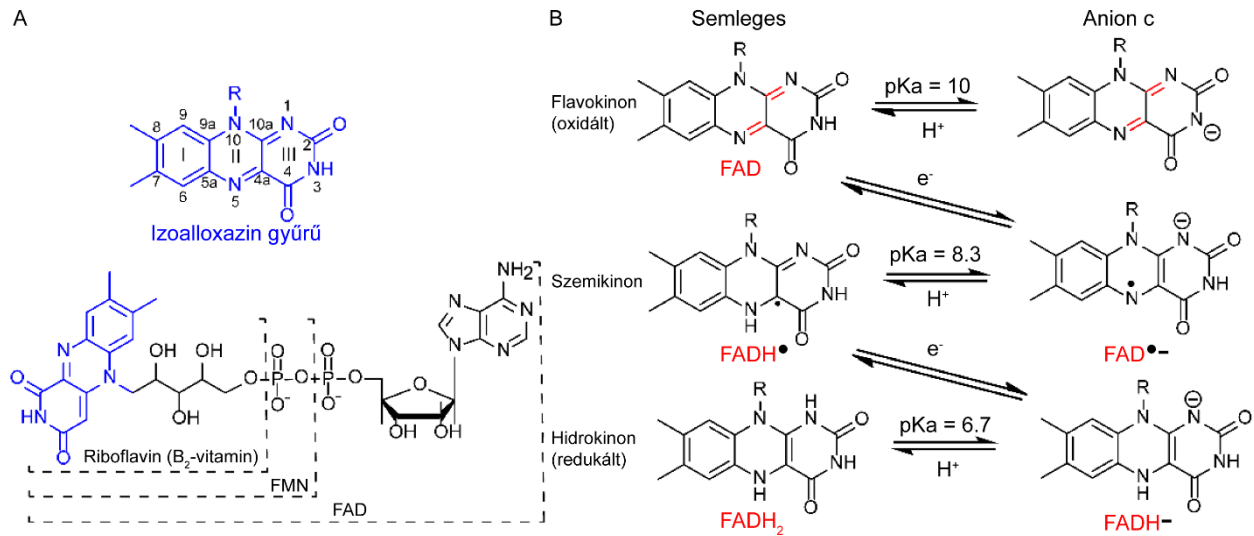
A fotoliáz működésének megértésében Aziz Sancar nyolcvanas években végzett kísérletei játszottak döntő szerepet, aki kimutatta, hogy a javítás fényindukált elektron transzfer hatására valósul meg. (Sancar ezekért a kutatásaiért 2015-ben Nobel díjat kapott). Az általa végzett kísérletek arra engedtek 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 visszakérül az izoalloxazin gyűrűre. (forrás: Pavel Müller, személyes közlés)

A javítási folyamat fontos feltétele, hogy a flavin kofaktor (FAD) teljesen redukált ( $\text{FADH}^-$ ) állapotban legyen. A fotoliázban, az expresszálat és tisztítást követően azonban az FAD félig redukált ( $\text{FADH}^\bullet$ ) állapotban van. Klaus Brettel és Marten Vos kollégáim az ezredfordulón fedezték fel (Aubert et al, Nature, 2000), hogy látható fény hatására a flavin teljesen redukálódik, még hozzá egy elektrontranszfer segítségével, amelyben három közeli triptofán vesz részt<sup>24</sup>. A folyamatot fotoaktivációnak nevezték el, amelyet közös munkánk során az elmúlt néhány tizenöt évben sikerült részletesen jellemeznünk. Kísérleteink során azt sikerült igazolni, hogy a flavin fényabszorpcióját követően a legközelebbi triptofánról (W382) egy elektron ugrik a flavinra, amely (a javításhoz szükséges)  $\text{FADH}^\bullet$  állapotba kerül. Ezt követően egy elektron ugrik a második (W359) triptofánról az elsőre, majd a terminális triptofánról (W306) a másodikra, hogy pótolja az elektron hiányt. Kísérleteink során azt állapítottuk meg, hogy a fényabszorpciót követő elektron transzfer kaszkád mintegy 30 ps alatt megvalósul, ami tekintettel a flavin és a terminális triptofán közötti 15 Å távolságot, egy igen hatékony nagy hatótávolságú elektron transzfer folyamat.



**1.2 ábra** A flavin kromofór szerkezete A flavin leggyakrabban oxidált állapotban van jelen a flavoproteinekben, de vannak kivételek. Reakciók során azonban az ábrán látható redox állapotokat vehetik fel. (forrás: Miura, 2001 <sup>25</sup>)

Fiziológias körülmények között a fotoliázban nagy valószínűséggel nem kerül sor fotoaktivációra, azt általunk leírt jelenségnek 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.

A kriptokrómok felfedezésekor – a kilencvenes évek kezdetére – eleinte az sem volt világos, hogy mi a fehérje funkciója, innen származik az elnevezés is. Később kiderült, hogy a fehérje egy kék fény fotoreceptor, amely a növényekben a növekedés szabályozásában vesz részt. 1996-ban fedezték fel, hogy a kriptokrómok emberekben és egerekben is megtalálhatóak, majd 1998-ban sikerült bizonyítani, hogy ezek a fehérjék fénytől függően vagy akár attól függetlenül is a cirkadián ritmus szabályozásában vesznek részt<sup>26</sup>. Nemrégiben vált ismertté a kriptokrómok talán legerotikusabb funkciója, a föld mágneses terének „érzékelése”, amellyel bizonyos költöző madarak tájékozódása megvalósul. A vörös begyek egyik alfaja minden ősszel Skandináviából a Földközi-tenger térségébe repül, a tájékozódása pedig a kriptokrómnak köszönhetően valósul meg<sup>27</sup>. A fény abszorpciót követően a kriptokrómokban ugyanis egy flavin és egy triptofán gyök pár jön létre, ami kölcsönhat a föld mágneses terével<sup>28</sup>. A jelenség az elméleti fizikusok fantáziáját is megragadta és besorolták az általuk kvantum biológiának nevezett kategóriájába: a méltán

népszerű elméleti fizikus Jim Al-Khalili a TED előadásában és a könyvében (Life on the Edge, The coming age of quantum biology) is bemutatja a jelenséget.

### 1.3 Molekuláris mozi

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. Egy 100 mikrométeres hosszkülönbség például a pumpa és a próba impulzus között mintegy 300 femtoszekundumnak felel meg. A mérések során tehát ezt a távolságot folyamatosan növelve a próbaimpulzus segítségével számos „pillanatfelvételt” készítünk, amelyekből összeáll végül a molekuláris mozi.

Munkám során ennek a molekuláris mozinak a felvételeit készítettem el fotoliáz, kriptokrom és BLUF domén fehérjék esetében elsősorban ultragyors spektroszkópai módszerekkel, de a dolgozat végén mutatok példákat, amelyeken krisztallográfias pillanatfelvételeket készítettünk.

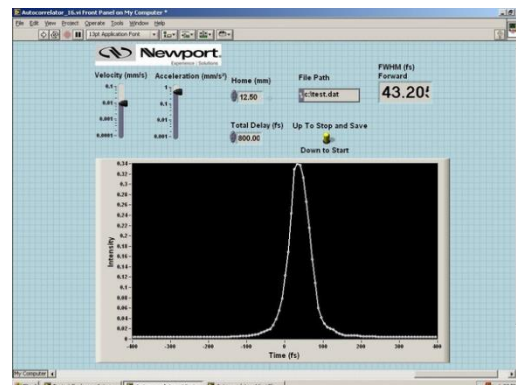
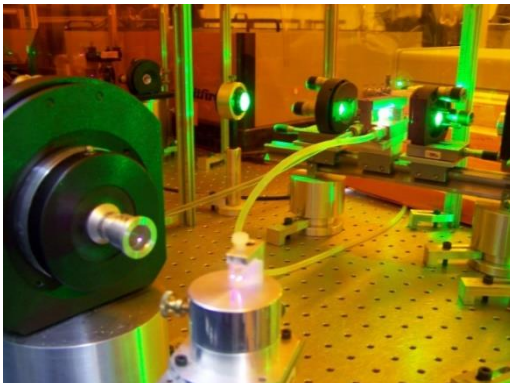
## 2. Módszerek és eszközök

### 2.1 Bevezetés

A dolgozatban tárgyalt mérések túlnyomó részében ultragyors lézerspektroszkópai módszereket használtam. Az, hogy az „ultragyors” szó milyen időtartományt jelent, sokat változott az elmúlt évtizedekben. A nyolcvanas évek irodalmában még a nanoszekundumos tartomány számított annak, a kilencvenes évekre azonban már csak a femtoszekundumos lézerimpulzusokra alkalmazták. A kilencvenes években óriási forradalom ment végbe femtoszekundumos lézerek fejlesztésének területén, az ezen a területen elért úttörő eredményeket koronázta meg az 1999-ben Ahmed Zewailnak ítélte kémiai Nobel-díj.

Amikor a 2000-es évek elején bekerültem az „ultragyors közösségbe”, a óriási pezsgés volt tapasztalható ezen a területen, rengeteg labor építette a saját rendszereit, és a kiegészítő mérési eszközöket (autokorrelátorok, pulse-shaperek stb.) amelyekből sokszor piaci termékek lettek.

A kutatási területet titán-zafir lézerek elterjedése forradalmasította, ennek a kristálynak az alkalmazásával ugyanis már viszonylag nagy energiájú impulzusokat lehetett előállítani nagy stabilitással. Ez utóbbi szintén nagyon fontos volt, a módusszinkronizálás megvalósítása korábban sok esetben igen körülményes volt, és ha sikerült is létrehozni, nehéz volt órákon át fenntartani. A hőmérséklet, a páratartalom változása vagy az épület rezgése mind befolyásolta a módusszinkronizálás eredményességét.



**2.1 ábra** Az Ecole Polytechnique-en használt „házi” titán zafir lézer. A módusszinkronizálás a baloldali, gumira szerelt tükör mozgatásával lehetett beindítani. A tükör közepén látszik a lézernyaláb. A jobboldali ábrán látszik, hogy a módusszinkronizálást követően az impulzushossz 43 fs

A módusszinkronizálás megvalósításának kulcsa a lézeroszcillátor pontos beállítása, ilyenkor ugyanis kis perturbáció el tudja indítani a lézerimpulzust, ami az oszcillátorban fut körül. Az anekdota szerint Siebett egy szerencsés véletlennek köszönhetően találta fel a módusszinkronizálást; az asztalra eső csavarhúzóknak köszönhetően indult el először.

Amikor 2005-ben az Ecole Polytechnique Laboratoire d'Optique et Biosciences intézetében kezdtem el dolgozni, a legtöbb berendezés saját építésű volt, de már voltak viszonylag jól használható kommerciális lézerek is. Az általam használt tranziens abszorpciós rendszerhez egy Spectra Physics Spitfire regeneratív lézererősítőt használtam, amely az úgynevezett chirped pulse amplification (CPA) technológiára épül. A helyzet érdekessége, hogy a Polytechnique-re vezető lépcsőkön, illetve az általa szervezett péntek délutáni szemináriumokon gyakran találkozhattam a módszer feltalálójával Gerard Mourou-val, aki a CPA felfedezéséért 2018-ban Nobel-díjat kapott. Mourounak mellesleg különleges érzéke van a marketinghez: a Polytechnique belső lapjában már 2008-ban elmondta, hogy a CPA miatt megérdemli a Nobel-díjat. Nem sokkal később egy a Youtube-on is elérhető marketing filmet készített, amelyben saját ötletét az ELI-t (Extrem Light Infrastructure) népszerűsítette (<https://youtu.be/k6i7A8Plqb8>). Nem csoda, hogy végül sikerült meggyőznie az EU-t, hogy pénzt fektessen be az ELI-be, így Mourou lobbitevékenységének lett a szerencsés nyertese Magyarország is, az ELI egyik intézete ugyanis Szegeden épült meg.

Ahogy már említettem a 2000-es években az ultragyors lézerekkel foglalkozó kutatások hatalmas lelkesedéssel folytak, a nagy laborok túlnyomó része saját maga építette meg a rendszereit. Ennek megfelelően a dolgozatban tárgyalt eredmények kísérletek olyan rendszereken készültek, amelyeket vagy saját magam építettem (tranziens abszorpciós rendszer, Kerr-kapuzott tranziens fluoreszcencia spektroszkópiai rendszer), vagy amelyek fejlesztésében részt vettem (tranziens infravörös abszorpciós rendszer).

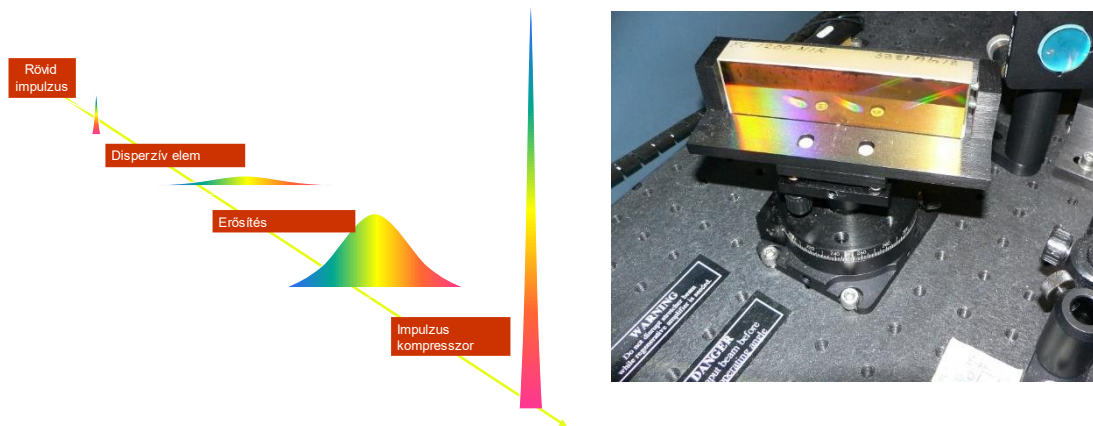
## 2.2 Tranziens abszorpciós spektroszkópai rendszer

Az elmúlt tíz évben két tranziens abszorpciós rendszert építettem, az elsőt a University of East Anglia nevű egyetemen, a másodikat pedig a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében. A két rendszer nagyon hasonló, az előbbi esetben azonban egy régebbi Clark MXR-1000 lézerrendszert<sup>19</sup> használtam, amelynek impulzushossza mintegy 200-250 fs volt, szemben a Spitfire Ace 100 fs-os impulzushosszával. A továbbiakban tehát a modernebb, a Biofizikai Intézetben működő femtoszekundumos tranziens abszorpciós rendszer működését mutatom be. (A rendszer működését és a kutatásainkat bemutató rövidfilm a következő címen tekinthető meg: <https://youtu.be/Y9vf98ZZVYw> A technológiáról szóló előadások, amelyeket a LAMELIS nevű nyári iskolán ismertettem 2017-2019 között, szintén megtalálhatóak a YouTube-on: [https://youtu.be/b6abYyQcTa0?list=PL9x5RtDzjwBz7F80yCZP0gUpunceS\\_wBq](https://youtu.be/b6abYyQcTa0?list=PL9x5RtDzjwBz7F80yCZP0gUpunceS_wBq))

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  $\mu\text{m}$ -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 próbaimpulzust utáni transzmisszióra abban az esetben, ha volt pumpa impulzus és abban az esetben, ha nem volt.

### *A regeneratív erősítő*

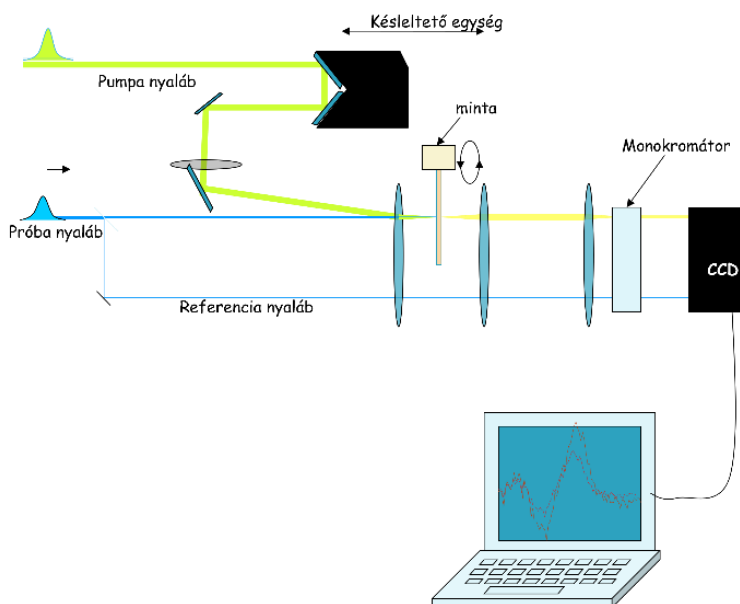
Ahogy feljebb említettem az általam használt titán-zafír lézer erősítők mindegyike (Spitfire Pro, Clark MXR-1000, Spitfire Ace, Thales) regeneratív erősítő és Gerard Mourou CPA ötletére épült<sup>29,30</sup>. Az alapötlet melleleg nagyon egyszerű: a rövid impulzust először időben szét kell húzni, ezt követően kerül sor az erősítésre egy másik lézerkristályban, majd a felerősített impulzust időben újra „összenyomjuk”.



**2.2 ábra** A CPA elve. (Bal oldalon) Az erősítőbe érkező rövid impulzust egy diszperzív elem segítségével nyújtjuk meg, majd az erősítést követően egy kompresszorban nyomjuk össze. (Jobb oldalon) A Clark MXR erősítőben levő optikai rács, amely segítségével mintegy 200 ps hosszúságúra nyújtjuk az eredetileg 200 fs-os impulzust.

Donna Strickland – Mourou posztdokja volt és osztozott a Nobel-díjban – érdemeit kiemeli, hogy míg jelenleg az impulzusok megnyújtása és összenyomása egy optikai rács segítségével történik (lásd **2.2 ábra**), a nyolcvanas évek elején Donna Strickland ehhez egy km hosszúságú optikai kábelt használt<sup>29,30</sup>.

Az általam jelenleg használt Spitfire Ace lézerezősítő a Mai Tai oszcillátor 1-2 nJ energiájú (100 fs-os) impulzusait erősíti 1 mJ energiájú impulzusokká, az impulzushossz pedig ismét 100 fs lesz.



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



*Frekvencia kétszerezés*

A pumpa-próba mérési elvből adódóan a rendszer három blokkra osztható: a pumpa és a próba impulzust előállító egységekre, illetve a detektáló részre.

A pumpa impulzus a méréseink túlnyomó részében egy 400 nm-es 0.5-1  $\mu\text{J}$  energiájú 100 fs-os impulzus volt. Ezt az impulzust a regeneratív erősítőből kijövő 800 nm-es impulzusnak egy  $\beta$ -bárium borát (BBO) kristályban való frekvenciakétszerezésével értük el (lásd **2.3 ábra**). Az erősítőből egy közel 1 cm átmérőjű nyaláb lép ki, ezt egy teleszkóp segítségével közel 2 mm-re csökkentettük le, majd a nyalábot egy nyalábosztó tükör segítségével két részre osztottuk, 90:10 % arányban. Az intenzívebb nyalábot egy 2 mm vastag és 5-5 mm széles BBO kristályba vezettük azt követően, hogy a nyaláb intenzitását egy ND filterrel jelentősen csökkentettük. Erre azért van szükség, hogy a túl intenzív lézerimpulzus ne tegye tönkre a kristályt. A BBO kristály a gyártáskor úgy van levágva (az ordinárius tengely  $29^\circ$ -ot zár be az optikai tengellyel), hogyha a nyalábba merőlegesen helyezük el, akkor teljesül a fázisillesztés, vagyis az energia és impulzusmegmaradás elve. Ebben az esetben a kristályból kétszeres frekvenciájú fotonok lépnek ki – esetünkben 400 nm – a polarizáció viszont  $90^\circ$  – kal elfordul, amiről nem szabad elfeledkezni a későbbiek során. A frekvenciakétszerezés hatásfoka 10 % körüli, ilyen módon a BBO-ból kilépő nyaláb impulzus-energiája 10  $\mu\text{J}$  körüli; ezt a minta előtt még egy ND szűrővel 1  $\mu\text{J}$  alá csökkentettük.

Azokban az esetekben, amikor a 400 nm-től jelentősen eltérő gerjesztő impulzusra volt szükség, akkor nem kollinearás optikai parametrikus erősítőt (NOPA) használtam, amelyet magam építtem a tranziens abszorpciós rendszerbe. A Biofizikai Intézetben működő tranziens abszorpciós rendszerhez 2020-ban sikerült megvásárolnunk a litván Light Conversion cég által gyártott optikai parametrikus erősítőt (OPA), amely 295 nm és 1600 nm között szoftveresen hangolható.

*Fehér fény kontinuum keltés*

A fehér fény kontinuum létrehozása során a feljebb ismertetett optikai Kerr-effektus következményét, az önfázis-moduláció jelenségét használjuk ki. Nagy intenzitások esetében ugyanis – az  $n(I) = n_0 + n_2(I) + \dots$  összefüggés miatt – az (5) összefüggés által leírt fázisnak lesz egy nemlineáris tagja is:



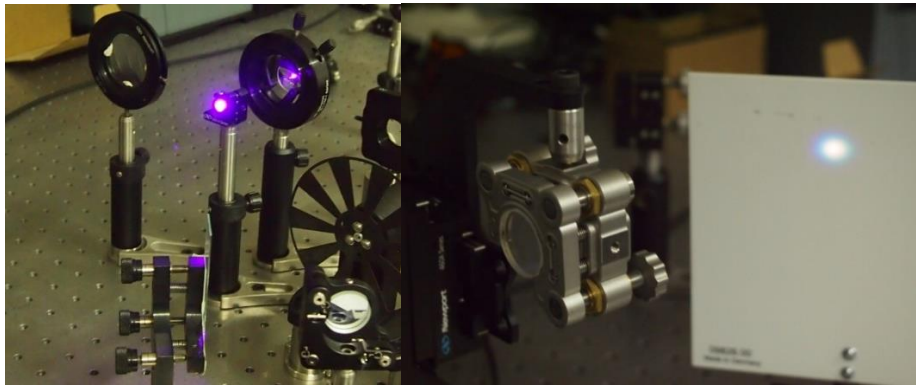
$$\phi_{nl} = \frac{\omega L n_2 I(t)}{c}$$

Mivel az x irányba terjedő impulzus elektromos tere a következőképpen adható meg:

$E(t) \cos(\omega t - kx)$ , ahol  $k$  hullámszám  $\omega n/c$ -vel egyenlő. Nagy intenzitású nyaláb esetében az elektromos tér tartalmazni fog egy, a nemlineáris törésmutató tagtól ( $n_2$ ) függő frekvencia komponens is, aminek következtében a térerősség a következőképpen módosul:

$$E(t) \cos(\omega t + \xi t - kx),$$

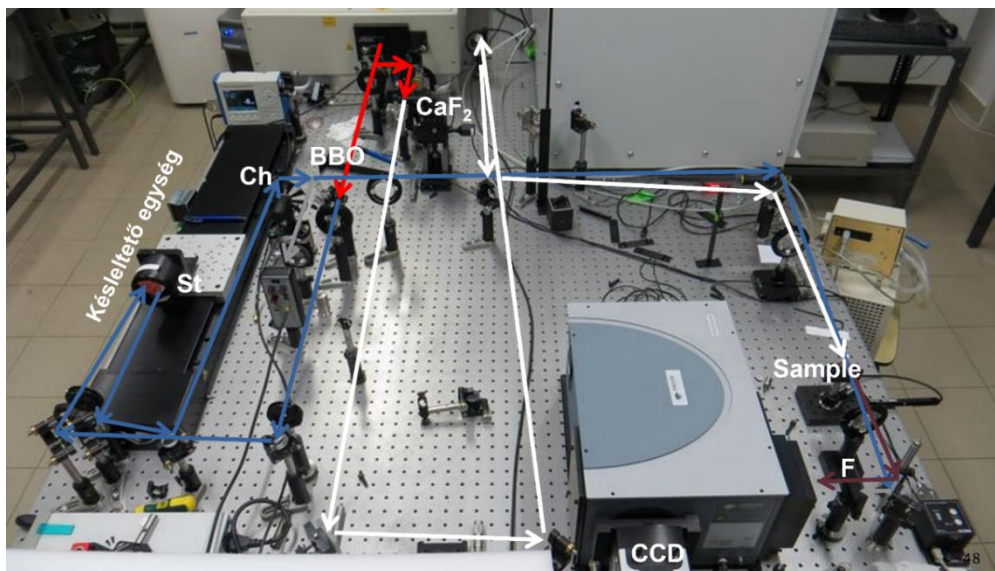
ahol  $\xi$  függ a nemlineáris törésmutatótól, az impulzus szélességétől és intenzitásától, valamint a közegben megtett úttól. A jelenség következtében az impulzus spektrálisan kiszélesedik, így egy széles spektrumú, fehér fény kontinuumnak nevezett impulzussal fogunk rendelkezni (2.4 B ábra).



**2.4 ábra** A) Frekvenciakészerezés (SHG) 2mm-es vastagságú BBO kristályban B) Fehér fény kontinuum előállítása CaF<sub>2</sub> kristályban

A próba impulzust az esetek túlnyomó részében 2 mm vastag CaF<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> kristályt használtunk a próba impulzus létrehozásához. A CaF<sub>2</sub> kristály kedvező tulajdonsága ugyanis, hogy a keltett fehér fény kontinuum 400-800 nm tartományra terjeszhető ki, komoly hátránya azonban – például a zafírral szemben – hogy hővezetési tulajdonsága kedvezőtlen, ezért folyamatosan mozgatni kell. Annak érdekében, hogy a fehér fény kontinuum előállításához használt nagy energiájú impulzusok

ne tegyenek kárt a kristályban, a  $\text{CaF}_2$  lemezt egy Thorlabs DRV014 léptetőmotorral mintegy 0.25-0.5 Hz frekvenciával folyamatosan mozgattunk. A kristályban található inhomogenitások miatt a nyaláb kristályba való fókuszálása során körültekintően kellett eljárni, ellenkező esetben a keret mozgásával szinkronban a fehér fény kontinuum „vibrálni” kezd, ez pedig tönkreteszi a mérést. A mérések elvégzésének előfeltétele a pumpa és a próba nyalábok térbeli és időbeli átfedésének megvalósítása. Ez utóbbira azért van szükség, hogy beállítsuk a  $t_0$  időpontot, amikor a pumpa és a próbaimpulzus egy időben érkezik a mintánkba. Az átfedés ellenőrzését általában benzolban oldott oktaetil-porfirinnel szoktuk elvégezni. Az oktaetil-porfirin ugyanis jelentős abszorpcióval rendelkezik 400 nm-en (ezt az irodalomban a Soret-csúcsnak neveznek). Az időbeli átfedés megtalálásakor lenullázzuk a késleltető egységet és ez lesz új zéró időpont. Az okta-etil-porfirin gerjesztett állapota néhány mikroszekundum, úgyhogy nemcsak az időbeli és térbeli átfedés megtalálásához használjuk, hanem a segítségével ellenőrizhető a késleltető egység párhuzamossága: mivel az általunk vizsgált mintegy 2 ns alatt az okta-etil-porfirin abszorpcióváltozása állandó, ha csökkenést figyelünk meg a  $\Delta A$  értékében, akkor az arra utal, hogy a nyalábok nem párhuzamosak, a pumpa nyaláb elmozdul a próba nyalábhoz képest.

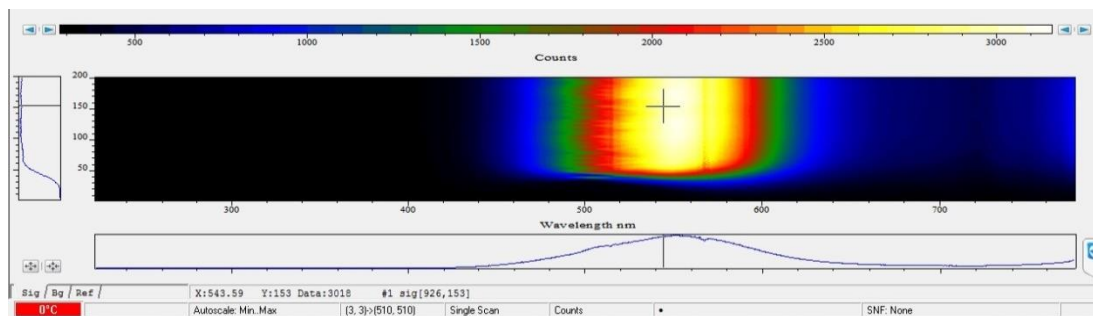


**2.5 ábra** A Biofizikai Intézetben működő transziens abszorpciós rendszer. Az erősítőtől kilépő nyalábot egy nyalábosztóval (90:10) két részre osztjuk. Az intenzívebb nyalábot a BBO kristályba vezetjük, a kevésbé intenzív nyaláb segítségével valósul meg a fehér fény kontinuum keltés a  $\text{CaF}_2$  kristályban

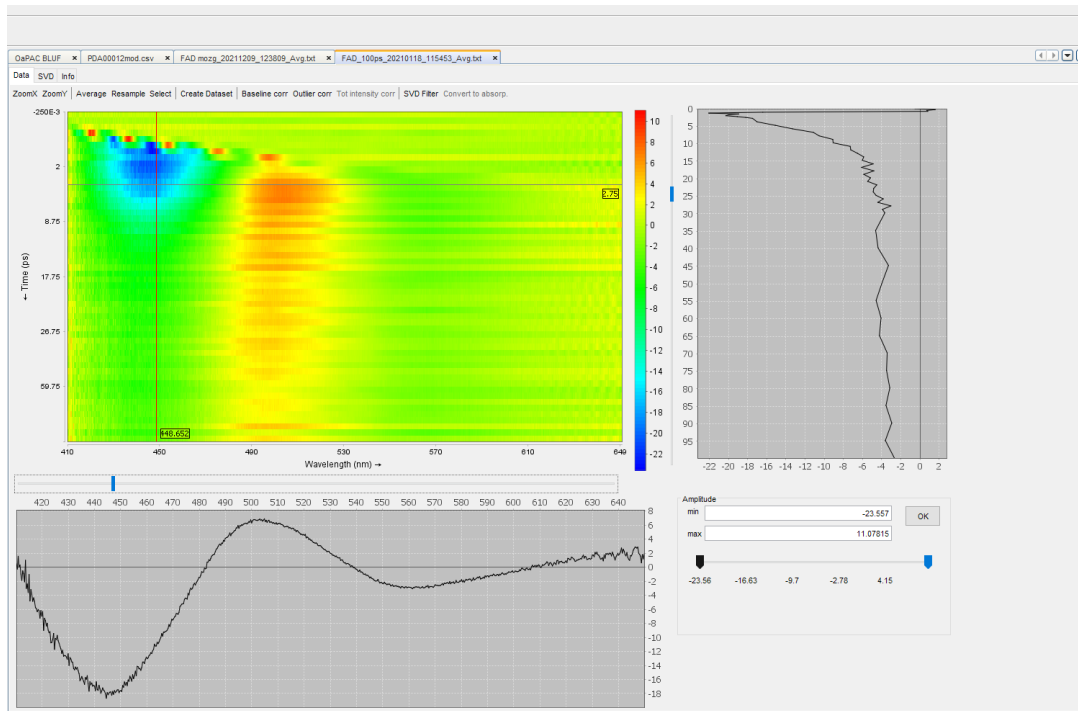
A transziens abszorpciós mérések esetében a mintát többnyire 1 vagy 2 mm-es küvettába helyezünk, ezzel kerülve el az impulzushossz jelentős megnyúlását. 100 fs-os impulzus esetén az

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 küvetta használtunk a nagyobb abszorpció elérése érdekében. Tekintettel arra, hogy a mintáink a legtöbb esetben érzékenyek a gerjesztő impulzusra ezért a küvetta mozgani kell. Erre több megoldást dolgoztunk ki: van egy elliptikus pályát leíró, hűthető mozgató egység, valamint egy két tengelyből álló Lissajoux mozgató (az ezekről készült video a következő Youtube címen elérhető el: <https://youtu.be/Ft37liPhqml>, <https://youtu.be/INrE7Xar8Q>)

Az abszorpcióváltozás detektálása egy Andor Newton típusú 200x1600 pixelt tartalmazó CCD segítségével valósul meg. A CCD-t a kék nyaláb útjába helyezett fényszaggató (chopper) triggereli. A gyorsaság kedvéért a CCD-t full vertical binning (FVB) módban olvassuk ki, ilyen módon a rendszer 250 Hz kiolvasási frekvenciára képes. A chopper trigger jelének segítségével az általunk Labview-ban írt szoftver szétválogatja, a pumpa nélküli ( $I_{\text{pump-off}}$ ) és a pumpa által indukált ( $I_{\text{pump-on}}$ ) spektrumokat és ebből számolja ki az abszorpcióváltozást.



**2.6 ábra** A  $\text{CaF}_2$  kristályban keltett fehér fény kontinuum az Andor Newton CCD-n



**2.7 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 **2.7 ábrán** látható spektrum a FAD abszorpció változás a gerjesztést követően. A spektrum jól láthatóan három részre tagolódik:

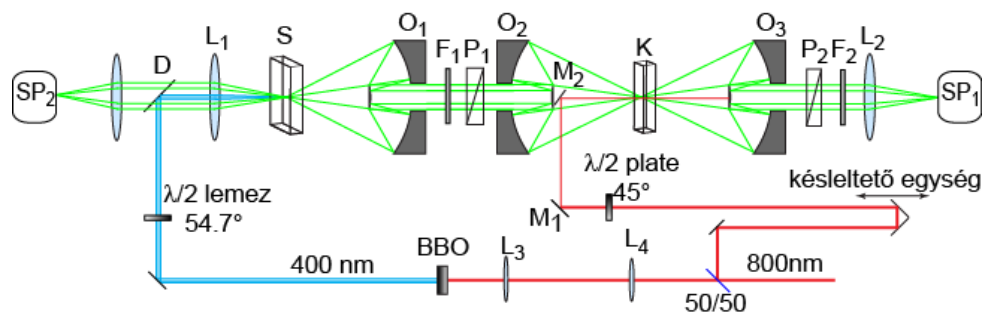
- A 450 nm körül megfigyelhető negatív abszorpcióváltozás az úgynevezett kifehéredés vagy „bleaching”. Ez a jelenség azoknál a hullámhosszaknál figyelhető meg, ahol a mintának abszorpciós csúcsa van. Mivel a gerjesztés következtében egy jelentős elektron populáció gerjesztett állapotban van, ezért ezen 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.

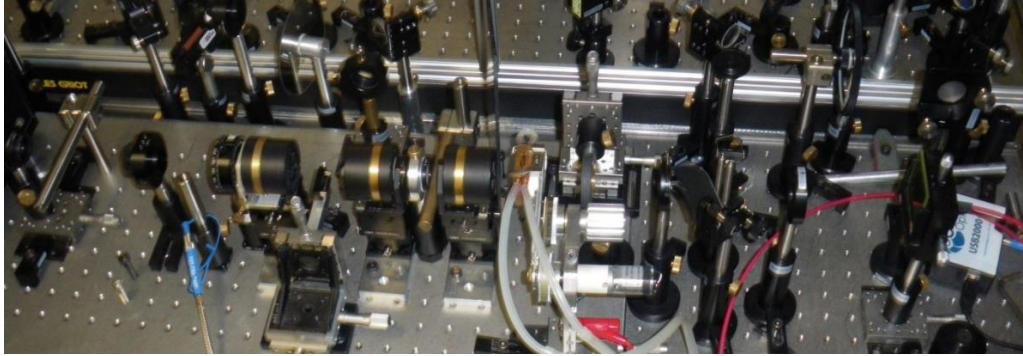
### 2.3 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia

A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia az optikai Kerr-effektusra épül, amelyet röviden úgy lehetne összefoglalni, hogy nagy intenzitású lézerimpulzus 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<sub>2</sub>-ben, vagy benzolban, de ennél jóval gyengébb az elforgatás mértéke például üvegben.

A berendezés működésének elve látható a **2.8 ábrán**<sup>31</sup>: 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<sub>2</sub> 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 lefokuszálni 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 lézerimpulzus okozta Kerr-hatás következtében az áthaladó fény elliptikusan polarizálttá válik, így egy része áthalad a P2-es polarizátoron, ezt a fényt gyűjtjük be az O<sub>3</sub>-as Cassegrain objektívvel. A mérés során a késleltető egység mozgatásával szabályozzuk, azt, hogy a Kerr-kapu mikor „nyisson” ki a gerjesztő impulzushoz képest.

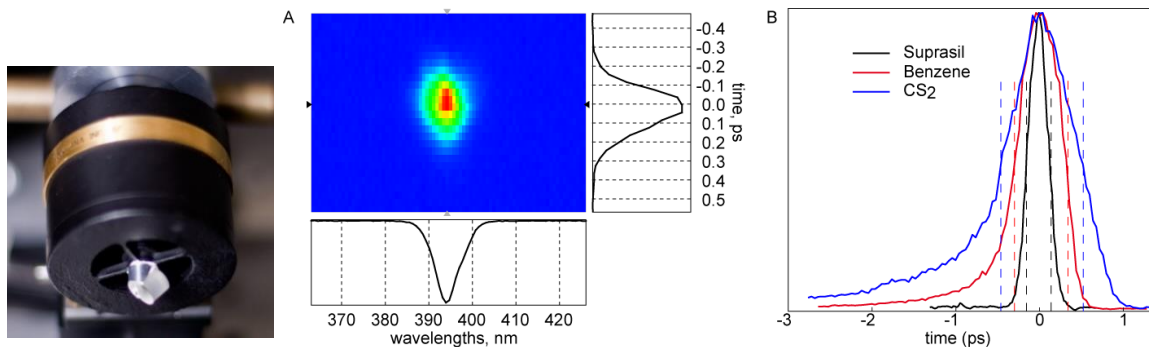






**2.8 ábra:** A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópai berendezés elvi rajza (felül) valamint a megépített berendezés fényképe (alul)

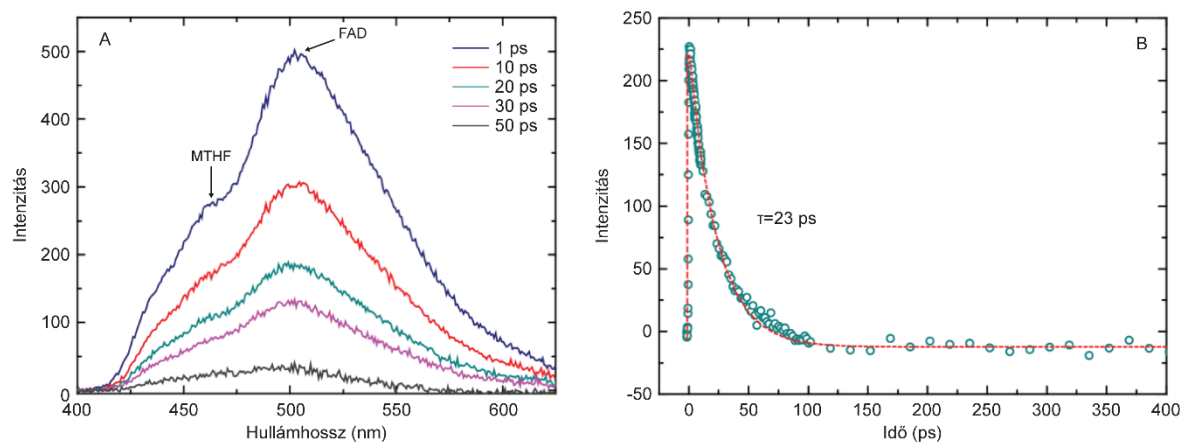
A megvalósítás során több technikai akadályt kellett megoldanunk: az egyik legfontosabb a Kerr-effektust megvalósító 800 nm-es lézernyaláb és a fluoreszcens nyaláb térbeli átfedésének megoldása volt. Ezt végül úgy oldottam meg, hogy a lézernyalábot egy kis tükörrel – amelyet a Cassegrain-objektívra ragasztottam – irányítottam a Kerr kapura (lásd **2.9-es ábra**). A pontos beállításhoz egy 100 mikronos aperturát használtam: amikor lézer és a fluoreszcens nyaláb is átment az apertúrán, akkor az apertúra helyére visszaraktam a Kerr-anyagot. A kísérlet beállítását mindig széndiszulfiddal ( $\text{CS}_2$ ) kezdtem, a lézernyaláb ugyanis jelentős Kerr-hatást hoz létre ebben az oldatban. A **2.10-es ábrán** ugyanakkor lászik, hogy Kerr-effektus több mint 1 ps-ig fennmarad, a mérésünk időfelbontása ilyen esetben tehát valamivel több, mint 1 ps. Rövidebb az időfelbontás benzol vagy Suprasil lemez esetében, de a fluoreszcens fotonok száma is kevesebb.



**2.9 ábra** Cassegrain-objektív, a 45°-ban felragasztott pick-up tükörrel. A jobboldali ábrán az alkalmazott Kerr-anyagok időfelbontásának összehasonlítása. (Forrás: Lapténok, Nürnberg, Lukacs and Vos, in: Fluorescence Spectroscopy and Microscopy Methods in Molecular Biology Volume 1076, 2014)

Egy elfogadható kompromisszumként a legtöbb mérésünk során benzolt alkalmaztunk Kerr-anyagként, ebben az esetben az időfelbontás  $\sim 500$  fs volt, amely a dolgozatban bemutatott folyamatok során elegendőnek bizonyult.

A műszert egy a fotoliázon végzett FRET mérésel teszteltük: a fotoliában a metil-tetrahidrofolát (MTHF) antenna segíti a javítás hatékonyságának növelését, az antenna extinkciós együtthatója mintegy ötször nagyobb, mint a FAD abszorpciója ugyanebben a régióban. A folyamat során az MTHF elnyeli a fényt és FRET segítségével adja át energiáját a FAD-nak. A FRET hatásfok számítása érdekében megmértük az MTHF élettartamát oldatban, illetve a fehérjében.



**2.10 ábra** A) Vad típusú fotoliáz spektruma mérése különböző késleltetéseknél. A gerjesztési hullámhossz (390 nm) az MTHF antennát és a FAD-ot is gerjeszti, 460 nm körül található az MTHF emissziós maximuma, a FAD emissziós maximuma  $\sim 510$  nm-nél figyelhető meg. B) A 450 nm-nél megfigyelt kinetika csak az MTHF relaxációjára jellemző

A fluoreszcencia élettartamok ismeretében a FRET hatásfok kiszámítása nagyon egyszerű a következő képlet segítségével:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D},$$

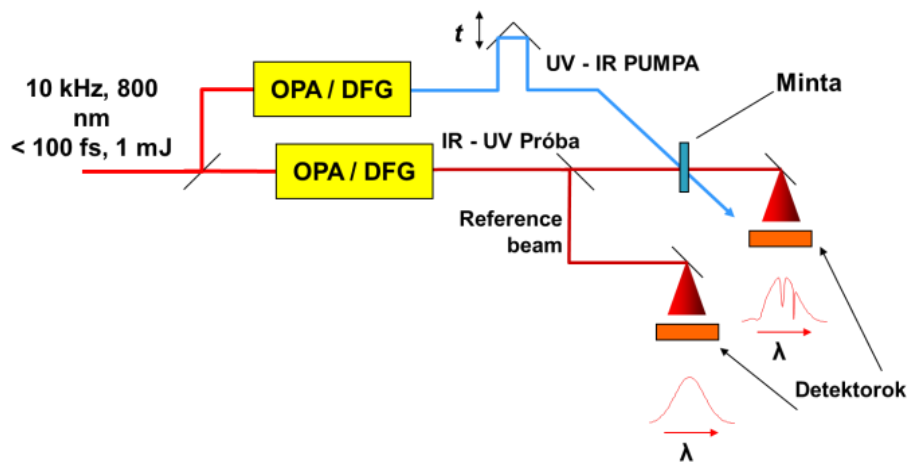
ahol a  $\tau_{DA}$  a donor élettartama az akceptor jelenlétében, a  $\tau_D$  pedig a donor élettartama

akceptor hiányában. Oldatban az antenna élettartama  $\tau_{MTHF} = 354$  ps, a fehérjében viszont 23 ps volt. Ennek megfelelően a számolt FRET hatásfok 93.5 % -nak adódott. Ismerve azt, hogy az antenna és a FAD közel merőleges egymásra, ki tudtuk számolni a közöttük levő távolságot, amely 17.53 Å-nek adódott, ami megfelel a röntgenkristallográfiával megfigyelt értéknek, a teszt tehát egészen jól sikerült.

## 2.4 Infravörös tranziens abszorpciós spektroszkópia

Az alábbiakban ismertetett méréseket a Ruherford Appleton Laboratory, Central Laser Facility Lasers for Sciences nevű kutatóintézet ULTRA nevű berendezésén végeztük el<sup>32</sup>. 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  $3 \text{ cm}^{-1}$ -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.

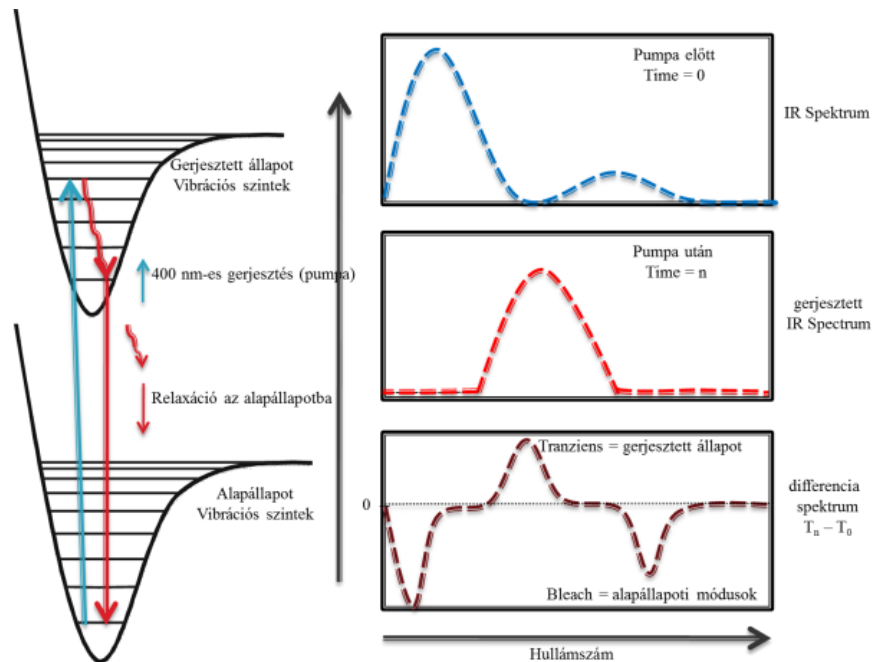


**2.11 ábra** A tranziens infravörös abszorpciós spektroszkópiai rendszer egy úgynevezett pumpa-próba módszer, vagyis először gerjesztjük (ez a pumpa) a mintát, majd egyre növekvő késleltetéssel világítjuk át a próba nyalábbal. Ez alapján idő függvényében számolható az abszorpcióváltozás. (forrás: Greg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

A spektrum alakját illetően az 2.12 ábra ad eligazodást: azok a csúcsok, ahol a mintának volt abszorpciója a gerjesztést megelőzően is, negatív előjellel jelennek meg a spektrumban (ezeket a



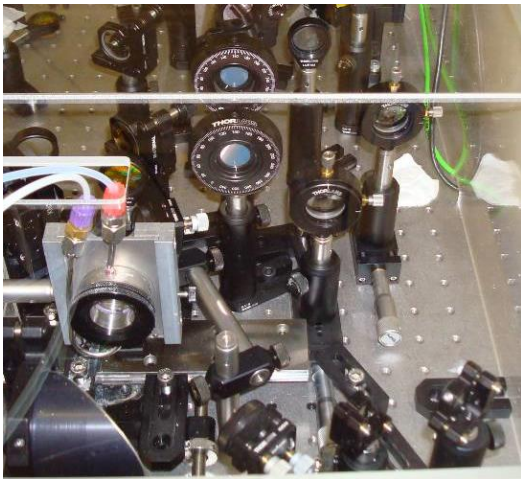
szaknyelv „bleach”-ként nevezi), azok a csúcok viszont, amelyek a gerjesztést követően jöttek létre pozitívak lesznek (ez utóbbiakat tranzienseknek vagy indukált abszorpciónak hívjuk).



2.12 ábra Az infravörös abszorpcióváltozás modellje

### *Mintatartó, minta mozgató*

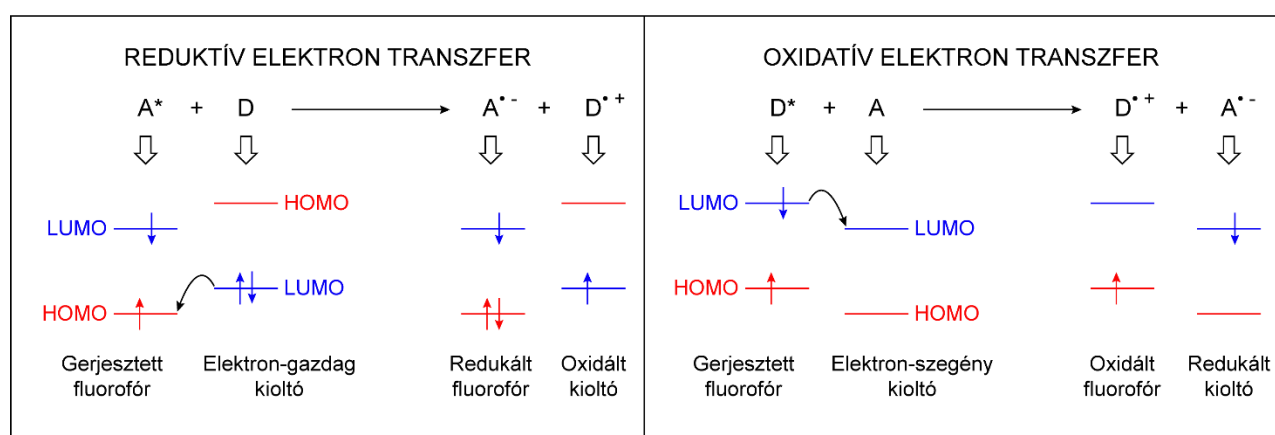
Az infravörös tranziens abszorpciós mérések egyik kritikus eleme az alkalmazott mintatartó, valamint a minta mozgató. Méréseink során az úgynevezett Harrick mintatartókat alkalmaztuk, amelyek esetében a mintát két kör alakú – egyenként 2 mm-es  $\text{CaF}_2$  lemez közé helyeztük; a két lemezt egy 50  $\mu\text{m}$  vastagságú távtartó választotta el egymástól. A használt minta mennyisége mindössze 50-70  $\mu\text{l}$  volt, azokban az esetekben, amikor a mintát nem áramoltattuk. A legtöbb esetben, annak érdekében, hogy minden lézerpulzus friss mintát gerjessze, ezért a mintát egy perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattuk. Ezekben az esetekben mintegy 500-600  $\mu\text{l}$  mintára volt szükség.



**2.13 ábra** A bal oldalon az infravörös tranziens abszorpciós rendszerben használt mintatartó látható, a jobb oldalon egy termosztálható Harrick mintatartó látható.

### 3. Fotoindukált elektron transzfer flavoproteinekben<sup>1</sup>

A fotoindukált elektron transzfer jól ismert folyamat a fotokémiában, amelynek során, ha egy molekulát fényel gerjesztünk, az a környezetéből egy elektront von el. Ez a folyamat gyakori oka a fluoreszcencia megszűnésének vagy más néven kioltásának, sok esetben ugyanis a gerjesztett állapotban levő molekula egy elektront von el környezetéből, aminek következtében megszűnik a gerjesztett állapot, vagyis a fluoreszcencia gyorsabban eltűnik.



**3.1 ábra** Az elektron transzfer folyamata elektron donor (balra) és elektron akceptor esetében (jobb oldali ábra). (Forrás: Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence*)

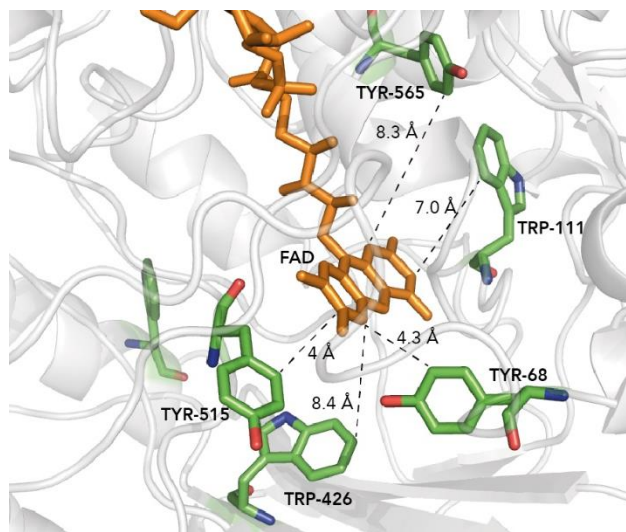
A **3.1 ábrán** látható a fényindukált elektron transzfer két esete: az első esetben a gerjesztett állapotban levő molekula egy elektront kap egy elektronban gazdag közeli molekulától. Ezen a módon az akceptor molekula anionos gyökké a donor molekula pedig kationos gyökké válik. Az ellentétes esetben a gerjesztett molekula egyben az elektron donor is, így a gerjesztést követően átad egy elektront a közelben levő akceptornak. A gerjesztett molekula (átmenetileg) ilyen módon kation gyökké, az elektron akceptor pedig anionos gyökké alakul. Az irodalomban számos elektron

<sup>1</sup> Az ebben a fejezetben ismertetett eredmények a Lukacs et al., *J. Phys. Chem B.* (2012), Lukacs et. al *JACS* (2014), Nag, Lukacs, Vos, *Chemphyschem* (2019), Pirisi K et al, *Photochem Photobiol Sci* (2021) közleményekben jelentek meg.

donor ismert, mint például a naftalin, az antracén, pirén vagy perilén, elektron akceptorként ismert például a 9,10-dicianoantracén.

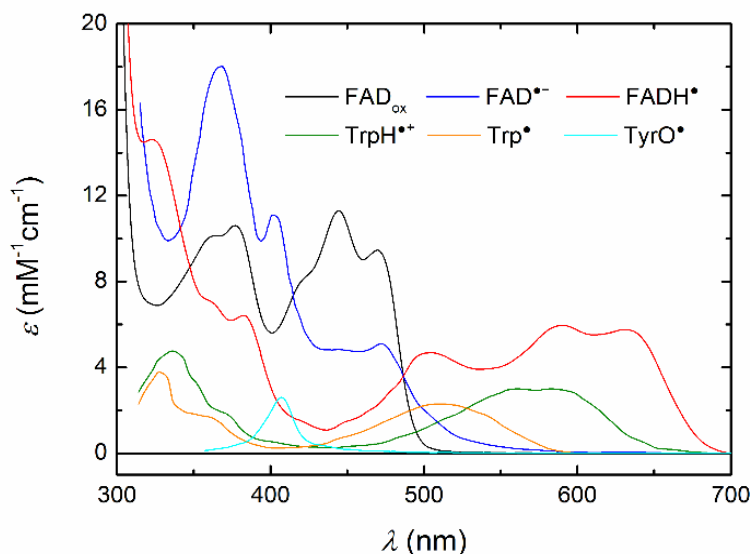
Nagyon gyakran elektron akceptorként viselkednek a flavinok is, ezekre ugyanis általában igaz, hogyha gerjesztett állapotba kerülnek, akkor a környezetükből elektront vesznek fel<sup>33,34</sup>. A folyamat nem csak fehérjékben, hanem még oldatban is megfigyelhető: a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) esetében a gerjesztést követően a ribitil lánc végén található adenin gyűrűről egy elektron „ugrik” az izoalloxazin gyűrűre. Ez az oka annak, hogy az FAD esetében két fluoreszcencia élettartam figyelhető meg, egy hosszú 3 ns körüli, illetve egy nagyon rövid 9 ps körüli. A hosszabb élettartam az FAD nyitott a rövidebbik pedig a zárt konformációjának felel meg (ez utóbbi esetben az adenin közel helyezkedik el az izoalloxazin gyűrűhöz)<sup>35</sup>.

A flavoproteinekben lejátszódó elektron transzferről az 1999-es év kémiai Nobel-díj nyertese Ahmed Zewail számolt be először, aki glükóz oxidázban figyelte meg a jelenséget<sup>36</sup>. Zewail a Nobel-díjat a kémiai reakciók femtoszekundumos spektroszkópiával való megfigyeléséért kapta, így nem csoda, hogy neki sikerült elsők között megfigyelnie a flavoproteinekben lejátszódó elektron transzfer folyamatot; fehérjékben ez a jelenség ugyanis nagyon gyorsan, mondhatni „ultragyorsan” megy végbe. Ez az oka annak, hogy a glükóz oxidázt sokszor említik úgy, mint egy olyan flavoprotein, amelyik nem képes fluoreszcenciára. Zewail és Zhong mérései szerint azonban a fluoreszcencia a glükóz oxidázban is megfigyelhető, de csak tranziens módon, nagyon rövid ideig.



**3.2 ábra** A glükóz oxidáz szerkezete. Az FAD körül (narancs) a potenciális elektron donorok (közel triptofánok és tirozinok) vannak kiemelve. (pdb: 1CF3)

Zewail következtetése szerint a glükóz oxidázban (**3.2 ábra**) valamelyik közeli triptofán az elektron donor: a rövid távolság az oka a hatékony elektron transzfernek és egyben a fluoreszcencia gyors kioltásának is.<sup>36</sup> Saját kísérleteink ezzel szemben azt igazolták (lásd a fejezet későbbi részében), hogy az elsődleges elektron donor valamelyik közeli tirozin – az elhelyezkedésből adódóan valószínűleg Y68. Látható és infravörös ultragyors transziens abszorpciós kísérleteinkkel ugyanis sikerült kimutatni a tirozin kation gyök kialakulását<sup>37,38</sup>. A gerjesztést követő közel 1 ps alatt az egyik tirozinról egy elektron a gerjesztett flavinra ugrik, így jön létre az anionos FAD és tirozin kation gyök pár ( $\text{FAD}^{\bullet-} - \text{TyrOH}^{\bullet+}$ ). Egy következő lépésben a flavin a tirozin kation gyök protonálja a flavint, aminek következtében közel 4 ps alatt létrejött a semleges flavin és tirozin gyök pár ( $\text{FADH}^{\bullet} - \text{TyrO}^{\bullet}$ )



**3.3 ábra** A FAD abszorpciós spektrumai oxidált, anionos gyök és semleges gyök állapotában, valamint a triptofán és a tirozin gyökök spektrumai

A glükóz oxidázban végbemenő elektron transzfernél sokkal gyorsabb folyamatot sikerült megfigyelni flavodoxin esetében, amelyben az FMN-hez közel elhelyezkedő tirozin az elektron donor. A flavodoxinban ráadásul, a fotoindukált elektron transzfer folyamata kevesebb mint 200 fs alatt valósul meg, ezt elsőként Mataga és munkatársainak sikerült megfigyelni fluoreszcencia upkonverziós mérések segítségével<sup>39</sup>. Az általuk alkalmazott transziens abszorpciós rendszer

időfelbontása 100 fs közeli volt, így méréseink esetében nem sikerült ilyen pontos méréseket végeznünk, elértük ugyanis a rendszer időfelbontásának határát<sup>40</sup>.

Fontos megfigyelés, hogy a flavoproteinek esetében a fordított logika is működik: ha sikerül „megszabadítani” a flavin környezetét a potenciális elektron donoroktól (elsősorban triptofántól és tirozintól) akkor növelni lehet a flavin fluoreszcencia kvantum hatásfokát. Egy amerikai kutatócsoport a bakteriális MurB enzim módosításával egy flavin alapú (vagyis nem GFP analóg) fluoreszcens fehérjét hozott létre, amelyet LucY-nak (Lucigen Yellow) neveztek el<sup>41</sup>. A Lucy kvantumhatásfoka 40 százalék körül van, amelyet úgy sikerült elérni, hogy a FAD körüli lehetséges elektron donorokat (triptofánokat és tirozinokat) eltávolították.

### 3.1 Fotoindukált elektron transzfer szerepe a fehérje funkciójában

A fotoindukált elektron transzfer jelenségét külön izgalmassá teszi az, hogy számos olyan flavoprotein van, amelyek esetében az elektron transzfer az adott fehérje funkciójában játszik kulcsszerepet (a glükóz oxidáz vagy a flavodoxin esetében ez ugyanis nem funkcionális). Ilyen fehérjék a korábban már említett kriptokrómok, vagy ugyanebbe a fehérjecsaládba tartozó fotoliázok. Mindkét fehérjecsalád esetében a fény abszorpciót követően egy több lépéses elektron transzfer kaszkádra kerül sor, amelyben három közeli triptofán vesz részt.

A fotoliázok esetében érdekes részlet, hogy a tisztítást követően a flavin félig redukált állapotban (FADH<sup>•</sup>) van, a DNS szál javítására viszont csak abban az esetben kerül sor, ha teljesen redukálódik. Ez szintén fotoindukált elektron transzfer segítségével valósul meg: a gerjesztést követően a flavin egy elektront von el a legközelebbi triptofánról, aminek következtében redukálódik. A töltéshiány 30 ps alatt „végigfut” a triptofánokon és a terminális triptofán mintegy 200 ns-ig kationos gyök állapotban marad, ezt követően kerül sor a deprotonálódására<sup>24,42,43</sup>.

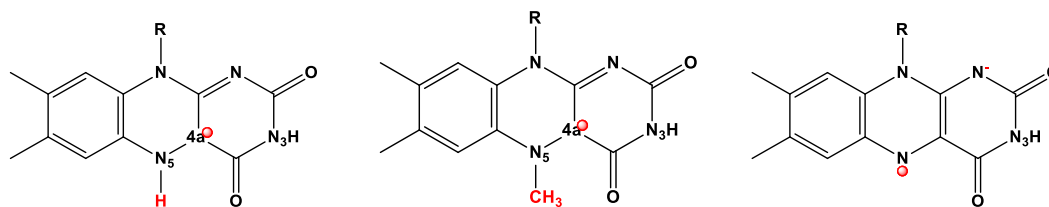
A kriptokrómok esetében nagy általánosságban elmondható, hogy a flavin kezdetben oxidált állapotban van. A gerjesztést követően néhány 100 fs alatt a legközelebb eső triptofánról egy elektron „ugrik” az izoalloxazin gyűrűre, amelynek következtében a flavin anionos redukált állapotba (FAD<sup>•-</sup>) kerül a triptofán pedig oxidálódik (TrpH<sup>•+</sup>). A folyamat megfigyelésében nagy segítséget jelent, hogy a flavin redox állapotai de ehhez hasonlóan a triptofán gyökök is, jól megkülönböztethető abszorpciós spektrummal rendelkeznek (lásd **3.3 ábra**), amelyek segítségünkre vannak a spektrális modellezés során.

A kriptokróm/fotoliáz esetében megismert működés nyomán logikusnak tűnt az az előfeltevés, hogy a fotoindukált elektron transzfernek nemcsak ebben az esetben, hanem más fotoaktív flavoproteinek esetében (BLUF domén fehérjék, LOV fehérjék) is funkcionális feladata van. Ahhoz, hogy ennek megvalósulását vagy ennek a hiányát bizonyítani tudjuk, szükség volt a flavin különböző gyökállapotainak abszorpciós spektrumainak (a látható tartományban) illetve vibrációs markereinek meghatározására.

### 3.2 Semleges és anionos flavin gyök spektrális tulajdonságainak karakterizálása

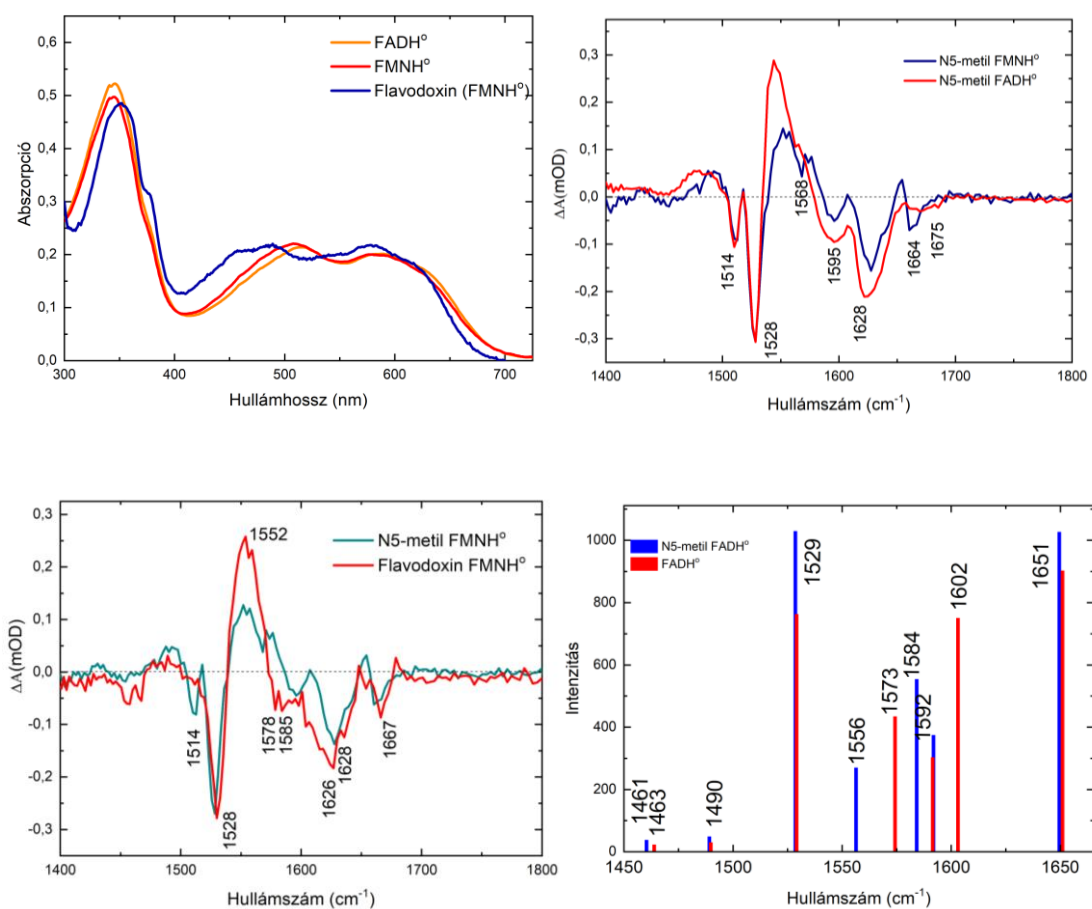
Annak érdekében, hogy a gerjesztést követő elektron transzfer lépéseket, és a megjelenő gyököket azonosítani tudjuk, szükséges azok spektrális tulajdonságainak és vibrációs markereinek meghatározása. Időrendi sorrendben először a teljesen redukált FAD majd a semleges flavin gyök vibrációs markereit sikerült meghatároznom.

A tranziens infravörös abszorpciós mérések során az egyik nehézséget az okozza, hogy a mintát két CaF<sub>2</sub> lemez közé helyezzük, amelyhez (tipikusan) egy 50 µm-es távtartót használunk. Ahhoz, hogy értékelhető jelet kapjunk a minta koncentrációjának nagyon magasnak kell lennie (> 0.5 mM). Ennek megfelelően, hogy a semleges flavin gyök vibrációs módusait meghatározzuk nagy koncentrációban lett volna szükségünk fotoliázra vagy glükóz oxidázra. Ezt később sikerült megvalósítanunk, de első megközelítésben, a magas koncentráció elérése érdekében, meg azért, hogy a kísérleti eredményeinket direkt módon tudjuk összehasonlítani DFT számításainkkal, először Azaria Eisenberg módszerét<sup>44</sup> követve egy metil csoportot kapcsolunk a flavin N5 atomjához, így sikerült oldatban (is) stabilizálnuk a semleges gyök állapotot (**3.4 ábra**). Ez önmagában nagy siker volt, a semleges és anionos flavin gyök karakterizálásához mindenki fehérjében stabilizált flavin gyököket használ<sup>45,46</sup>. A teljesen redukált állapotot ennél lényegesebben (FADH<sup>-</sup>, FADH<sub>2</sub>) könnyebben elő tudtuk állítani nátrium hidroszulfát titrálással<sup>47</sup>.



**3.4. ábra** A) Semleges gyök (FADH•) B) Metilált semleges flavin gyök (FAD(CH<sub>3</sub>)•) C) Anionos flavin gyök FAD•<sup>-</sup>

Ezt követően TRIR méréseket végeztünk a metilált flavin gyökökön és flavodoxinon; ez utóbbiban fotokémiai redukálással sikerült stabilizálnunk a semleges gyököt<sup>46</sup>, amely az alábbi abszorpciós spektrumokból jól látszik. A tranziens infravörös mérések során négy domináns módust figyeltünk meg 1514, 1528, 1595 és 1628  $\text{cm}^{-1}$ -nél, amely mindkét flavin esetében megjelent. A flavodoxin esetében az 1514  $\text{cm}^{-1}$  módus eltűnt. A DFT számításaink alapján arra következtettünk, hogy ez a frekvencia az N<sub>5</sub>H csóváló módusnak felel meg, további számításaink – amikor víz molekulákat helyeztünk el a C=O és a C2=O karbonilokhoz közel – azt mutatták, hogy érzékeny a hidrogén kötésekre, azok erősödésével az intenzitása jelentősen csökken<sup>40</sup>.



**3.5 ábra** A felső sorban a semleges flavin gyökök UV-Vis abszorpciós spektruma látható, valamint a metilált flavinok infravörös tranziens abszorpciós spektruma 3 ps-nál. Ezek közös jellegzetessége a 450-600 nm között megfigyelt plató; ennek a megjelenése minden esetben semleges gyök létrejöttét jelzi.



A legintenzívebb vibrációs módus az  $1528\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt „bleach”, amely az összes mérés esetében domináns maradt. A DFT számításaink alapján ez a frekvencia az izoalloxazin gyűrű I-es gyűrűjének C-C rezgéséből valamint  $\text{C}_{4a}\text{N}_5$  és a  $\text{C}_{10a}\text{N}_1$  atomok nyújtórezgéseiből adódik<sup>40</sup>.

Glükóz oxidáz esetében ezt a vibrációs módust  $1530\text{ cm}^{-1}$ -nél sikerült megfigyelnünk<sup>40</sup>; ebben az esetben fotokémiai módszerrel<sup>46</sup> sikerült a FAD félig redukált állapotát stabilizálni.

Nátrium szulfáttal való titrálás segítségével sikerült a FAD anionos gyökét ( $\text{FAD}^{\cdot-}$ ) is létrehozunk glükóz oxidázban. Ebben az esetben az  $1517\text{ cm}^{-1}$ -t sikerült vibrációs markerként meghatározunk.

Ezt a vibrációs módust másoknak is sikerült kriptokrómban megfigyelni FTIR segítségével<sup>48-50</sup>.

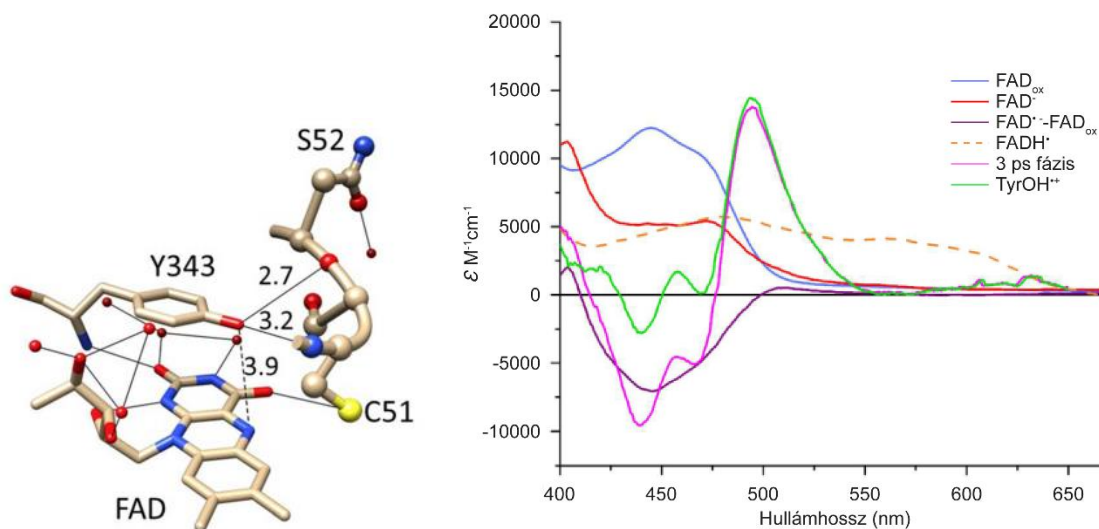
A FAD anionos és semleges gyökeihez tartozó vibrációs markerek azonosítása a fotoliázban és a BLUF domén fehérjékben lezajló elektron transzfer folyamatok leírása során játszott fontos szerepet.

### 3.3 Tirozin gyökök vibrációs markereinek azonosítása

A tirozin gyökök vibrációs markereinek ismerete különös fontossággal bír a BLUF domén fehérjék esetében; a fotoaktív flavoproteineknek ennél a csoportjánál ugyanis egy közeli tirozin a lehetséges elektron donor<sup>51-55</sup>. Az elektron transzfer folyamat megfigyelése érdekében tehát nagy segítséget jelent, ha közvetlen módon sikerülne 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<sub>Z</sub> 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 tirozin kation gyök ( $\text{TyrOH}^+$ ) 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 flavoenzimből figyelte meg a tirozin kation gyök kialakulását ultragyors transziens abszorpció segítségével<sup>56</sup>. A *Thermus thermophilus*ban található Trmfo több szempontból is különlegesen 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*ből származó Trmfo-ban az addukt stabil marad, a fehérje pedig gyengén fluoreszcens, a fluoreszcencia élettartam  $1.2\text{ ps}$  körül van. Egy másik lényeges

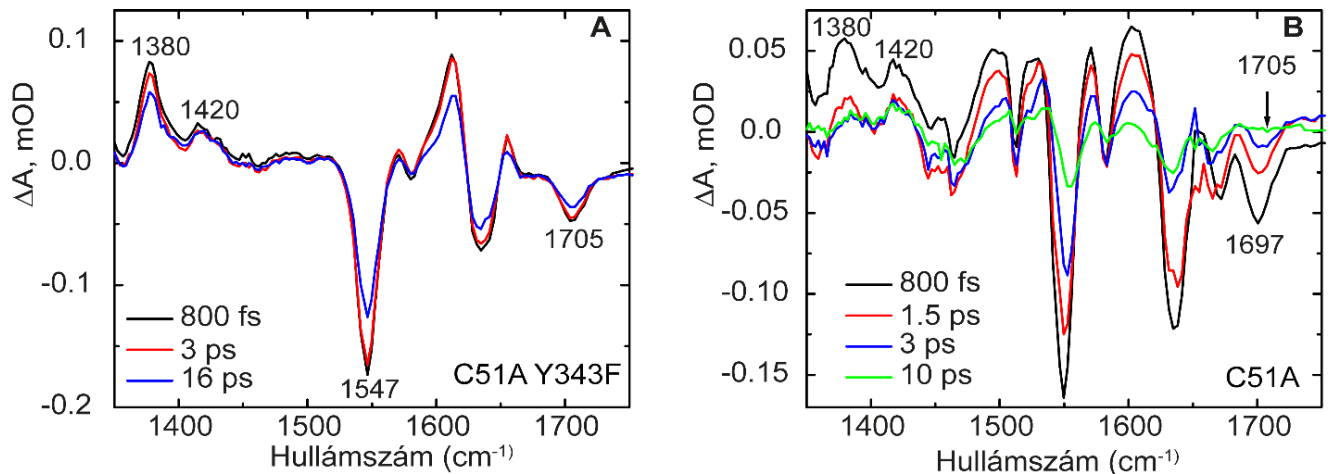
különbség a *B. subtilis* Trmfo-val szemben, hogy ennek a fehérjének ismert a szerkezete és ez óriási előny volt a kísérletek megtervezésénél és értelmezésénél. A kísérletek a C51A Trmfo mutánson lettek kivitelezve, így a folyamat fotokémiája a tirozintól induló elektron transzfer irányába lett eltolva. 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 transzfer feltételez. Marten Vos és munkatársai ultragyors transziens abszorpciós méréseket végzett 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 tartományban<sup>56</sup>.

A sikeres transziens abszorpciós kísérleteket követően vetődött fel, hogy ezeket kísérleteket az infravörös tartományban is megismételjük és így azonosítsuk a tirozin gyök vibrációs módusait.



**3.6 ábra** Az ábra baloldalán *T. thermophilus*-ból való Trmfo flavin közeli szerkezete. A jobb oldalon a spektrális dekompozícióval meghatározott tirozin kation gyök spektrum (zöld). (Nag et al., *JACS*, 2017)

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 **3.7 ábrán** látható.

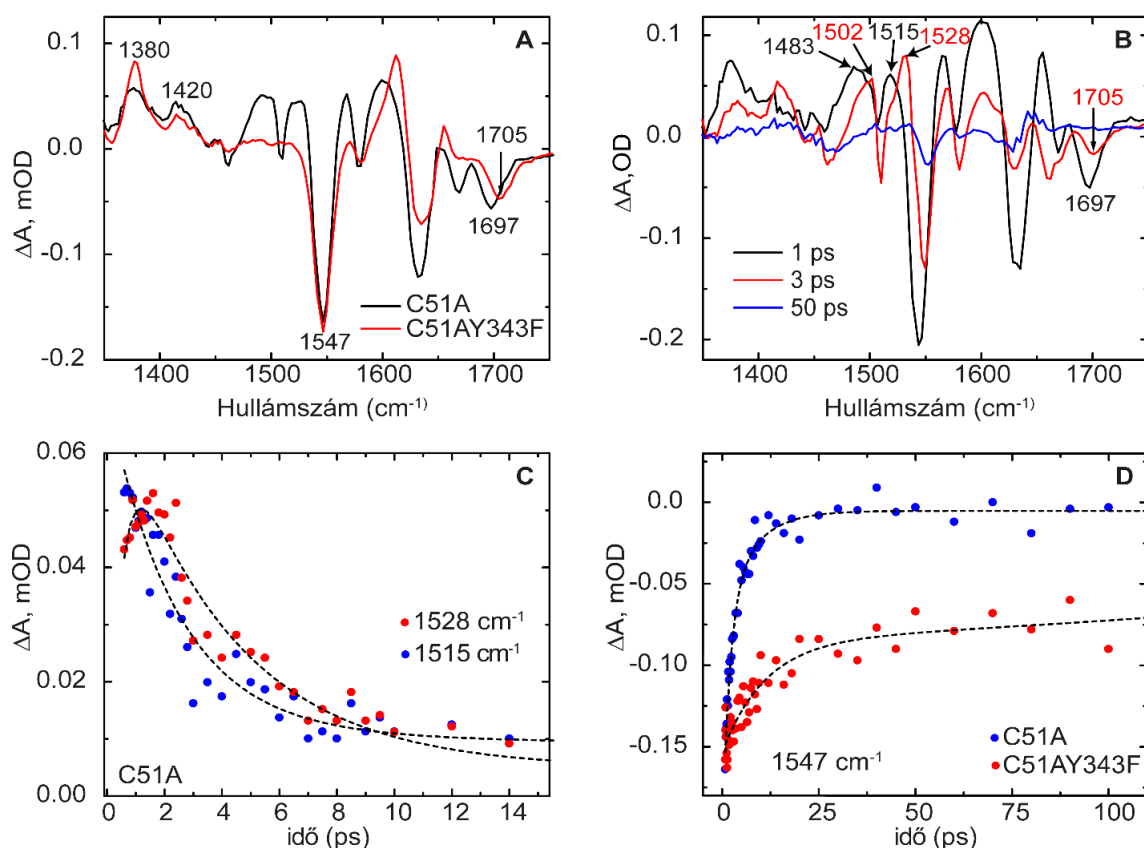


**3.7 ábra** Infravörös transziens vörös spektroszkópiai mérések a C51AY343F (A) és a C51A (B) mutánsban. A tirozint tartalmazó mutáns esetében (A) a flavin megszokott TRIR spektruma látható a tirozint tartalmazó mutáns esetében (B) a spektrumban addicionális csúcsok jelennek meg az 1450-1530  $\text{cm}^{-1}$  tartományban

A C51A mutáns esetében az elsődleges elektron donor a 343-as pozícióban található tirozint; a két mutáns spektrumai között a különbség látványos. A tirozint nem tartalmazó mutáns esetében a transziens abszorpciós spektrumok leginkább az oxidált FMN spektrumához hasonlóak: a spektrumban az ismert domináns módusok, 1640  $\text{cm}^{-1}$  és 1705  $\text{cm}^{-1}$  valamint a gerjesztett állapot módusai figyelhetők meg 1380  $\text{cm}^{-1}$  és 1420  $\text{cm}^{-1}$ -nél. A tirozint tartalmazó mutáns esetében a spektrum jóval komplexebb és látványos különbségek figyelhetők mindkét frekvenciatartományban. Az 1547  $\text{cm}^{-1}$ -nél megfigyelt kinetikából jól látszik (3.8 D ábra), hogy amikor a tirozint jelen van, az alapállapotba való visszatérés sokkal gyorsabb, mint abban az esetben, ha a tirozint nincs jelen; ez támasztja alá azt a feltevésünket, hogy a tirozint valóban az elsődleges elektron donor a TrmF0 esetében.

A 800 fs-nál felvett differencia spektrumok esetében a legmarkánsabb különbség az 1480-1500  $\text{cm}^{-1}$ , valamint az 1510-1530  $\text{cm}^{-1}$  tartományban megjelenő transziensek esetében figyelhető meg. Annak érdekében, hogy ezeknek a transzienseknek az eredetét azonosítsuk több fajta elemzést végeztünk el: a C51A mutánsban 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  $\text{cm}^{-1}$  és az 1510-1530  $\text{cm}^{-1}$  tartományban található kiszélesedett tranziens csúcsokat és kiderült, hogy ezek több tranziens kombinációjából származnak (lásd **3.8 B** ábra). Az 1500  $\text{cm}^{-1}$  felett megjelenő két csúcs, az 1515  $\text{cm}^{-1}$  és az 1528  $\text{cm}^{-1}$  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 ( $\text{FADH}^{\bullet}$ ) kialakulása.

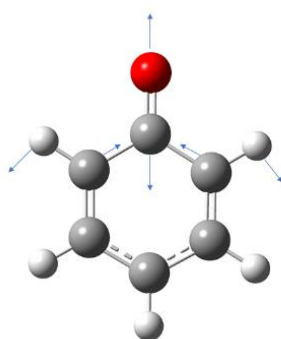


**3.8. ábra** A) A C51A és a C51AY343F TrmD mutáns TRIR spektruma 800 fs-os késleltetésnél B) A C51A mutáns esetében a globális illesztés által számított EAS spektrumok. Az 1 ps és 3 ps-hoz tartozó spektrumok esetében markánsan szétváltnak az 1515  $\text{cm}^{-1}$  és az 1528  $\text{cm}^{-1}$  flavin csúcsok, ami az anionos és a semleges flavin gyök szekvenciális megvalósulását mutatja C) A C51A mutáns esetében megfigyelt egyedi kinetikák 1515 és 1528  $\text{cm}^{-1}$ -nél. Az 1515  $\text{cm}^{-1}$ -nél megfigyelt csúcs a gerjesztéssel egy időben indul, az 1528  $\text{cm}^{-1}$  csúcs viszont ehhez képest pár pikoszekundummal később alakul ki. D) A C51A és C51AY343F mutáns esetében megfigyelt egyedi kinetikák 1547  $\text{cm}^{-1}$ -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  $1528\text{ cm}^{-1}$ -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  $800\text{ fs}$ -nál megfigyelt széles tranziens. A látható tranziens abszorpciós méréseknél megfigyelt szekvenciát figyelembe véve az  $1483\text{ cm}^{-1}$  tranziens felel meg a tirozin kation gyöknek. A gerjesztést követően ugyanis a  $\text{FAD}^* \rightarrow \text{FAD}^{\bullet-} - \text{TyrOH}^+$  gyökpár jön létre.

A  $\text{FADH}^{\bullet}$  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 megfigyelni<sup>56</sup>, ez ugyanakkor jól rávilágít az infravörös tranziens abszorpciós egyben a vibrációs spektroszkópia előnyeire.



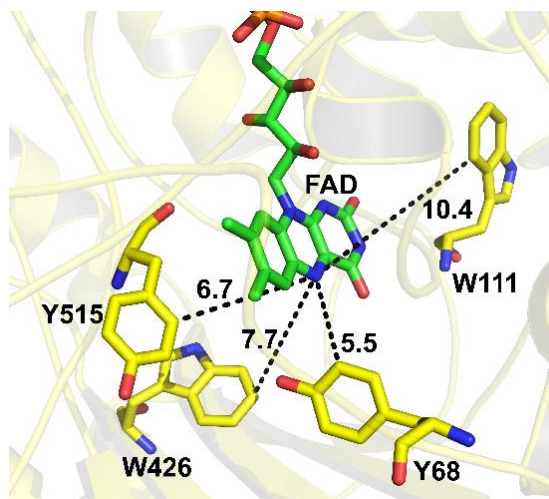
**3.9 ábra** Semleges tirozin gyök  $\nu_{7a}$  vibrációs módusa  $1502\text{ cm}^{-1}$ -nél

A globális illesztés segítségével egyúttal sikerült megállapítani a semleges tirozin gyök vibrációs módusát is, amely ebben az esetben  $1502\text{ cm}^{-1}$ . Ez a módus melleleg megfelel az irodalomban található értékeknek: DFT számítások alapján a fenoxil gyök valamint a semleges tirozin gyök esetében a fenil gyűrű  $\nu_{7a}$  (CO) nyújtó módusának (lásd **3.9 ábra**) frekvenciája  $1505\text{ cm}^{-1}$  illetve

1510  $\text{cm}^{-1}$ <sup>57,58</sup>. *Bacillus cereus*ból való ribonukleotid reduktáz esetében a semleges tirozin gyök Raman spektroszkópiával mért frekvenciája szintén 1502  $\text{cm}^{-1}$ , *Synechocystis* sp. PCC6803 fotorendszer II esetében a Tyr<sub>D</sub><sup>•</sup> illetve Tyr<sub>Z</sub><sup>•</sup> FTIR-rel mért frekvenciája 1503  $\text{cm}^{-1}$  és 1512  $\text{cm}^{-1}$  volt<sup>59</sup>.

### 3.4 Tirozin és triptofán gyökök azonosítása glükóz oxidázban

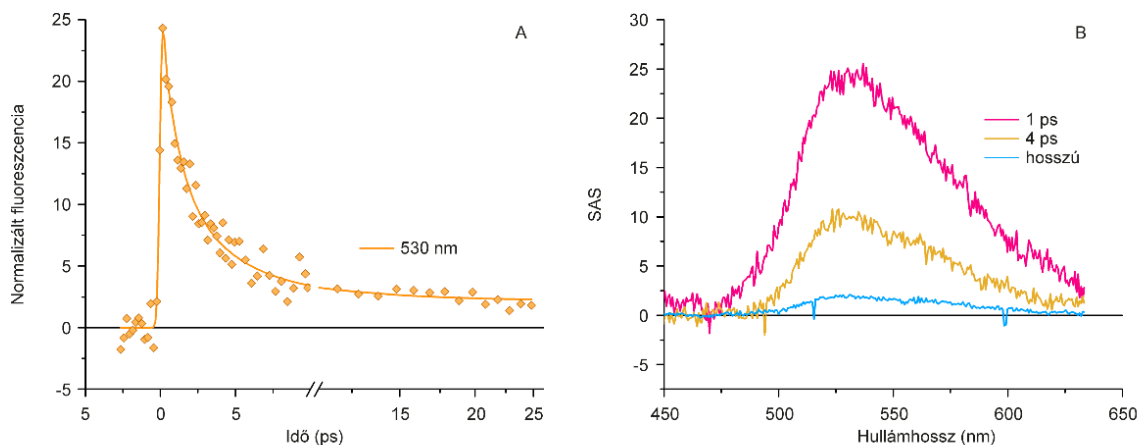
A tirozin kation gyök Trmfo-ban való azonosítását követően Marten Vosszal újra nekiláttunk a glükóz oxidáz fotokémiájának a leírásához és megvizsgáltuk korábbi méréseinket az új eredmények tükrében. Korábbi munkámban a spektrális illesztés során a mért DAS komponenseket a FAD anionos gyök valamint a triptofán kation gyök spektrumainak lineáris kombinációjával közelítettem<sup>40</sup>. 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.



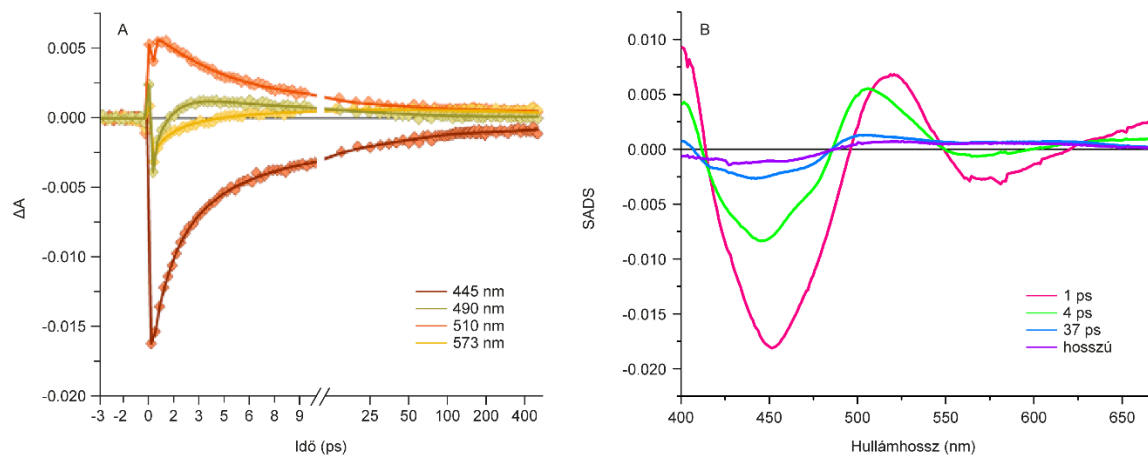
**3.10. ábra** Glükóz oxidáz szerkezeete, amelyen a FAD-ot és a kromofór körüli potenciális elektron donorokat tüntettük fel. A távolságokat megfigyelve az elsődleges elektron donor jelölt az Y68 tirozin volt.

Először Kerr-kapuzott tranziens fluoreszcencia spektroszkópiai méréseket végeztünk, amelyekből jól látszott, hogy a FAD gerjesztett állapota a hatékony elektron transzfernek

köszönhetően nagyon gyorsan relaxálódik. 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.



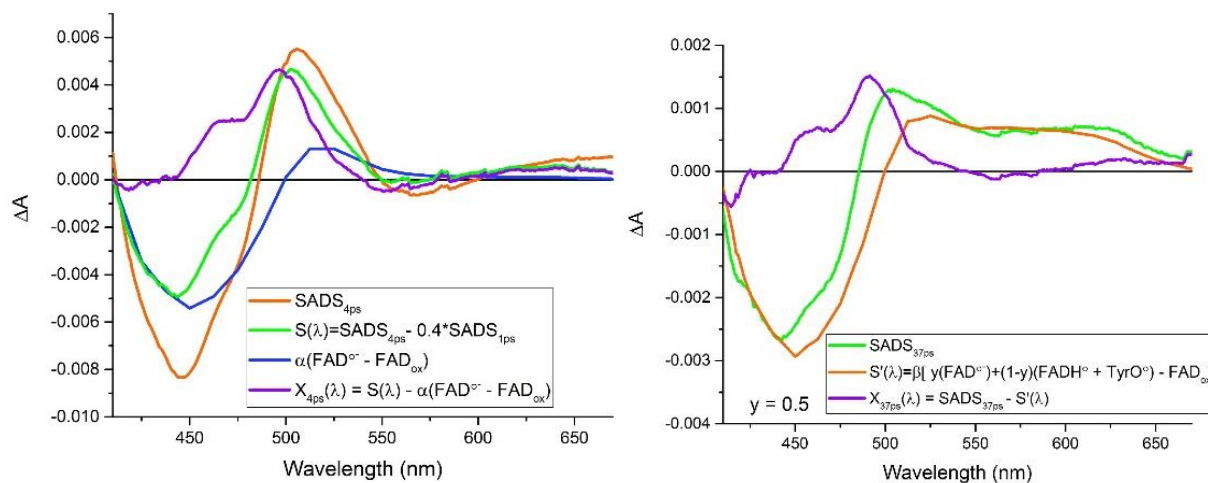
**3.11. ábra** Tranziens fluoreszcencia mérések glükóz oxidázon. Bal oldalon az 530 nm-nél megfigyelt fluoreszcencia relaxációja látszik, jobb oldalon pedig a globális illesztés által meghatározott spektrumokat és időállandókat. (Nag, Lukacs, Vos; *ChemPhysChem*, 2019)



**3.12. 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.



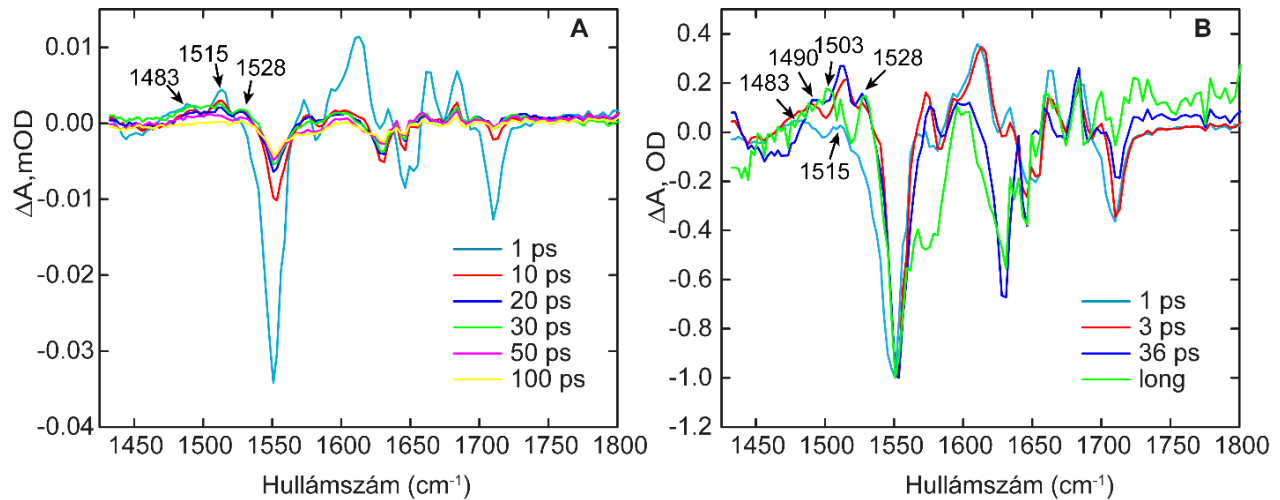
A tranziens abszorpciós adatokon végzett globális illesztés hasonló eredményre vezetett, a rövid 1 ps és 4 ps-os időállandók mellett azonban megjelent egy 37 ps-os komponens, amely nem „látszott” a fluoreszcencia mérésekben (**3.12 ábra**). Az 1 ps-hoz tartozó spektrum egyértelműen a gerjesztett állapot és az oxidált állapot differencia spektrumának ( $FAD^* - FAD_{ox}$ ) 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 mérésekből 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  $FADH^{\bullet}$  semleges gyök állapot, ez pedig úgy lehetséges, ha a tirozin deprotonálódik és létrejön a semleges tirozin gyök (**3.13 ábra**).



**3.13 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  $FADH^{\bullet}$  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 **3.14 A** ábrán a nyers mérési adatok láthatóak 1 és 100 ps között, a **B.** ábrán a globális illesztésből a különböző időállandókhöz tartozó EAS spektrumok láthatóak.

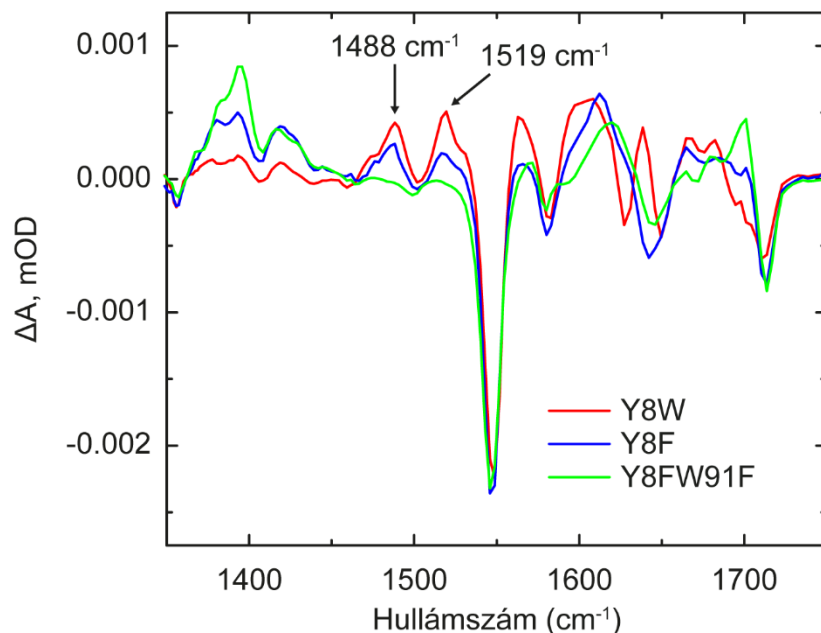


**3.14. ábra** A) Glükóz oxidáz TRIR spektrumai különböző késleltetések esetén. A spektrumokban látszanak a flavin, valamint a tirozin és flavin gyökök vibrációs módusai B) A globális illesztésből számolt időállandók és az ahhoz tartozó EAS spektrumok

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  $1483\text{ cm}^{-1}$  és  $1515\text{ cm}^{-1}$  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,  $1490\text{ cm}^{-1}$  és  $1528\text{ cm}^{-1}$ . Ez utóbbi egyértelműen a  $\text{FADH}^{\bullet}$  vibrációs markere. A vibrációs spektroszkópia szenzitivitását mutatja, hogy a tranziens abszorpciós mérések során csak későbbi időállandó esetén sikerült kimutatni a semleges gyök jelenlétét.

A  $1490\text{ cm}^{-1}$  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 kísérleteink során egyértelművé vált (**3.15 ábra**), hogy ez a csúcs valóban a

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



**3.15 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<sup>-1</sup> hullámszánál megfigyelhető tranziens abszorpciós csúcs az anionos flavin gyöknek felel meg, az 1488 cm<sup>-1</sup>-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  $\Phi_{19a}$  módusának és a C2-C3 nyújtó módusnak felel meg<sup>60,61</sup>. A közelmúltban végzett rezonáns Raman spektroszkópiai mérések azt állapították meg, hogy a triptofán W5<sup>+</sup> módusa vízben 1497 cm<sup>-1</sup>-nél jelenik meg, nehézvízben pedig 1488 cm<sup>-1</sup>-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 munkatársai<sup>62</sup> határozták meg azurinban. A mérés érdekessége, hogy ugyanazon a TRIR rendszeren (ULTRA, Rutherford Appleton Laboratory, Central Laser Facility) végezték, mint mi. Az általuk meghatározott két vibrációs marker 1278 cm<sup>-1</sup> és 1497 cm<sup>-1</sup>; 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 is.

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 <sup>•</sup>	1528-30	C-C (I), C4aN5 és C10aN1 nyújtó módusok
FAD <sup>•-</sup>	1515-1518	
TrpH <sup>•+</sup>	1488-1490	$\Phi_{19a}$ , C2-C3
TyrOH <sup>•+</sup>	1483	
TyrO <sup>•</sup>	1502-1512	$\nu_{7a}$ (CO) nyújtó módus

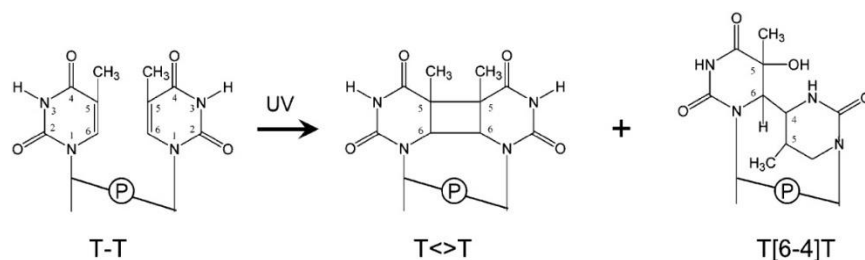
3.1 Táblázat Flavin, triptofán és tirozin gyökök esetében meghatározott vibrációs módusok

## 4. Fotoliázok funkcionális dinamikájának vizsgálata tranziens abszorpciós spektroszkópiával<sup>2</sup>

### 4.1 DNS károsodás UV-fény hatására, és a fotoliáz javítási mechanizmusa

A fotoaktív flavoproteinek között különleges helyet foglalnak el kriptokróm/fotoliáz fehérjecsaládba tartozó fehérjék, amelyek számos egzotikus funkciót képesek ellátni. A kriptokróm/fotoliáz fehérjecsalád egyetlen ismert tagja sokáig a fotoliáz volt, amelyről több mint ötven évvel ezelőtt fedezték fel, hogy kék fény hatására képes a DNS-ben létrejött hibák javítására. Claude S. Rupert és munkatársai *H. influenzae* törzsből kivont DNS-t világitottak meg UV fényvel, amelynek következtében a transzformációs hatásfok jelentősen csökkent<sup>63</sup>. Ezt követően, az UV által károsított DNS-hez sejtmentes *E. coli* kivonatot adtak, majd kék fényvel megvilágították. Ruperték azt vették észre, hogy megvilágítás nélkül az *E. coli* nem gyakorolt semmilyen hatást, kék fény hatására azonban a transzformációs hatásfok tízszeresére nőtt, amiből arra következtettek, hogy az *E. coli* tartalmaz egy fényvel aktivált enzimet, amelyet fényreaktíváló enzimnek, később pedig fotoliáznak neveztek el.

A DNS javítás mechanizmusát végül Aziz Sancar tisztázta, aki úttörő munkájáért 2015-ben Kémiai Nobel díjat kapott. Sancar és munkatársai igazolták, hogy UV fény hatására a DNS szálban károsító reakciók mennek végbe. Ezek közül a két legismertebb a ciklobután pirimidin dimer (Pyr<math>\diamond</math>Pyr) illetve a pirimidin-pirimidon(6-4) (Pyr[6-4]Pyr) kialakulása, amelynek során két egymást követő timin primidin gyűrűi kapcsolódnak egybe.



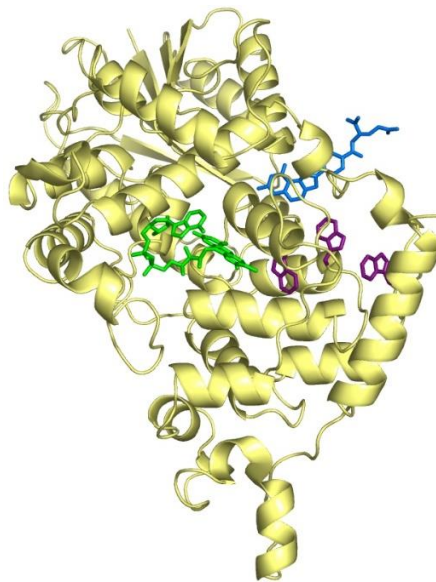
**4.1. ábra.** Az ábrán a pirimidin ciklobután illetve a pirimidin-pirimidon (6-4) fototermékek kialakulása látható. Hasonló fototermékek alakulhatnak ki bármilyen két egymást követő pirimidin gyűrű között: T-T, T-C, C-T és C-C esetében. (Forrás: A. Sancar, Chem Rev, 2003)

<sup>2</sup> Az ebben a fejezetben ismertetett eredmények a Lukacs et al., *JACS* (2008), Byrdin, Lukacs et al. *J. Phys. Chem. A* (2010), Müller et al. *Chemphyschem* (2016) cikkekben szerepelnek.

A javítási ciklus során a hibás DNS-hez specifikusan kapcsolódott fotoliáz kétszeresen redukált állapotban levő flavin kofaktora (FADH<sup>-</sup>) egy elektront injektál a pirimidin dimerre, aminek következtében a kötés felhasad. A fotoliázokat a javított terméktől függően ciklobután pirimidin dimer fotoliázok, a II-es típusú fotoliázok pedig a (6-4) fototermékek javítását végzik el. A fotoliázban azonban, az expresszálast és tisztítást követően a flavin a félig redukált állapotban van, aminek elsődleges jele a fehérje kékes színe. Klaus Brettel és Marten Vos kollégáim az ezredfordulón fedezték fel, hogy látható fény hatására a flavin teljesen redukálódik, még hozzá a javítási folyamatban megismerttől eltérő módon. Az FAD egy elektrontranszfer kaszkád segítségével redukálódik, amelyben az FAD-hez közeli három közeli triptofán vesz részt<sup>24</sup>. A folyamatot fotoaktivációnak nevezték el, amelyet közös munkánk során az elmúlt néhány évben sikerült részletesen jellemeznünk<sup>42,43,64,65</sup>.

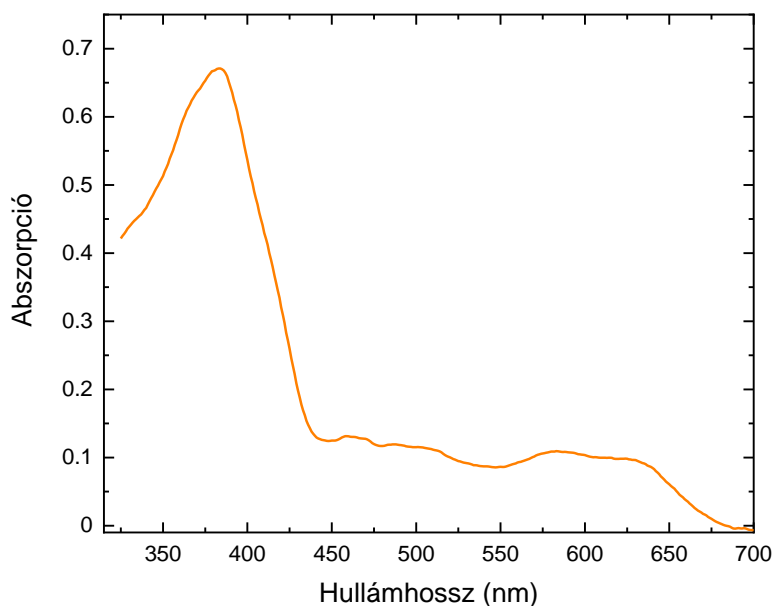
#### *A fotoliáz szerkezete*

A fotoliázok olyan 450-550 aminosavból álló globuláris, monomer fehérjék, amelyek két nemkovalensen kötött kofaktort tartalmaznak. Ezek közül az egyik az eddig ismert típusok mindegyikében a flavin adenin dinukleotid (FAD), a második pedig vagy egy pterin (MTHF), vagy egy deazaflavin (8-HDF) kromofór.



**4.2. ábra.** Az *E. coli* fotoliáz szerkezete. MTHF fotoantenna (kék), FAD kofaktor (piros), a fotoaktivációban fontos szerepet betöltő három triptofán (lila).

A katalízis az enzim-szubsztrát kötésre hatást nem gyakorló MTHF illetve 8-HDF kofaktorok nélkül is végbemegy<sup>66,67</sup>, jelenlétük azonban jelentősen (10-100-szoros mértékben) megnöveli a javítás sebességét<sup>26</sup>. Ez annak köszönhető, hogy az MTHF vagy 8-HDF kofaktorok extinkciós maximuma (400 nm körül) jelentősen nagyobb, mint az FADH<sup>-</sup> kofaktoré (**4.3. ábra**), az így abszorbeált energia pedig szintén eljut – fluoreszcencia rezonancia energiatranszferrel – a flavin kofaktorhoz<sup>66,68-70</sup>.

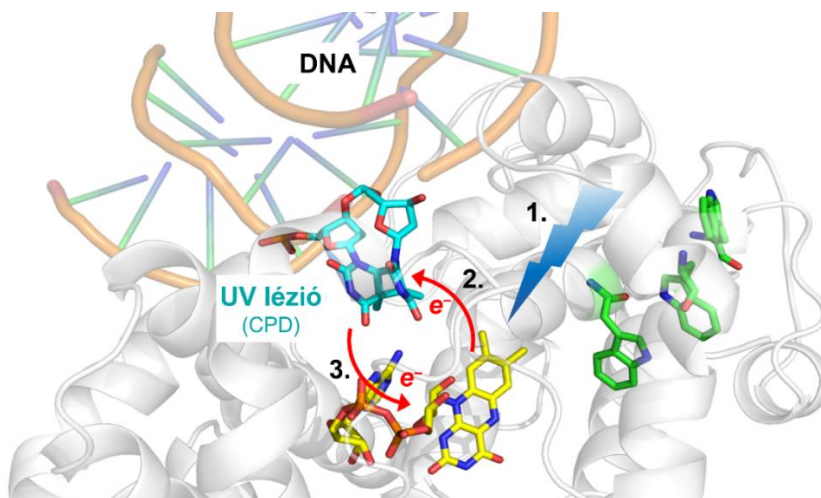


**4.3. ábra.** *E. coli* fotoliáz abszorpciós spektruma. A 380 nm körüli abszorpciós csúcs az MTHF, az 500, 580 és 625 nm-nél mért abszorpciós csúcsok a flavin kofaktor abszorpciójának feleltethetőek meg. Az abszorpciós spektrumon látható, hogy a FAD félig redukált állapotban van.

*Fotoreaktiváció illetve fotoaktiváció az E. coli fotoliázban*

A fotoliázban két fotoindukált elektrontranszfer folyamat megy végbe: a DNS javítást végző fotoreaktiváció (vagy fotojavítás) illetve a flavin kofaktort redukáló fotoaktiváció.

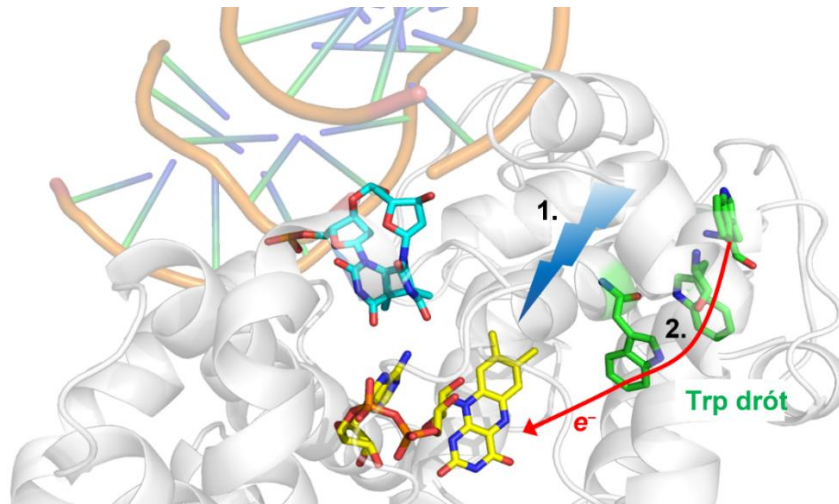
A fotoreaktiváció során egy közeli UV/látható foton által indukált folyamat zajlik le, amelynek során a ciklobután-pirimidin kötés felhasad. A reakció mechanizmusa a következő: a pirimidin dimerhez kötődött fotoliáz antennája (MTHF) elnyel egy UV/kék fotont, majd fluoreszcencia rezonancia energiatranszferrel gerjeszti a kétszeresen redukált állapotban található  $\text{FADH}^-$ -t (a flavin gerjesztése közvetlenül is megtörténhet). A gerjesztett állapotban levő  $\text{FADH}^-$ -ről  $\sim 170$  ps alatt egy elektron ugrik a  $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}$  gyűrűre<sup>71</sup>. Mivel a ciklobután 5-5 és 6-6 kötéseit ezt követően már sértik a Hückel-szabályt, ennek megfelelően a  $\text{Pyr} \rightleftharpoons \text{Pyr}$  felbomlik két pirimidinre. Ezt követően az elektron  $\sim 560$  ps alatt visszaugrik a félig redukált állapotban levő flavinra, amely ennek következtében újra a teljesen redukálódott ( $\text{FADH}^-$ ) állapotba kerül (lásd a 4.4. ábra).



**4.4. ábra.** A fotojavítás mechanizmusa. A gerjesztést követően a teljesen redukált flavinról egy elektron ugrik a ciklobután pirimidin dimerre, aminek a következtében a kötés felhasad. Ezt követően az elektron visszakerül a flavinra.

Egy kivétellel az összes eddig izolált fotoliázban igaz az, hogy a flavin kofaktor alapesetben az  $\text{FADH}^\bullet$  állapotban található meg. Ahhoz azonban, hogy a fotoreaktiváció végbemenjen, a flavin kofaktornak a kétszeresen redukált  $\text{FADH}^-$  állapotban kell lennie. Még nem világos, hogy a FAD

kofaktor természetes módon teljesen redukálódik-e *in vivo*, a  $\text{FADH}^\bullet$  azonban könnyen fotoredukálható a  $\text{FADH}^-$  állapotba egy "fotoaktiválásnak" nevezett folyamat során.<sup>24,72,73</sup>



**4.5. ábra.** Az izolált fotoliázokban a flavin kofaktor félig redukált állapotban található. A fotoaktiváció során a flavin kofaktor látható fényel való gerjesztést követően kétszeresen redukált állapotba kerül. A redukálás három közeli triptofánon keresztül valósul meg (forrás: Pavel Müller, személyes közlés)

Fény hatására a  $\text{FADH}^\bullet$ , amely nemcsak az UV, hanem az egész látható tartományban (majdnem 700 nm-ig) rendelkezik abszorpcióval, elvon egy elektront a közeli (lásd a 4.5 ábrát) W382 triptofánról  $\sim 30$  ps alatt.<sup>43,64</sup> Az elektronlyuk ezután  $<30$  ps alatt a fehérje felszíne felé vándorol a Trp-triádon keresztül (W382-től W359-ig és tovább W306-ig, itt  $W_A$ ,  $W_B$  és  $W_C$  néven), kialakítva a  $\text{FADH}^- \text{W}_C\text{H}^{\bullet+}$  párt<sup>16</sup>. Egy másik tanulmány szerint e gyökpár kialakulása  $\sim 100$  ps alatt következik be<sup>74</sup>. A gyökpár ezt követően a  $\text{W}_C\text{H}^{\bullet+}$  oldószert felé történő deprotonálódásával stabilizálódik  $\sim 200$  ns alatt (az oldószert viszkozitásától és egyéb paraméterektől függően)<sup>24</sup>. A keletkező  $\text{FADH}^\bullet\text{-W}_C\text{H}^\bullet$  gyök pár milliszekundumos időskálán rekombinálandó, de ha a semleges  $W_C$ - gyök külső redukálószerrel találkozik a  $\text{FADH}^\bullet$  stabilizálódik és újra elérhető a CPD-k fotojavításához.

Az elmúlt két évtized kísérleti eredményei arra utalnak, hogy a  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  fotoredukciója  $\text{FAD}^{\bullet-}/\text{FADH}^\bullet$ -ra a kriptokrómok aktiválásának kezdeti lépése is<sup>75-77</sup>. A  $\text{FAD}^{\bullet-}$  protonálása (az izoalloxazin gyűrű N5 atomjánál) a fény által indukált elektronátadást követően a fehérjétől és az előnyben részesített fotoredukciós útvonaltól függően rendkívül eltérő időskálán valósulhat meg:  $<1$  ns<sup>78,79</sup> és több másodperc<sup>80</sup> között a növényi kriptokrómokban, több száz milliszekundum ( $\sim 200$



ms) alatt a 6-4 fotoliázban<sup>81</sup>, vagy egyáltalán nem, például a rovar kriptokrómokban<sup>76</sup>. Több publikáció alapján úgy tűnik, hogy a  $\text{FAD}^{\bullet-}$  protonálódás sebessége és a FAD izoalloxazin gyűrűjének N5 atomjával szemben elhelyezkedő aminosav jellege között közvetlen kapcsolat van. A növényi kriptokrómokban (**4.8 ábra**) ezen a helyen lévő aszparaginsav a jelek szerint néhány  $\mu\text{s}$  alatt közvetlenül protonálja a FAD-ot, vagy bizonyos körülmények között akár szub-ns időskálán belül. Ha az N5-re néző aminosav egy aszparagin (ami a fotoliáz/kriptokróm fehérjék többségében így van), a  $\text{FAD}^{\bullet-}$  még mindig protonálódhat, de a protonnak a fehérje egy távolabbi komponenséből vagy akár a külső közegből kell érkeznie, ami akár 5 nagyságrenddel lassítja az anionos flavin gyök protonálódását<sup>81</sup>. Nem világos, hogy az aszparagin milyen mértékben segíti vagy akadályozza a protonálódást. A rovar kriptokrómokban az adott pozícióban egy cisztein van, ami a jelek szerint teljesen blokkolja a protonálódást<sup>48,76</sup>.

#### 4.2 Fotoaktiváció triptofán nanodróton keresztül

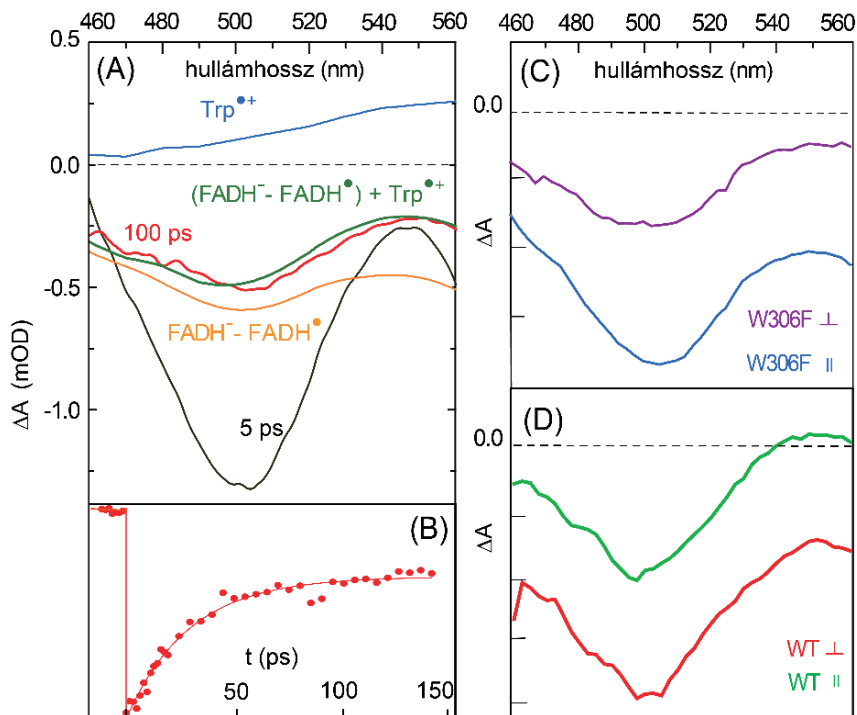
Korábbi spektroszkópai vizsgálatok kimutatták, hogy *E. coli* fotoliázban a  $\text{W}_{382}$  triptofán az elsődleges elektron donor<sup>82</sup>, amely azonban nem marad oxidált állapotban, mivel  $<4$  ps alatt redukálódik a  $\text{W}_{359}$  által<sup>83</sup>. Felmerül tehát az érdekes kérdés, hogy a töltés valóban 30 ps alatt átkerülhet-e a  $\text{W}_{306}$ -os triptofánra, ez ugyanis egy nagyon hatékony elektron transzfer folyamat és ebben az esetben a triptofán lánc egyfajta "drótnak" tekinthető. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a töltés melyik triptofánon helyezkedik el polarizált tranziens abszorpciós spektroszkópiát alkalmaztunk.

A  $\text{W}_{306}\text{F}$  mutáns fotoliázban a gerjesztést követő néhány pikoszekundum utáni tranziens spektrum (**4.5 ábra**) nagyon hasonló a vad típus, a  $\text{W}_{382}\text{F}$  illetve a  $\text{W}_{359}\text{F}$  mutánsok esetében megfigyelt spektrumokhoz<sup>82,84</sup>, és megfelel a gerjesztett  $\text{FADH}^{\bullet*}$  állapotnak. Ez az állapot mono-exponenciális módon 27 ps alatt relaxálódik, hasonlóan a vad típusban és a  $\text{W}_{359}\text{F}$  mutáns esetében megfigyeltékhez<sup>82,84,85</sup>. A vad típusú fehérje és a  $\text{W}_{359}\text{F}$  mutáns esetében is az elsődleges donor a  $\text{W}_{382}$  triptofán, ilyen módon a relaxáció sebességét a  $\text{FADH}^{\bullet*}\text{W}_{382} \rightarrow \text{FADH W}_{382}^{\bullet+}$  töltésszétválasztási reakció határozza meg. Az izotróp körülmények között végzett tranziens abszorpciós mérések esetén a  $\text{W}_{306}\text{F}$  mutánsban a 27-ps fázist követően megvalósuló aszimptotikus spektrum nagyon hasonló alakú (**4.5 ábra**), mint a vad típusban kapott spektrum és jól modellezhető a  $(\text{FADH}^- - \text{FADH}^{\bullet})$  és  $\text{W}^{\bullet+}$  spektrum összegeként (a semleges triptofán nem

abszorbeál a látható tartományban). Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy a kezdeti  $\text{FADH}^- \text{W}^{\bullet+}$  képződés sebessége és hozama független a W306 terminális elektrondonor jelenlététől. Mivel a  $\text{FADH}^- \text{W382}^{\bullet+}$  állapot instabil és néhány ps alatt rekombinálódik, a W306F mutáns fehérjében a hosszú életű állapotnak a  $\text{FADH}^- \text{W359}^{\bullet+}$ -nak kell lennie, így a  $\text{W382}^{\bullet+} \text{W359}$  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  $\Delta A_{\perp}$ -nak, a vízszintes polarizátor esetében mért abszorpcióváltozást nevezzük  $\Delta A_{\parallel}$ -nak. (Mivel a  $\text{FADH}^{\bullet}$  széles spektrumon nyeli el a fényt, gerjesztő fényként egy  $\sim 620$  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  $\Delta A_{\parallel}$  és  $\Delta A_{\perp}$  spektrumok viszont nem (4.6 B ábra), ami arra utal, hogy különböző triptofán gyökökről van szó.



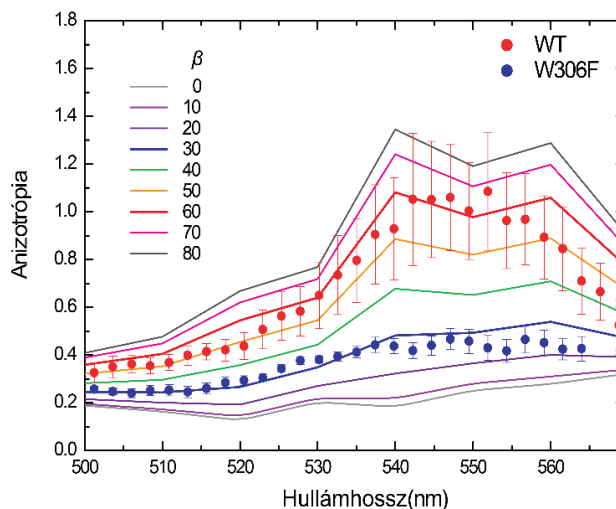
**4.6. ábra.** A) A W306 mutáns esetében a gerjesztést követő 5ps illetve 100 ps késleltetésnél mért transziens spektrum. A narancs és a kék a modell spektrumok, a zöld a spektrális illesztésből kapott spektrum, amely jó átfedést mutat a mért spektrummal. B) Az 500 nm esetében megfigyelt kinetika, időállandó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

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

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

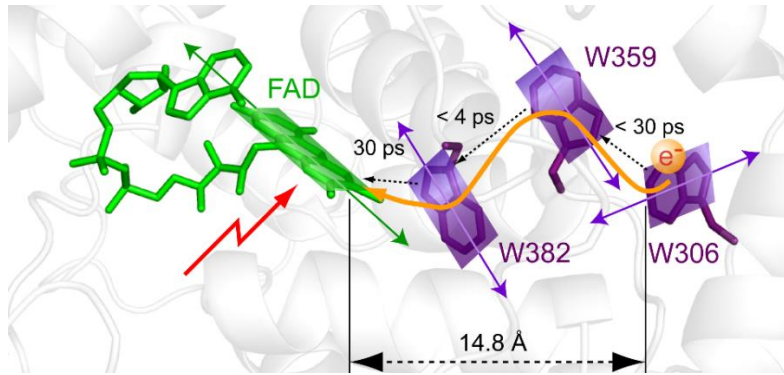
Az anizotrópia ismeretében azonban kiszámolható a tranzíciós dipólusok által bezárt szög az

alábbi képletnek megfelelően<sup>16,83</sup>:  $r = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{5}$



**4.6 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  $50\text{-}70^\circ$  a vad típusú minta esetében,  $20\text{-}30^\circ$  a W306F mutáns esetében

A szög meghatározásához fordított eljárást alkalmaztunk és először a különböző szögekhez tartozó elméleti értékek lettek meghatározva<sup>86</sup>, majd ezt vetettük össze a kapott anizotrópia értékekkel. Ennek megfelelően a vad típusú fehérje esetében kapott szög  $\beta = 50\text{-}70^\circ$  volt, míg a W306F mutáns esetében ez  $\beta = 25\text{-}30^\circ$ -nak adódott. A kapott értékek a szerkezetből számolt értékekkel: a W306-os triptofán  $79^\circ$ -os a W359-es triptofán pedig  $35^\circ$ -os szöget zár be a FAD tranzíciós dipólusával. Összességében adataink egyértelműen bizonyítják, hogy a vad típusú fotoliázban a  $\sim 30$  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 meg<sup>84</sup>, a  $\text{W306}^{\bullet+} \rightarrow \text{W359}^{\bullet+}$  transzfer pedig  $< 30$  ps alatt történik, ami a teljes reakció időskálája (lásd **4.7 ábra**).



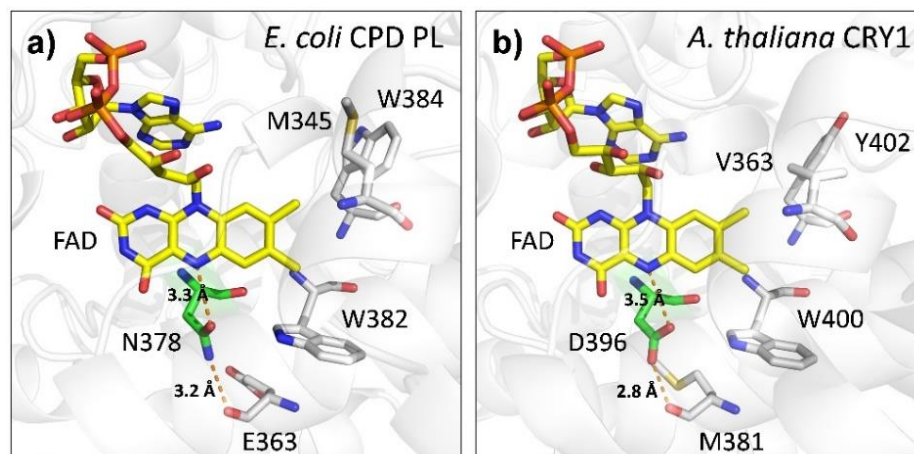
4.7 ábra A triptofán „nanodróton” keresztül megvalósuló elektron transzfer folyamat

### 4.3 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. A kriptokrómoknak ugyanis van egy fotoliáz homológ régiója (PHR), amely a nevének megfelelően jelentősen átfed a fotoliázok szerkezetével és ebben a szakaszban megtalálható az előző fejezetben bemutatott triptofán hármas. A homológia ellenére van egy szembeötlő különbség: az expressziót követően a fotoliázok majdnem mindegyikében a FAD félig redukált állapotban van, ennek megfelelően a fehérje kékes színű, a növényi és rovar kriptokrómok esetében FAD oxidált állapotban van, az expressziót követően a fehérje citromsárga. Funkcióját tekintve a fotoliázok a DNS szál javításában vesznek részt, a különböző kriptokrómok funkciói ezzel szemben sokkal heterogénebbek, a növények növekedésében, rovarok cirkadián ritmusában, valamint a Föld mágneses terében való tájékozódásban játszanak fontos szerepet<sup>87</sup>. A 2000-es évek végétől kezdett el foglalkoztatni, hogy a homológia ellenére miért teljesen más a két fehérjecsalád funkciója. A redox állapotban megjelenő nyilvánvaló különbség miatt először arra gondoltam, hogy ez a meghatározó a funkcióban, de a kísérleteink végül teljesen más irányba mutattak.

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 létrejöttében az N5-höz közeli aszpartát/ aszparagin a felelős. Ennek alapján felmerült, hogy a fotoliázban cseréljük ki az aszparagint egy aszpratátra – amitől azt vártuk, hogy a fehérje kriptokróm-szerű lesz – és

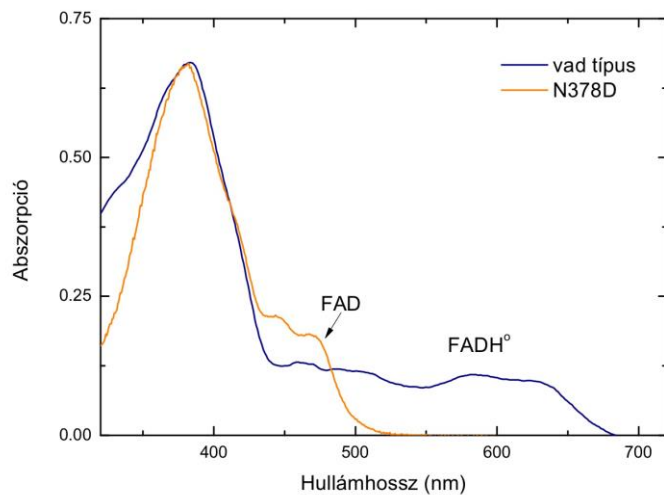
vizsgáljuk meg, hogy ez milyen hatással van a fotociklusra. Érdekes módon az ellentétes mutáció következtében – *A. thaliana* kriptokrómban az aszpartátot aszparaginre cserélték – a kriptokróm képes lett a DNS szál javítására<sup>88</sup>.



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

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.

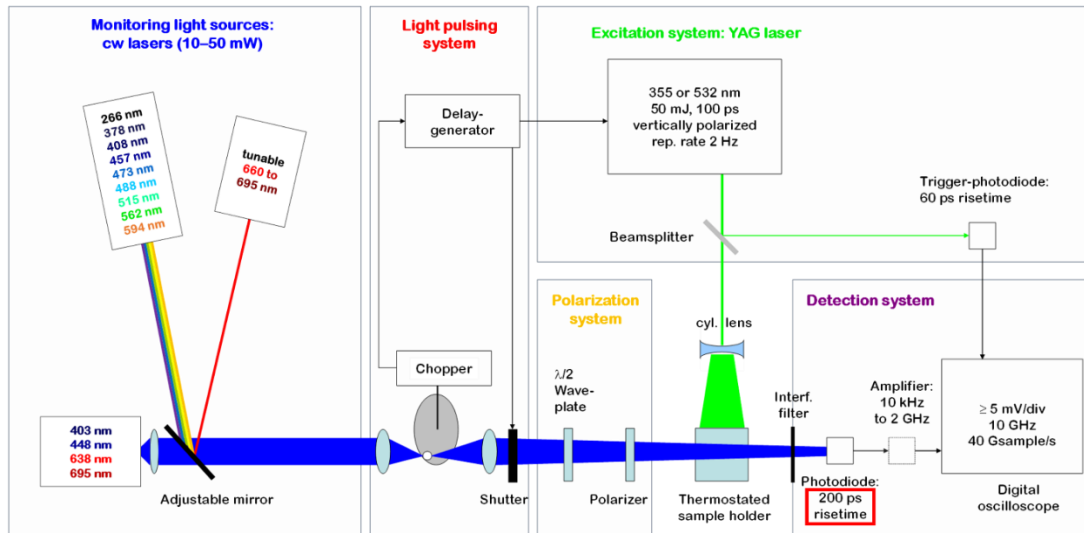
A **4.9 ábrán** a vad típusú, valamint az N378D fotoliáz mutáns abszorpciós spektruma látható: a vad típusú fotoliáz esetében megfigyelhető a jellegzetes plató, amely 500-700 nm között van jelen. A vad típusú fehérje és az N378D mutáns spektrumait összehasonlítva rögtön szembetűnő, hogy a mutáns esetében hiányzik ez a rész. A két fehérje közötti különbség ránézésre is látványos: vad típusú esetben a fehérje a félig redukált FAD-nak köszönhetően kékes színű, az N378D mutáns esetében a FAD oxidált állapotba kerül, aminek következtében a fehérje citromsárga színű lesz. A vad típusú fehérje és a mutáns esetében is 380 nm környékén megfigyelhető abszorpciós csúcs az MTHF antennától származik. Mivel azokban az esetekben, amikor a lézer hullámhossza 390 nm körül volt a gerjesztő impulzus egyaránt gerjesztette volna a FAD-ot és az MTHF antennát is, ennek elkerülése érdekében elkészítettük az E109A mutánsokat, amelynek következtében az expresszió során az antenna „leesik” és a fehérje nem köti többé.



**4.9 ábra** A bal oldalon a vad típusú fotoliáz spektruma látható, valamint az N378D spektruma. A spektrumból jól látható, hogy a vad típus esetében a flavin a semleges gyök állapotban van, míg a mutáció következtében oxidált állapotba került. A jobb oldalon látható, hogy a semleges flavin gyök kékes színű, míg az oxidált FAD citromságra.

#### *Mikro és milliszekundumos tranziens abszorpciós mérések vad típusú fotoliázon*

A fotociklusban bekövetkező különbségek feltárása érdekében tranziens abszorpciós méréseket végeztünk a nanoszekundumos-mikroszekundumos tartományban Klaus Brettel rendszerén (CEA Saclay); az ehhez használt berendezés elvi rajza a **4.10 ábrán** látható. Ez a berendezés részben eltér a metodikai részben ismertetett – általam épített és fejlesztett – tranziens abszorpciós rendszerektől. Az alapvető különbség az, hogy egy próba nyaláb csak egy hullámhosszon világítja át a mintát, vagyis nem egy széles spektrumban, mint a fehér fény esetében; a detektor ebben az esetben egy fotodióda és nem CCD. A mérés során a gerjesztő impulzus egy Nd-YAG lézer harmadik felharmónikusa vagyis 355 nm a próbanyaláb pedig a tíz CW lézer valamelyike, amellyel a késleltető egység (Delay Generator) által meghatározott időpillanatban világítjuk át a mintát. A méréseket több hullámhosszon is elvégeztük, az egyes hullámhosszokon mért intenzitás pontokat interpolálva kaptuk meg a spektrumokat.



4.10 ábra Klaus Brettel tranziens abszorpciós rendszere (forrás: Pavel Müller, személyes közlés)

Annak érdekében, hogy kiderítsük a fotociklust (és egyben a funkciót) a FAD redox állapota határozza-e meg, a méréseket olyan vad típusú fotoliázon is elvégeztük, amelyek esetében a FAD szintén oxidált redox állapotban volt. Ehhez a fehérjét négy órán keresztül 0.5 mM imidazolt tartalmazó pufferben inkubáltuk, majd sócseserlő oszloppal eltávolítottuk az imidazolt.

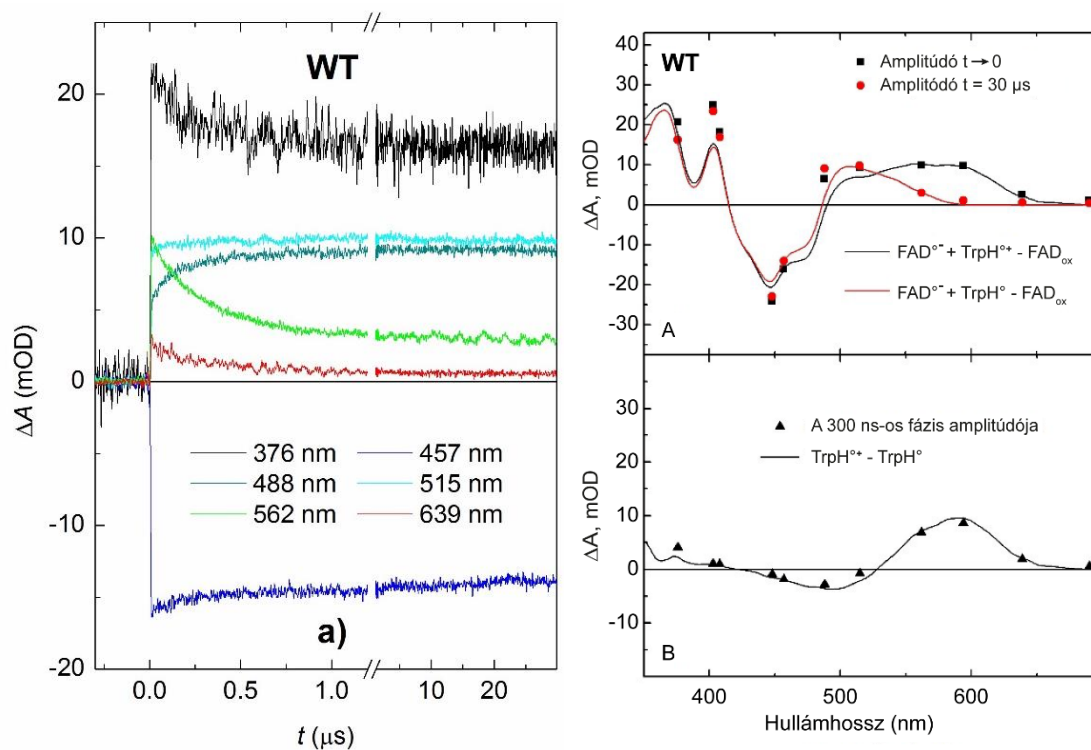
Ezt követően tranziens abszorpciós méréseket végeztünk vad típusú oxidált fotoliázon a ns-tól a több tíz másodpercig terjedő időskálán. Az utolsó triptofán kation gyök ( $W_C H^{\bullet+}$ ) deprotonálódása  $\sim 300$  ns alatt valósult meg, a töltés rekombinációja az így kialakult  $FAD^{\bullet-}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

A 4.11 ábra hat jellemző hullámhosszon ns- és  $\mu$ s-idős skálán mutatja be a vad típusú fehérje esetében megfigyelt tranziens abszorpciós kinetikát. Az egyes hullámhosszokon megfigyelt kinetikák amplitúdójából rekonstruáltuk a spektrumot. A  $t=0$  időpillanatra számolt spektrum a  $FAD^{\bullet-}$ -TrpH $^{\bullet+}$  gyökpár differenciaspektrumának felel meg összhangban a kriptokrómokban megfigyeltekhez. A növényi kriptokrómokban a glükóz oxidázban bemutatottakhoz hasonlóan először az anionos gyök alakul, ezt követően kerül sor a flavin gyök protonálódására és jön létre a félig redukált FAD.

Az N378D mutánsban a  $FAD^{\bullet-} W_C H^{\bullet+}$  pár kialakulásának kvantumhatásfoka  $\sim 65\%$ . A kezdeti – ugrásszerű – abszorpciós változásokat több hullámhosszon egy  $\sim 300$  ns élettartamú kinetikus fázis

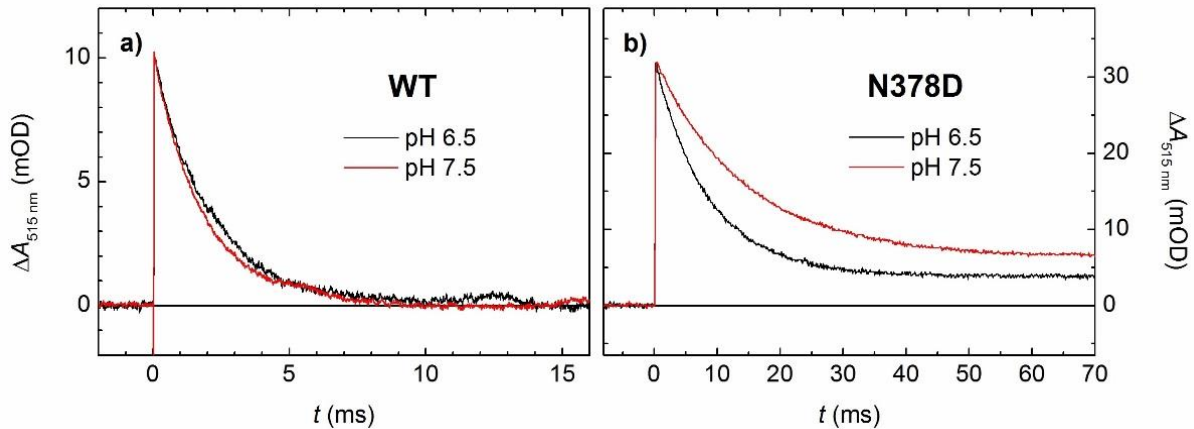


követte (a globális illesztése szerint 315 ns). A vad típusú fehérjén végzett mérések esetén az 562 nm-en megfigyelt relaxáció és a 488 nm-en mért növekedés volt a leglátványosabb. Ez megfelel annak a korábbi mérésekből fakadó elvárásnak, hogy a triptofán kation gyök  $\sim 200\text{-}300$  ns alatt deprotonálódik<sup>24</sup>. Az 562 nm-en megfigyelt relaxáció a triptofán kation gyök deprotonálódására, a 488 nm-es csúcs növekedése pedig a semleges triptofán gyök megjelenésére utal (lásd **3.3-as** ábra).



**4.11 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 spektruma a  $\text{FAD}^{\bullet-} \text{W}^{\bullet}$  gyökpár spektrumának felel meg (a 4.11 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  $10 \mu\text{s}$ -os időfelbontással mértük közel 15 s-ig. Az 515 nm-en megfigyelt időállandó  $\tau = 1,9$  ms volt, ezt a  $\text{FAD}^{\bullet-} \text{W}_\text{C}^{\bullet}$  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  $\text{FADH}^{\bullet} \text{W}_\text{C}^{\bullet}$  pár, amely a pH csökkenésével jelentősen felgyorsul<sup>89</sup>.

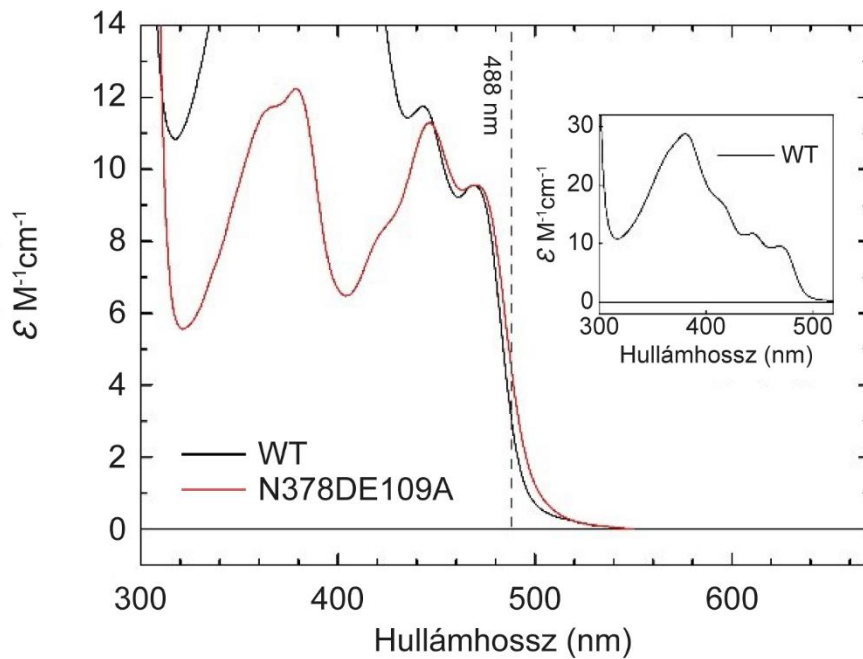


**4.12 ábra** A bal oldalon a vad típusú fotoliázban megfigyelt töltés rekombináció, a jobb oldalon ugyanezen a hullámhosszon megfigyelt rekombináció csak az N378D mutáns esetében.

#### *Mikro és milliszekundumos tranziens abszorpciós mérések az N378D mutáns*

Az aszpargin-aszpártát csere hatásának megfigyelése érdekében hasonló tranziens abszorpciós kísérleteket az N378DE109A mutáns. Az E109A mutáció következtében a fehérje elvesztette az MTHF antennáját, ezáltal is hasonlóbba vált a kriptokrómokhoz, mivel 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<sup>90,91</sup>). 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 (S0 → S1) abszorpciós sávjai ~3 nm-rel vörös felé tolódnak a WT-hez képest (4.12 ábra). Ez az eltolódás jelentős hatással van a 488 nm-en rögzített tranziens abszorpciós adatokra (lásd alább).

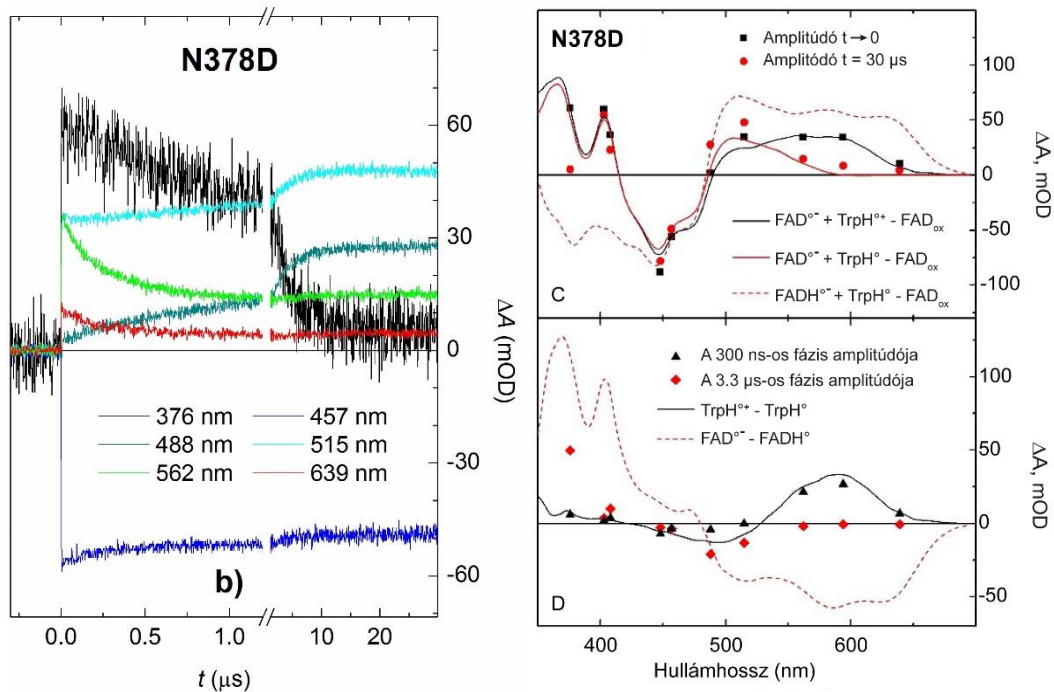


**4.13 ábra** A vad típusú (oxidált) és az N378DE109A fotoliáz abszorpciós spektruma. A pirossal jelzett spektrumon jól látható, hogy a mutáció következtében a fehérje elvesztette a ~ 380 nm abszorpciós csúccsal rendelkező MTHF antennát.

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 4.13 ábrát).

Az N378D mutáns esetében megfigyelt további kinetikák azonban jelentősen eltértek a vad típusban mérttől. A különbség legjobban 376 nm-nél tűnt ki a legjobban: míg a vad típusú fehérje esetében 1  $\mu\text{s}$  felett ezen a hullámhosszon a 30  $\mu\text{s}$ -os időablakon belül csak minimális változás volt megfigyelhető, a mutáns esetében ezen az időtartományon az abszorpcióváltozás – 3.3  $\mu\text{s}$ -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  $\mu\text{s}$ -mal a gerjesztést követően kerül sor. Az N378D mutáns

esetében az anionos FAD gyök 3.3  $\mu\text{s}$  időállandóval relaxálódott, mindeközben azonban nem volt abszorpcióváltozás megfigyelhető az 500-700 nm-es tartományon, ami a semleges FAD gyök megjelenését jelezte volna (lásd 3.3 ábra). Az egyes hullámhosszakon megfigyelt lecsengések amplitúdójából megszerkesztett spektrumot megfigyelve a 30  $\mu\text{s}$ -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 4.13 ábrán), de ez jelentősen eltért a megfigyelt spektrumtól.



**4.13 ábra** Az N378D esetében megfigyelt kinetikai görbék. A jobb oldalon (felül) a spektrális illesztés a gerjesztést követő  $t=0$  illetve 30  $\mu\text{s}$  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  $\mu\text{s}$ -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 (4.12 a. ábra), 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:

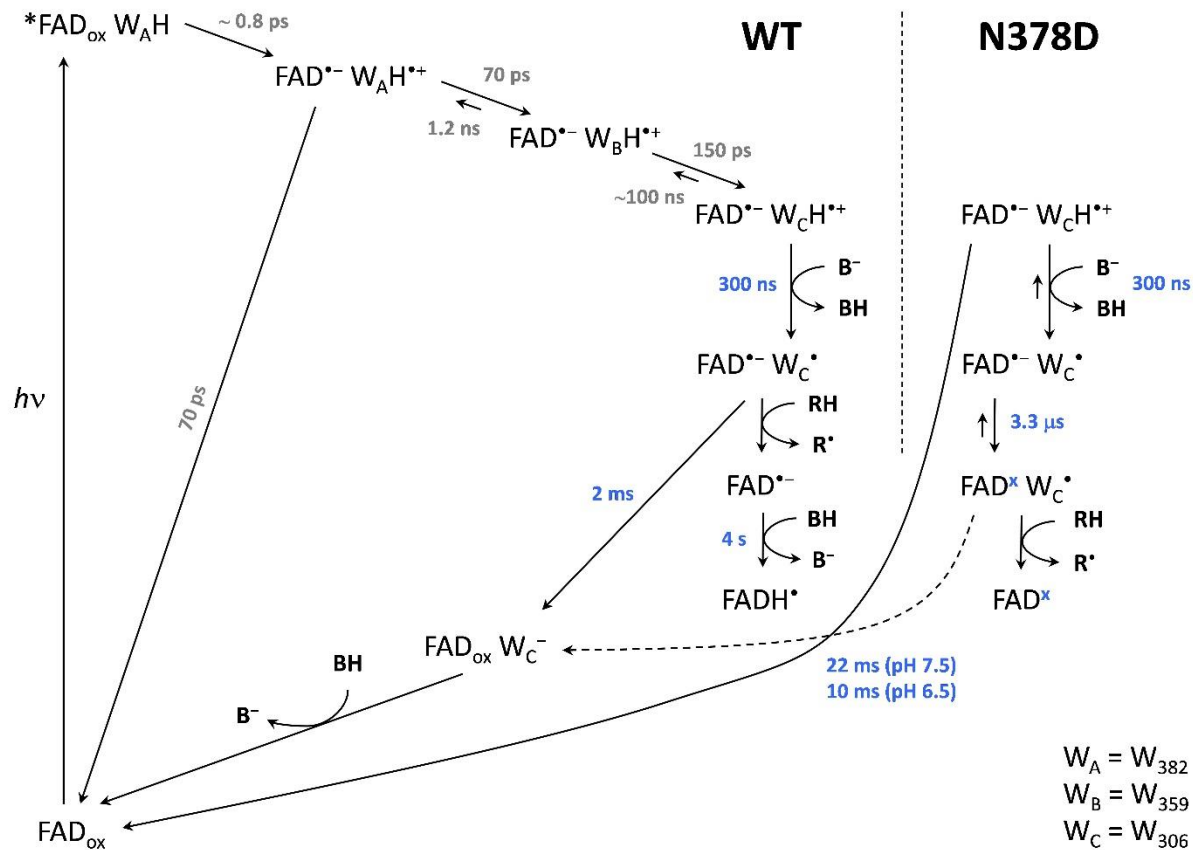
1. Az N378D mutánsban a terminális  $\text{FAD}^{\bullet-}$   $\text{W}_\text{C}\text{H}^{\bullet+}$  gyökpár képződésének kvantumhatásfoka valamivel alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad típusú fehérjében (50% vs. 65%), de még mindig sokkal magasabb, mint az *Arabidopsis thaliana*-ból származó növényi kriptokróm – AtCRY1 – (20% a legjobb ismert kísérleti körülmények között<sup>79</sup>). 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)<sup>92</sup>.

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 kriptokróm a  $\text{FAD}^{\bullet-}$  ~1,5  $\mu\text{s}$  alatt protonálódik<sup>48</sup>, 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  $\mu\text{s}$ ) rendelkező kinetikai fázist, de annak spektrális jellemzői nagyban eltértek a  $\text{FAD}^{\bullet-}$  protonálódásától vártaktól, mivel nem volt megfigyelhető a  $\text{FADH}^{\bullet}$  gyök létrejötte. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az N378D mutáns EcPL 3,3  $\mu\text{s}$ -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  $\text{FAD}_\text{X}$ -nek neveztünk el.

4. Az N378D mutáns EcPL-ben a nem tipikus  $\text{FAD}_\text{X}$  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 **4.14** ábrán összegeztük.



**4.14 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  $\mu$ s alatt, majd 22 ms (pH 7.5) alatt rekombinálódik.

A 4.14-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.

## 5. BLUF domén fehérjék vizsgálata ultragyors spektroszkópiával

### 5.1 AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata tranziens abszorpció, valamint fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel<sup>3</sup>

Egészen a közelmúltig a fotoaktív flavoproteineknek három nagy osztálya volt ismert: LOV (Light Oxygen Voltage) domén fehérjék, BLUF (Blue light sensing using FAD) domén fehérjék, valamint a kriptokróm/fotoliáz fehérje család. Egy negyedik típusú fotoaktív flavoproteint, a zsírsav fotodekarboxilázt nemrégiben azonosították francia kollégáim, Klaus Brettel, Pavel Müller és Marten Vos<sup>93</sup>.

Az összes esetben a fehérje egy flavint köt, vagy flavin adenin dinukleotid (FAD) vagy flavin mononukleotid (FMN) formában, amelyek oxidált állapotban 360 nm és 450 nm körül van abszorpció csúcsuk; az előbbi az  $S_0 \rightarrow S_2$ , az utóbbi pedig az  $S_0 \rightarrow S_1$  átmenetnek felel meg.

A fotoaktív flavoproteinek fotokémiája mindegyik család esetében más mechanizmus szerint történik, bár vannak hasonlóságok. Az LOV domén esetében a gerjesztést követően, az FMN tripllett állapotba kerül és egy metastabil adduktot alkot egy közeli ciszteinnel<sup>18,94,95</sup>, ez indukálja a fehérje szerkezetében megvalósuló strukturális változásokat<sup>95</sup>. Ahogyan az előző fejezetben tárgyaltam, kriptokrómok és a fotoliázok esetében a FAD esetében a gerjesztett flavin egy konzervált triptofán hármason keresztül redukálódik. A kriptokrómok esetében a folyamat végén a flavin anionos vagy félig redukált gyök állapota stabilizálódik<sup>48,96</sup>, a fotoliáz esetében – mivel a kiinduló állapot eleve a félig redukált gyök állapot – ezért az elektron transzfer következtében rövid ideig a teljesen redukált állapot valósul meg.

A BLUF domén fehérjék esetében a mechanizmus teljesen eltérő: a sötét állapotból a világos állapotba való átmenet során egy mindössze 10-15 nm-es eltolódás figyelhető meg a flavin 450 nm körüli abszorpció maximumában. Ez arra utal, hogy az abszorpciót követően a flavin hidrogénkötés-rendszerében történik változás. A BLUF-domén fehérjék esetében tehát az elsődleges változás a flavin körüli hidrogénkötésekben valósul meg, ezt követik a fehérje C-

<sup>3</sup> Az alfejezet a következő cikkekben megjelent kutatásokat foglalja össze: Haigney, Lukacs et al. *Biochemistry* (2011), Lukacs et al., *JACS* (2011), Haigney et al., *J. Phys. Chem. B.* (2012), Brust et al., *JACS* (2013), Lukacs et al. *JACS* (2014), Karadi et al, *Scientific Reports* (2019), A. Lukacs, P.J. Tonge, S. R. Meech *Acc. Chem. Res.* (2022)

terminálisánál megvalósuló nagyobb strukturális változások. A BLUF domén fehérjéken végzett kutatásaink fő kérdése az volt (és jelen pillanatban is az), hogy a flavin körüli hidrogénkötés-rendszer gyors átrendeződése hogyan terjed a fehérjében és hogyan járul hozzá a fehérje funkciójának megvalósulásához.

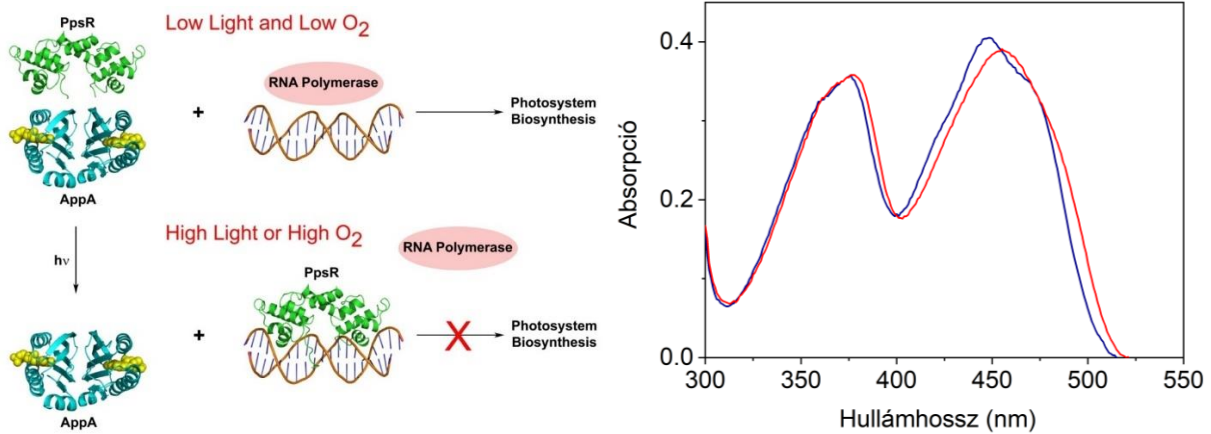
A BLUF domén fehérjék számos organizmusban léteznek, a szekvenált baktériumok 10 százaléka rendelkezik BLUF doménnel, de csak kevés esetben ismert a funkciójuk<sup>8</sup>.

A BLUF domének felfedezésére 2002-ben került sor, amikor rögtön két organizmusban, az *Euglena gracilis* nevű egysejtű ostorosban illetve *Rhodobacter sphaeroides* nevű fotoszintetikus baktériumban azonosították ezeket a flavint tartalmazó fotoaktív fehérjéket<sup>7</sup>. Az *Euglena* esetében a fényelkerüléséért felelős organellumban találtak egy BLUF domén típusú fehérjét (PAC- $\alpha/\beta$ ) hetero-tetramer formában. A kutatók legnagyobb meglepetésére a fehérje C-terminális bakterialis adenilát ciklázokkal mutatott hasonlóságot. Kísérleteik kimutatták, hogy az *Euglena*-ban található adenilát cikláz aktivitása kék fény hatására jelentősen megnövekszik, és ez szerepet játszik az ostoros fényelkerülésében<sup>97</sup>.

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 represszor<sup>98</sup>.

A PAC- $\alpha/\beta$  és az AppA felfedezését követte *Synechocystis* nevű cianobaktériumban található PixD nevű fehérje felfedezése, amely a fototaxisban vesz részt<sup>99</sup>, az *Acitenobacter baumannii* nevű kórházi szuperrezisztens baktériumban talált BLUF domén fehérje (BlSA) pedig a biofilm képződésért<sup>100</sup> felel. Az eddig megismert BLUF domén fehérjék közös tulajdonsága, hogy a flavin abszorpciós csúcsa a kék fényvel való megvilágítás hatására mintegy 10 nm-rel a vörös felé tolódik el, a 470 nm körül megfigyelt váll pedig „kisimul”. Ennek az oka valószínűleg a flavin körüli hidrogénkötés-rendszer átrendeződése. Az irodalomban a vad típusú fehérje mellett mindazokat a mutánsokat is fotoaktívnak tekintjük, amelyek esetében ez a vörös eltolódás megfigyelhető.

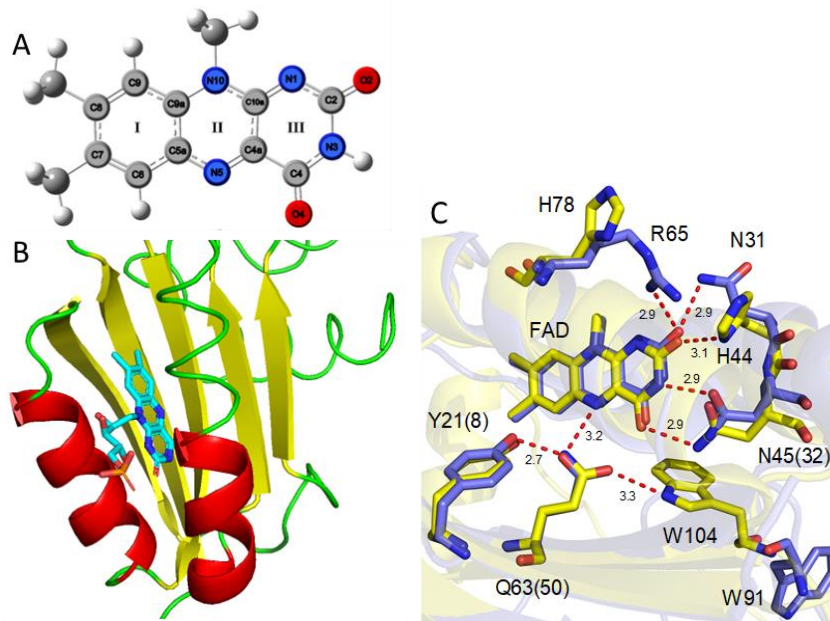




**5.1 ábra** A bal oldali ábrán az AppA működése látható: kék fény hatására az AppA-PpsR komplex disszociálódik. A jobb oldali ábrán a vad típusú AppA abszorpciós spektruma látható sötét (kék) és világos (vörös) állapotban. Jól megfigyelhető, hogy világos állapotban a flavin 450 nm körüli csúcsa mintegy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

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 konformációváltozást elindítja. Tizenöt év kiterjedt kutatást követően is gyakorlatilag ugyanaz a három modell vetélkedik egymással. Az első modell szerint – amelyik az Anderson-féle röntgenkristallográfiás szerkezetet<sup>101</sup> 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 támogatja<sup>19</sup>.

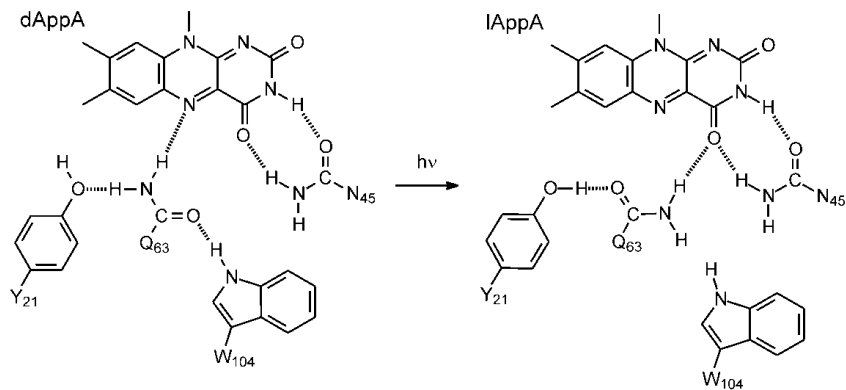


**5.2 ábra** A) az izoalloxazin gyűrű az irodalomban használt számozással B) A PixD BLUF doménjének szerkezete (pdb: 2HFO) C) a PixD és az AppA flavin körüli konzervált aminosavak, zárójelben a PixD számozás

### 5.1.1 A FAD körüli hidrogénkötés-rendszer vizsgálata

A BLUF domén fehérjék működésében leginkább két, a FAD közvetlen környezetében található aminosav játszik kulcsszerepet a 21-es pozícióban található tirozin, valamint a 63-as pozícióban található glutamin. Bármelyik cseréje a fehérje a fotoaktivitásának megszűnésével jár<sup>54,102</sup>.

Az 5.3-as ábrán látható modellen látható, hogy mindkét aminosav valamilyen módon része a FAD körüli hidrogénkötés-rendszernek.



**5.3 ábra** A látható modell szerint az abszorpciót követően a glutamin elfordulása következtében a közvetett módon kapcsolódik a flavin C4=O karboniljához.

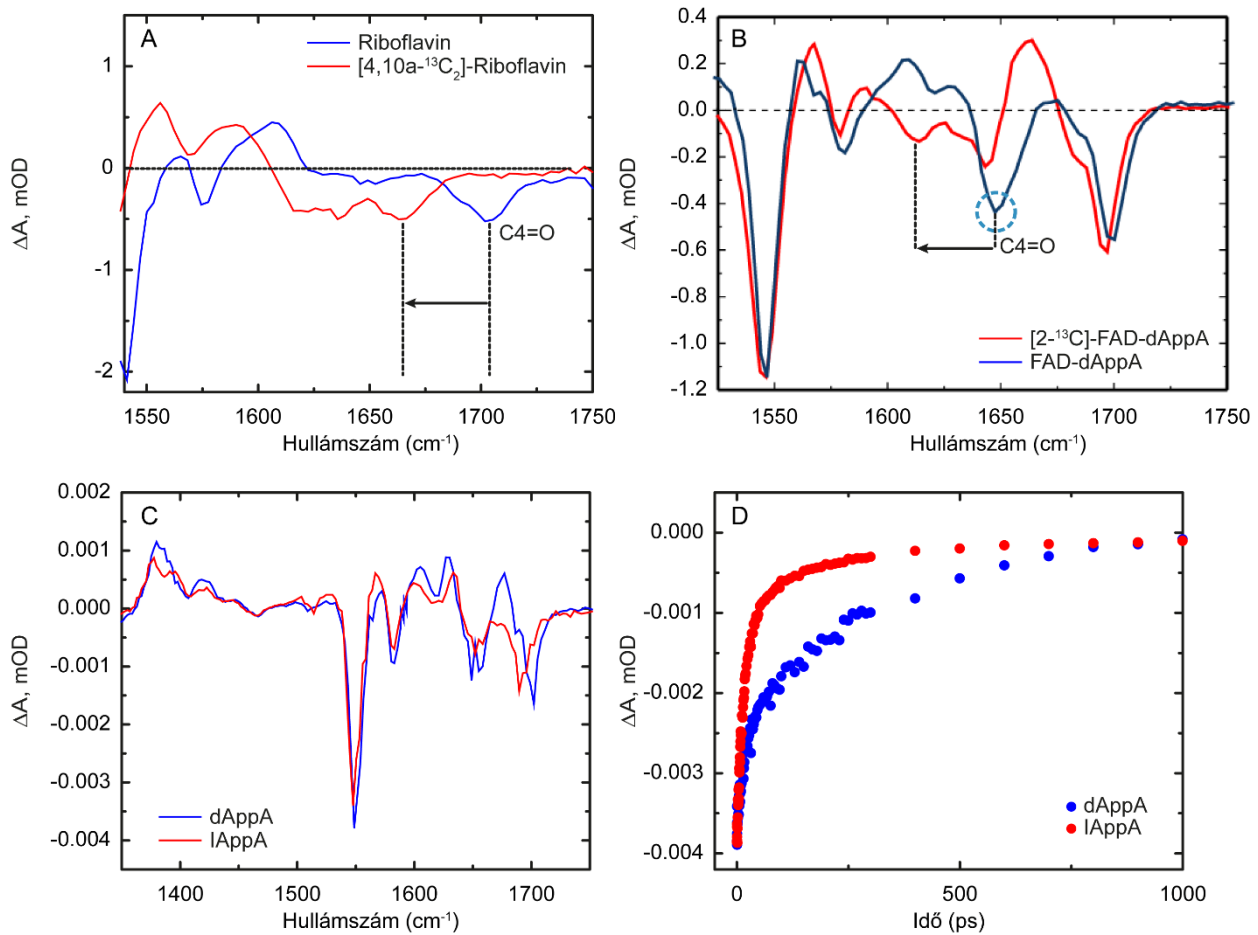
A hidrogénkötések átrendeződését tranziens infravörös abszorpció segítségével kívántuk tanulmányozni, ehhez azonban szükségünk volt a megfigyelt vibrációs módusok azonosítására. Ennek érdekében DFT számításokat végeztünk az izoalloxazin gyűrűn, és a számításokból kapott vibrációs módusokat összehasonlítottuk a kísérleti adatokkal. A kísérleti és a számított vibrációs módusok pontos beazonosítása érdekében izotóp-jelölést hajtottunk végre, a flavin gyűrűjének több szén atomját is a 13-as szén izotópra cseréltük. A nehezebb szénatom ilyen módon lassabb vibrációs frekvenciát eredményezett, ilyen módon sikerült beazonosítani a mért frekvenciákhoz tartozó vibrációkat<sup>103,104</sup>.

Az 5.4-es ábrán látszik, hogy a <sup>13</sup>C izotópra cserélve a riboflavin 4-es pozícióban levő szén atomját az 1700 cm<sup>-1</sup>-nél található módus közel 40 cm<sup>-1</sup>-es eltolódását figyelhetjük meg az alacsonyabb frekvenciák felé. Ennek megfelelően az 1700 cm<sup>-1</sup>-nél megfigyelt rezgési módus a C4=O karbonil rezgésével hozható kapcsolatba. Abban az esetben, amikor a FAD C2-es a szénatomját helyettesítettük <sup>13</sup>C izotóppal, az 1650 cm<sup>-1</sup>-es csúcs alacsonyabb frekvenciák felé tolódását figyeltük meg, amiből az következik, hogy az 1650 cm<sup>-1</sup>-es csúcs a C2=O karbonil rezgésének felel meg. A DFT számításaink alapján a domináns 1547 cm<sup>-1</sup>-es csúcs valamint az 1580 cm<sup>-1</sup>-es csúcs az izoalloxazin gyűrű rezgéseinek felelnek meg.

	[2- <sup>12</sup> C <sub>1</sub> ]-FAD		[2- <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ]-FAD		[4,10a- <sup>12</sup> C <sub>2</sub> ]-Rf		[4,10a- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]-Rf	
H <sub>2</sub> O	1547 cm <sup>-1</sup>	1523 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>	1547 cm <sup>-1</sup>	1521 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>				
	1581 cm <sup>-1</sup>	1545 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>	1581 cm <sup>-1</sup>	1543 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>				
	1663 cm <sup>-1</sup>	1619 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O+N <sub>3</sub> wag	1625 cm <sup>-1</sup>	1583 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O+N <sub>3</sub> wag				
	1706 cm <sup>-1</sup>	1627 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O+N <sub>3</sub> wag	1703 cm <sup>-1</sup>	1627 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O+N <sub>3</sub> wag				
D <sub>2</sub> O	1547 cm <sup>-1</sup>	1523 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>	1545 cm <sup>-1</sup>	1521 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>	1547 cm <sup>-1</sup>	1523 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>	NA	1515 cm <sup>-1</sup> C10 <sub>a</sub> N <sub>1</sub>
	1581 cm <sup>-1</sup>	1545 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>	1581 cm <sup>-1</sup>	1543 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>	1575 cm <sup>-1</sup>	1545 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>	1565 cm <sup>-1</sup>	1536 cm <sup>-1</sup> C4 <sub>a</sub> N <sub>5</sub>
	1648 cm <sup>-1</sup>	1594 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O, C <sub>4</sub> =O asym +N <sub>3</sub> wag	1600 cm <sup>-1</sup>	1563 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O, C <sub>4</sub> =O asym+N <sub>3</sub> wag	1648 cm <sup>-1</sup>	1594 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O, C <sub>4</sub> =O asym +N <sub>3</sub> wag	1620 cm <sup>-1</sup>	1570 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O, C <sub>2</sub> =O asym +N <sub>3</sub> wag
	1699 cm <sup>-1</sup>	1624 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O, C <sub>2</sub> =O sym +N <sub>3</sub> wag	1697 cm <sup>-1</sup>	1618 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O, C <sub>2</sub> =O sym +N <sub>3</sub> wag	1700 cm <sup>-1</sup>	1624 cm <sup>-1</sup> C <sub>4</sub> =O, C <sub>2</sub> =O sym +N <sub>3</sub> wag	1669 cm <sup>-1</sup>	1608 cm <sup>-1</sup> C <sub>2</sub> =O, C <sub>4</sub> =O sym+N <sub>3</sub> wag

**5.1 Táblázat** A táblázat normál is <sup>13</sup>C jelölt FAD illetve riboflavin esetében végzett méréseket illetve számításokat tartalmazza vízben illetve nehézvízben. A baloldalsó oszlop a mért érték, a jobboldalsó a DFT számítás során kapott módus.

Mindezek alapján az infravörös tranziens abszorpciós mérésekből következtetéseket tudunk levonni a flavin körüli hidrogénkötés-rendszerben a gerjesztést követő bekövetkezett változásról. Az 5.4 C ábrán látható, hogy a gerjesztést követően (világos állapotban) az 1700 cm<sup>-1</sup>-es csúcs mintegy 12 cm<sup>-1</sup>-t mozdul el az alacsonyabb frekvenciák felé, ami arra utal, hogy a fotoaktiváció során a C<sub>4</sub>=O karbonil rezgésének frekvenciája alacsonyabb lesz, vagyis új hidrogénkötés alakul ki valamelyik közeli aminosavval.



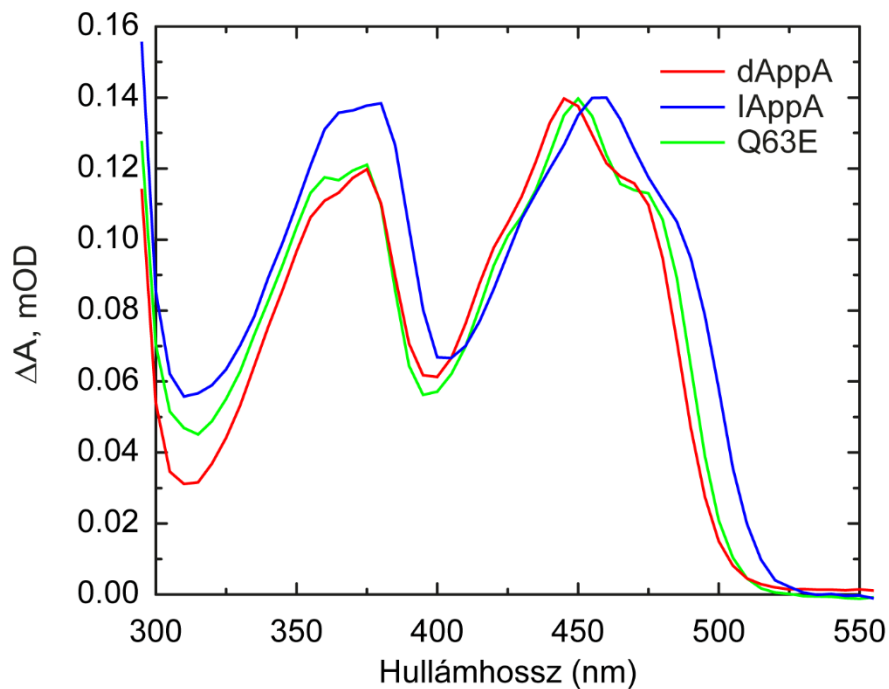
**5.4 ábra** A) A és a 4-es és 10-es szén pozíciókban  $^{13}\text{C}$  jelölt riboflavin TRIR spektruma. A frekvencia eltolódásából következik, hogy az 1700  $\text{cm}^{-1}$  felel meg a C4=O karbonil rezgésének, a nehezebb szén következtében a karbonil frekvenciája csökken. B) FAD és a 2-es szén pozícióban  $^{13}\text{C}$  jelölt FAD-ot tartalmazó AppA spektruma. Az 1650  $\text{cm}^{-1}$  frekvencia eltolódásából következtethetünk arra, hogy ez a frekvencia a C2=O karbonil módusa. (Haigney, Lukács et al., *Biochemistry*, 2011)

A pozitív (sokak által röviden csak tranzienseknek nevezett) rezgési módusok azonosítása már nehezebb feladat volt. A gerjesztett flavinnak (FAD\*) pozitív módusai vannak és gyakorlatilag a gerjesztéssel együtt azonnal (100 femtoszekundumon belül) megjelennek. DFT számítások és kísérletek segítségével sikerült azonosítanunk az 1380  $\text{cm}^{-1}$  és 1420  $\text{cm}^{-1}$ -nél található csúcsokat amelyek az izoalloxazin gyűrű C=C és C=N rezgéseivel hozhatóak kapcsolatba <sup>105,106</sup>.

Az  $1547\text{ cm}^{-1}$ -nél mért kinetikákat összehasonlítva látszik, hogy világos állapotban a flavin gerjesztett állapota gyorsabban relaxálódik, mint sötét állapotban. Ez arra utal, hogy világos állapotban egy elektron donorként (is) funkcionáló aminosav közelebb kerül az izoalloxazin gyűrűhöz, aminek következtében egy hatékony elektron transzfer folyamat valósul meg. Ennek az aminosavnak a kilétével foglalkozom a következő fejezetben.

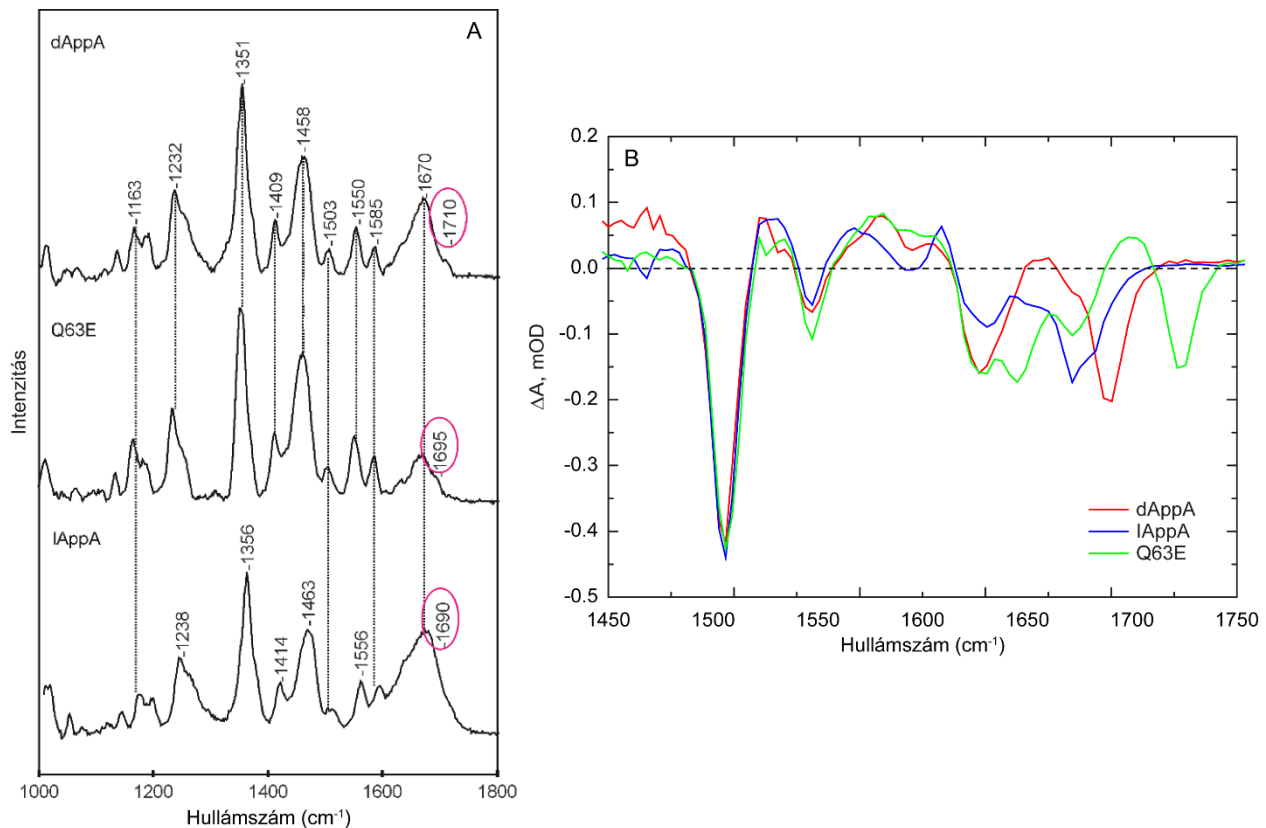
### *A Q63E AppA mutáns*

Az 5.1 ábrán látható összes modell különleges szerepet tulajdonít a Q63-as glutaminnak a fotoaktiváció folyamatában, ezért kutatásainknak ebben a részében megpróbáltunk választ találni arra, hogy mi történik ezzel az aminosavval és a foton abszorpciót követően és mi a szerepe a fotoaktivációban. Korábbi munkánkból kiderült ugyanis, hogy a glutamin leucinra (Q63L) való cseréje megakadályozta a világos állapot létrejöttét<sup>102</sup>. A Q63E mutáns esetében mások azt a javaslatot tették, hogy a fehérje úgy viselkedik mintha folyamatosan bekapcsolt állapotban lenne<sup>107</sup>, mivel a mutáns esetében a flavin  $450\text{ nm}$ -nél található abszorpciós csúcsa néhány nanométeres vörös eltolódást mutat. A kromatográfiás vizsgálatok azt mutatták, hogy a teljes hosszúságú AppA Q63E mutáns nem tud komplexet alkotni a PpsR-rel, vagyis olyan mintha folyamatosan világos állapotban lenne. A glutamin szerepének vizsgálata érdekében tranziens abszorpciós (a látható és infravörös tartományban egyaránt), tranziens fluoreszcencia, valamint Raman spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk.



**5.5 ábra** AppA sötét (dAppA) és világos (lAppA) állapotban, valamint a Q63E mutáns abszorpciós spektruma

Az **5.5 ábrán** látszik, hogy a Q63E mutáns esetében az abszorpciós spektrumban egy 2-3 nm-es elmozdulás megfigyelhető a megvilágítás hatására, de nem annyira karakteres, mint a világos állapotban. Ez a trend figyelhető meg a Raman spektroszkópiai mérések során is (lásd **5.6 ábra**), ahol a megvilágítást követően a C4=O karbonil csúcs eltolódása figyelhető meg az alacsonyabb frekvenciák felé. A Q63E mutáns esetében ez a csúcs az  $1690\text{ cm}^{-1}$  frekvenciánál figyelhető meg, szemben a világos állapot esetében mért  $1695\text{ cm}^{-1}$ -rel.

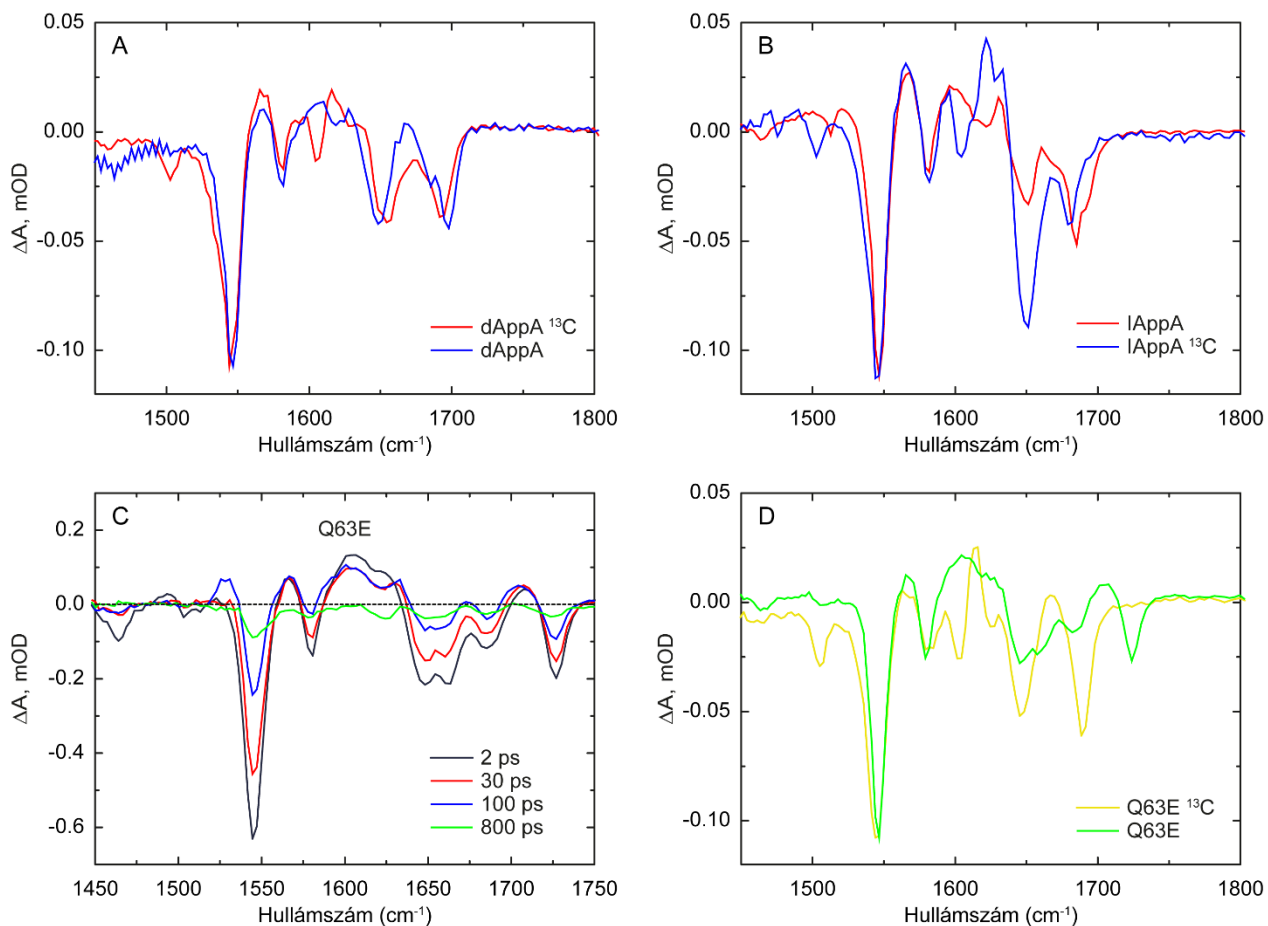


**5.6 ábra A)** AppA Raman spektruma sötét, világos illetve a Q63E mutáns esetében B) AppA TRIR spektruma 3 ps-nál, sötét, világos AppA illetve a Q63E AppA mutáns esetében. A Raman spektroszkópia kevésbé volt érzékeny a C4=O karbonil rezgési módusára. A TRIR spektroszkópiával ez a csúcs jól elkülönült

Az infravörös tranziens abszorpciós spektrumok további információkkal szolgálnak: a leglátványosabb különbség a Q63E esetében megjelenő csúcs a magasabb frekvenciák esetében, amely jelentősen eltér a C4=O karbonil frekvenciájától. Ennek a vibrációs módusnak a megjelenése 1724-1730 cm<sup>-1</sup> körül meglehetősen váratlan volt és sokáig nem is tudtuk azonosítani. A FAD esetében előfordul, hogy ez a C4=O karbonil módus a magasabb frekvenciák felé tolódik, de csak olyan oldószerben, amely lecsökkentette a FAD körüli hidrogén kötések. A kérdés megválaszolásához ismét izotóp jelölést alkalmaztunk: a fehérjét úgy expresszáztuk, hogy <sup>13</sup>C izotóp épült be minden egyes <sup>12</sup>C atom helyett. A FAD-ot a tisztítás egy későbbi folyamatában adtuk hozzá, így a FAD szén atomjai változatlanok maradtak, míg az apoprotein szén atomjai helyett <sup>13</sup>C épült be. Ennek megfelelően a fehérje vibrációs módusait sikerült elválasztani a FAD



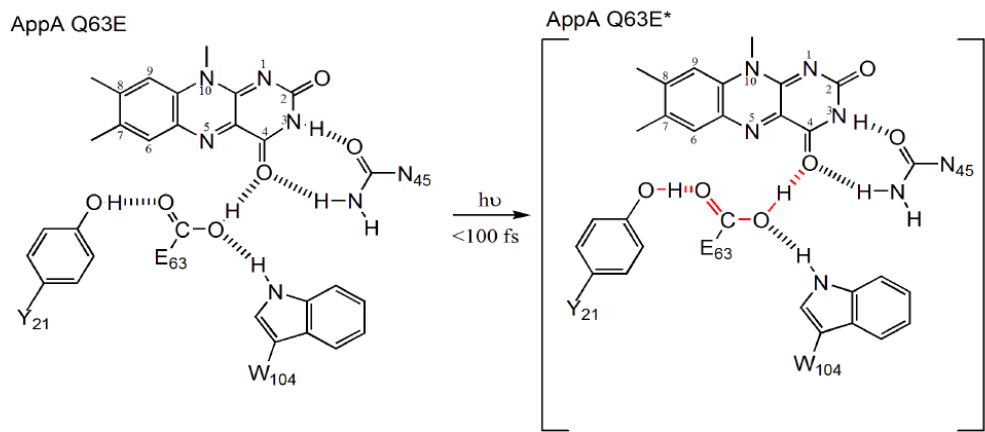
módusaitól. Ahogyan az **5.7 ábrán** is látszik az izotópjelölés a sötét és világos AppA esetében is változatlanul hagyta a FAD C4=O módusát – csak egy 2-3  $\text{cm}^{-1}$ -es eltolódás figyelhető meg – vagyis az 1724-30  $\text{cm}^{-1}$  körül megfigyelt új vibrációs módus nem a FAD-hoz, hanem a fehérjéhez tartozik. Ez egyértelműen látszik a Q63E mutáns esetében, ahol a magas frekvenciájú módus az izotópjelölés következtében mintegy 35  $\text{cm}^{-1}$ -rel a kisebb frekvenciák felé tolódott, míg a FAD fő módusai (1547  $\text{cm}^{-1}$ , 1581  $\text{cm}^{-1}$  és 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) változatlanok maradtak.



**5.7 ábra** **A)** normál és  $^{13}\text{C}$  jelölt AppA sötét állapotban 3 ps késleltetés esetében **B)** normál és  $^{13}\text{C}$  jelölt AppA világos állapotban 3 ps késleltetés esetében **C)** Q63E mutáns TRIR spektrumai különböző késleltetési időknél. **D)** normál és  $^{13}\text{C}$  jelölt Q63 AppA mutáns 3 ps késleltetés esetében

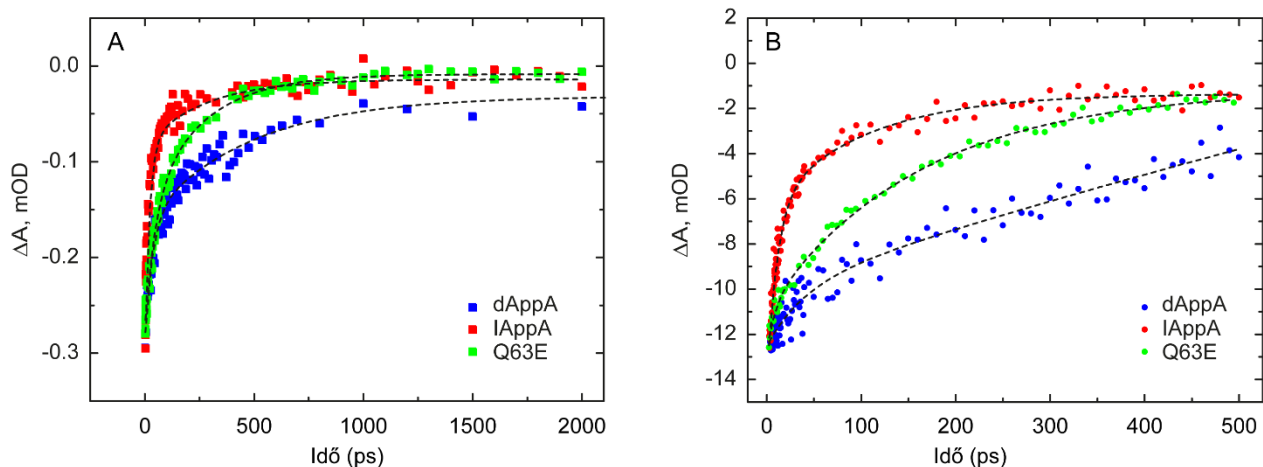
Mivel a magas frekvenciájú módus a karboxil csoportokra jellemző és már gerjesztéskor, vagyis

100 fs-on belül megfigyelhető arra következtethetünk, hogy a glutaminsav (E63) hidrogén kötést alkot a FAD-dal. Erre utal az is, hogy a Q63E TRIR spektrumában (lásd **5.7 ábra**)  $1684\text{ cm}^{-1}$ -nél megjelenik a világos állapotra jellemző FAD C4=O karbonil módus. Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy a gerjesztést követően a glutaminsavnak a flavin C4=O karboniljával létrehozott hidrogén kötése megerősödik a gerjesztést követően, hasonlóan az Y21 tirozinnal alkotott hidrogén kötéshez (lásd **5.8 ábra**).



**5.8 ábra** A 63-as pozícióban elhelyezkedő glutamát és flavin szerkezete a gerjesztés előtt és után

A nyers adatokat vizsgálva (**5.7 C ábra**) feltűnő, hogy 100 ps-nál megjelenik egy intenzív pozitív csúcs  $1528\text{ cm}^{-1}$ -nél. A 3. fejezetben tárgyaltaknak megfelelően ez a csúcs a semleges flavin gyök (FADH<sup>•</sup>) rezgési módusának felel meg. Ez meglepő ugyanis a vad típusú fehérje esetében nem sikerült elektron transzfert megfigyelni (lásd a későbbi fejezetben). Mivel a Q63E mutáns esetében a semleges flavin gyök rezgési módusa figyelhető meg, arra következtethetünk, hogy ebben az esetben PCET-re kerül sor, hasonlóan a PixD-nél illetve az OaPAC-nél megfigyeltékhez (ez utóbbit lásd az **5.2 fejezetben**).



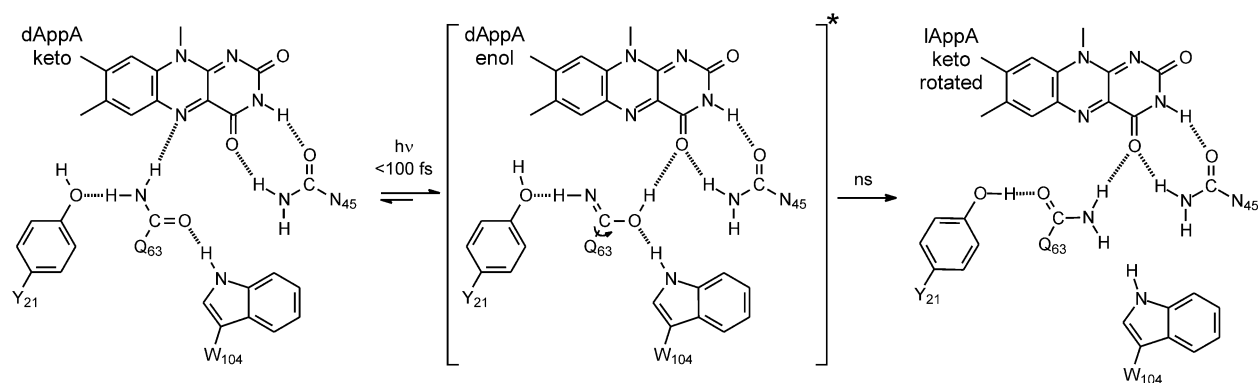
**5.9 ábra** A) Sötét és világos AppA valamint a Q63E mutáns esetében az 1547 cm<sup>-1</sup>-nél megfigyelt kinetika; B) Sötét és világos AppA valamint a Q63E mutáns esetében 450 nm--nél megfigyelt kinetika

A vad típusú AppA és a Q63E mutáns esetében mért kinetikákat megfigyelve (lásd **5.9 ábra** és 5.2 táblázat) az látható, hogy a gerjesztett állapot relaxációja világos állapotban a leggyorsabb, a Q63E mutáns a relaxáció sebessége szempontjából a világos és a sötét állapot között helyezkedik el. Ennek legvalószínűbb oka, hogy világos állapotban és a Q63E mutáns esetében a W104 triptofán a flavinhoz közel helyezkedik el (lásd a következő alfejezetet).

	450 nm	1547 cm <sup>-1</sup>
dAppA	30 ps, 560 ps	34ps, 473 ps
lAppA	7 ps, 67 ps	8 ps, 67 ps
Q63E	8 ps, 162ps	25 ps, 198ps

**5.2 Táblázat** Látható és infravörös tranziens abszorpciós mérések esetében megfigyelt relaxációs idők a 450 nm és 1547 cm<sup>-1</sup> bleach esetében

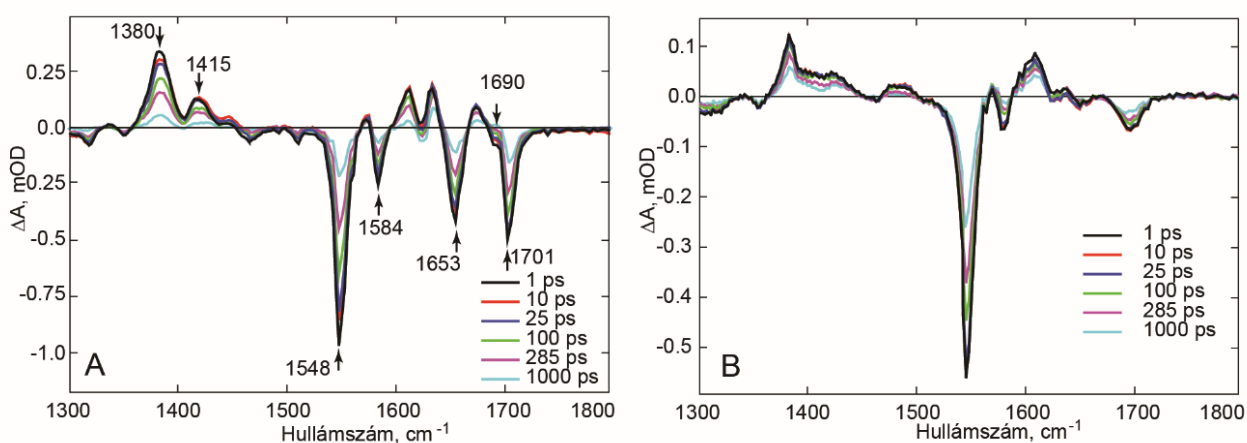
A Q63E mutánsban végzett méréseink alapján az látható, hogy a Q63E mutánshoz hasonlóan a Q63-as glutamin világos állapotban hidrogén kötést alkot a flavin C4=O karbonil csoportjával, ehhez azonban a glutamin amid csoportjának enol állapotban kell lennie. Az általunk alkotott modell szerint sötét állapotban 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 elfordulására<sup>19</sup>.



**5.10 ábra** A fotoaktiváció modellje az AppA-ban a Q63E mutánsban 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.

### 5.1.2 Az AppA funkciója nem függ az elektron transzfertől<sup>4</sup>

Az PixD nevű BLUF fehérjén végzett kísérleteket 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<sup>108,109</sup>. Saját – az AppA esetében elvégzett – tranziens infravörös méréseinkben (**5.11 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 ribitol 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<sup>35</sup>.



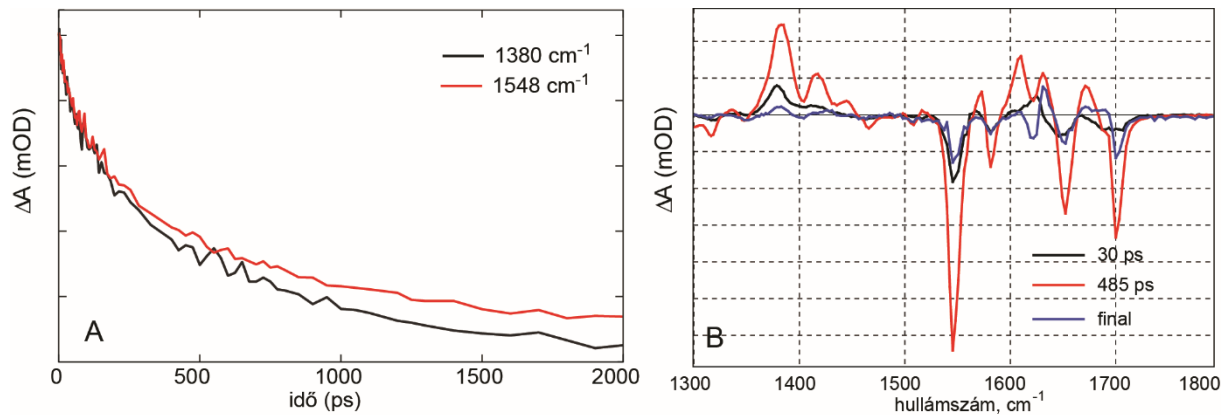
**5.11 ábra** A) AppA és B) FMN tranziens infravörös spektrumai különböző késleltetési időknél

Az **5.11**-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  $\text{cm}^{-1}$ ) atomjánál illetve C4 (1701  $\text{cm}^{-1}$ ) atomjánál található karbonilcsoportok rezgéseitől származik. Az 1548  $\text{cm}^{-1}$ -nél illetve 1584  $\text{cm}^{-1}$ -nél található módusok pedig a flavin izoalloxazin gyűrűjének rezgései. Az 1380  $\text{cm}^{-1}$  és 1415  $\text{cm}^{-1}$ -nél található módusok a flavin gerjesztett

<sup>4</sup> Ez a fejezet a Lukacs et al., JACS (2014); Laptanok, Lukacs et al., Faraday Discussions (2015); A. Lukacs, P.J. Tonge, S. R. Meech *Acc. Chem. Res.* (2022) cikkekben bemutatott anyagra épül.

állapotának rezgései – mivel mindkét spektrumban megtalálható – amelyet a gerjesztett állapot markereként használtunk.

Az **5.12 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 időkéseleltetéseknél 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.

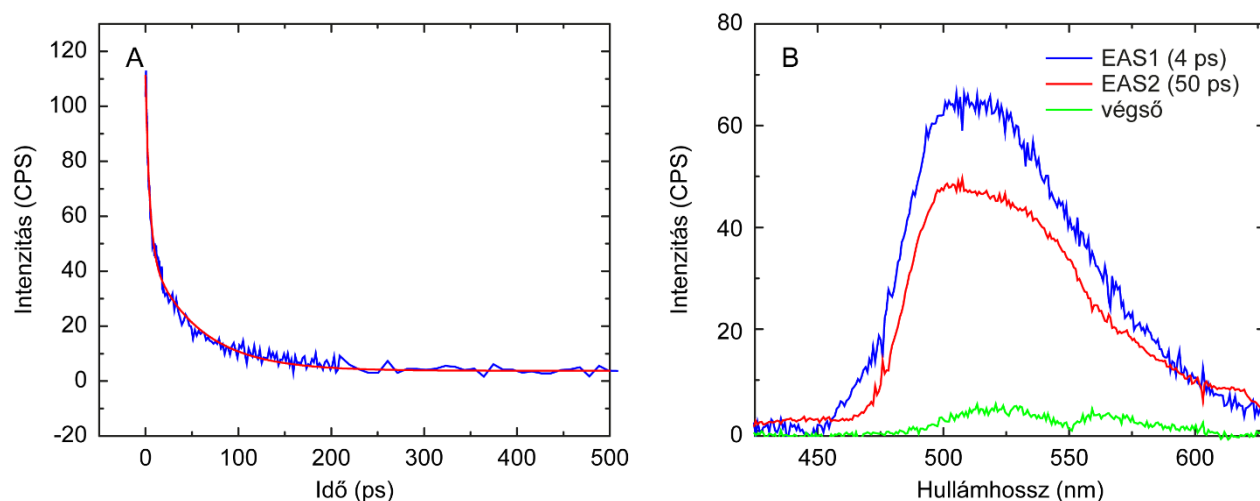


**5.12 ábra.** Az A) ábrán a gerjesztett állapot és az alapállapot abszorpciójának relaxációja látható. A B) ábrán a különböző időállandókhoz tartozó spektrumok (DAS=Decay Associated Spectra) láthatóak.

Annak érdekében, hogy az elektron transzfer természetét karakterizáljuk az AppA-ban két utat követtünk: létrehoztunk olyan mutánsokat, amelyek kizárják az elektron transzfer lehetőségét. Ehhez a FAD környezetéből eltávolítottuk az összes olyan aminosavat, amely elektron donor lehet, ilyen a Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> 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 töltésszétválasztás folyamatának szabad entalpia változása kisebb (negatívabb), mint a tirozin esetében <sup>110</sup>. A fotoindukált elektron transzfer folyamat

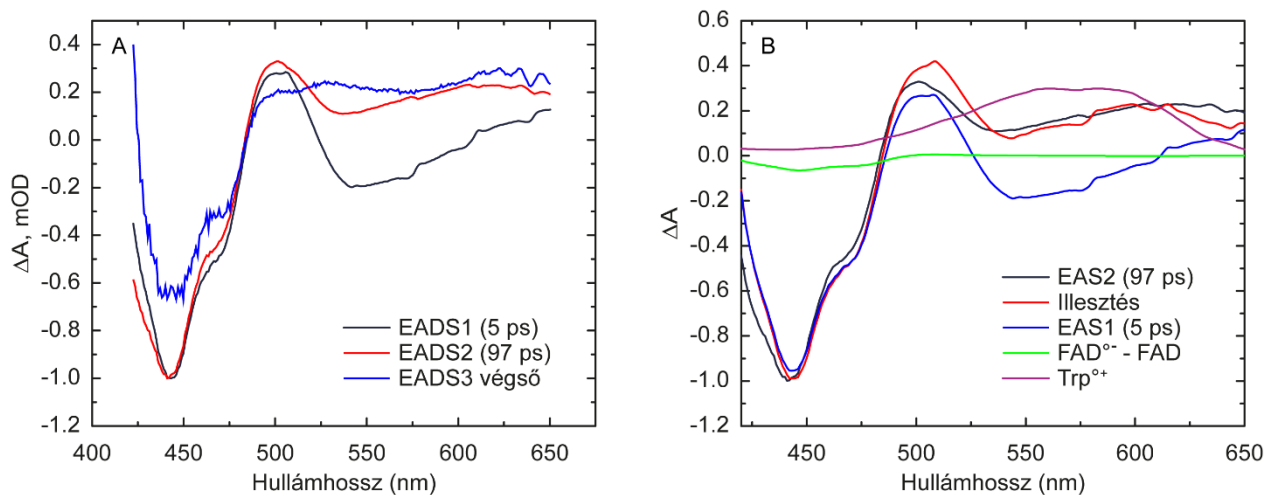
karacterizálása érdekében tranziens fluoreszcencia spektroszkópai, valamint látható és infravörös tranziens abszorpciós méréseket végeztünk.

A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópai méréseink az Y21W mutáns esetében a gerjesztett állapot nagyon gyors relaxációját mutatták, 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<sub>BLUF</sub> mutáns), a fluoreszcencia élettartam teljes mértékben megegyezik az FMN fluoreszcencia élettartamával (3.8 ns).



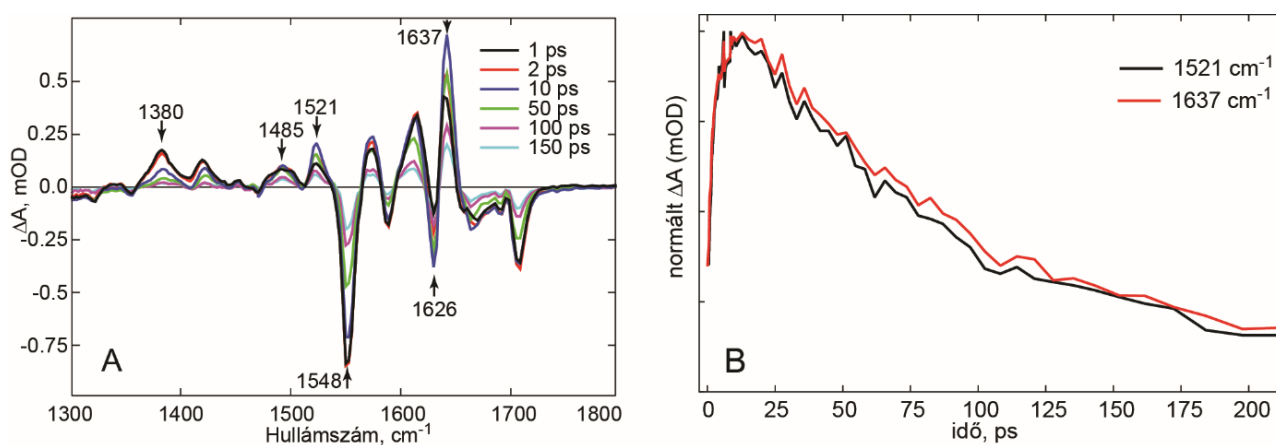
**5.13 ábra** Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópai mérések az Y21W mutáns. A) 520 nm esetében megfigyelt kinetika két élettartammal volt illeszthető:  $\tau_1 = 4.4 \pm 0.2$  ps,  $\tau_2 = 54.5 \pm 2.4$  ps B) A globális illesztéssel kapott EAS spektrumok időállandói nagyon hasonlóak voltak az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

Az Y21W mutánson végzett látható tranziens 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:  $Y21-FAD \rightarrow Y21^{+}FAD^{*-}$ .



**5.14 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 (5.15 ábra).

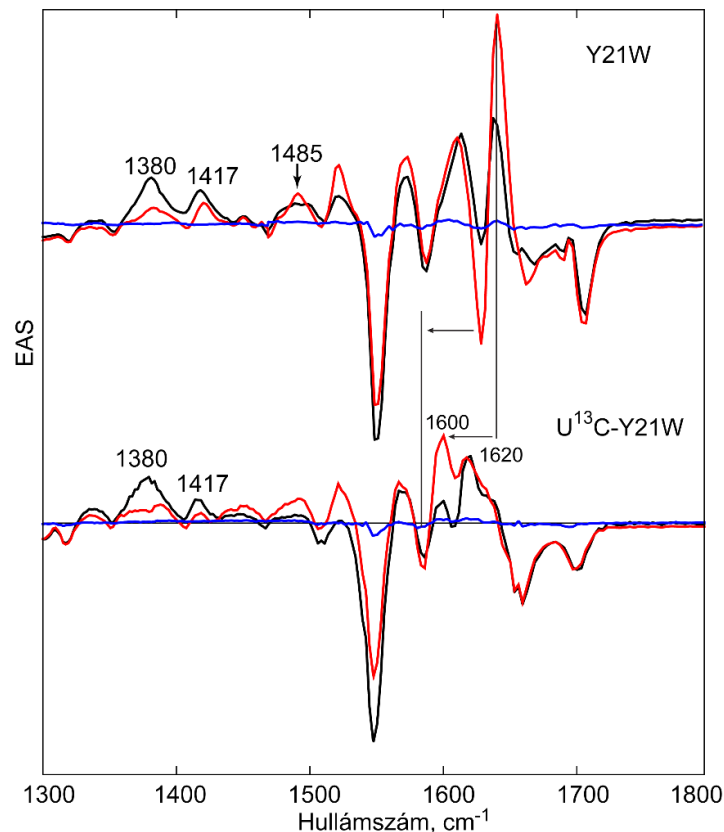


**5.15 ábra** A) Y21W TRIR spektrumok különböző késleltetéseknél B) Az 1521  $\text{cm}^{-1}$  és 1637  $\text{cm}^{-1}$  módusok kinetikája.



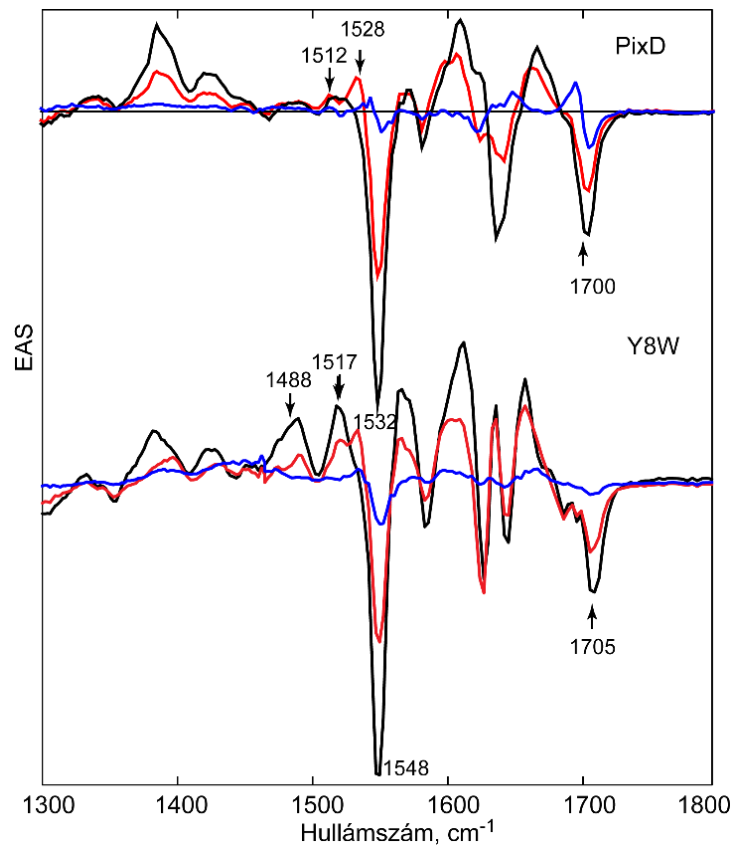
Az **5.15 A ábrán** jól látható, hogy a sötét állapotú AppA-hoz képest a mutánsban három intenzív csúcs ( $1521\text{ cm}^{-1}$ ,  $1626\text{ cm}^{-1}$ ,  $1637\text{ cm}^{-1}$ ) jelent meg, amely 100 ps-on belül változik. Az  $1621\text{ cm}^{-1}$  és  $1637\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt csúcsok kinetikája gyakorlatilag megegyezik. A 3-as fejezetben tárgyaltak alapján az  $1521\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs a FAD<sup>-</sup> gyök az  $1485\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs pedig triptofán kation gyök rezgési módusának feleltethető meg.

Annak érdekében, hogy a flavin rezgéseit elkülönítsük a fehérje módusoktól, <sup>13</sup>C jelölést hajtottunk végre. Ennek során a fehérje összes szén atomját – kivétel a flavin kromofór – <sup>13</sup>C 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 ( $1548\text{ cm}^{-1}$ ) változatlan maradt, az  $1700\text{ cm}^{-1}$ -es módus mindössze négy  $\text{cm}^{-1}$ -es eltolódást mutatott, aminek az oka a C4=O karbonilcsoport és egy közeli aminosav közötti hidrogénkötés megerősödése lehet. Az  $1521\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt módus nem tolódott el, ami egyértelműen azt mutatja, hogy ez a csúcs az FAD gyök állapotának egyik rezgési módusa. Az  $1626\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs teljes, az  $1637\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs részleges eltolódása az alacsonyabb frekvenciák felé arra utal, hogy ezek a módusok a fehérjéhez tartoznak és várhatóan a triptofán gyök állapotának megjelenését mutatják. Az  $1637\text{ cm}^{-1}$ -es csúcs csak részlegesen mozdul el a <sup>13</sup>C 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.



**5.16 ábra** A) Y21W TRIR EAS spektrumai B) A  $^{13}\text{C}$  jelölt Y21W mutáns 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

A továbbiakban infravörös tranziens abszorpciós méréseket végeztünk a vad típusú PixD fehérjén, amelynek esetében korábban látható tranziens abszorpciós spektroszkópai mérésekkel sikerült a flavin gyökök megjelenését kimutatni<sup>53</sup>. A PixD szintén BLUF domén fehérje és a fotofób válaszban van szerepe. A PixD esetében is létrehoztuk az Y8W mutánst, az Y21W mutáns analógiájára. A vad típusú PixD esetében a TRIR spektrumokban megjelennek a tipikus tranziens vibrációs módusok, amelyeket a 3. fejezetben tárgyaltam. Az  $1512\text{ cm}^{-1}$  valamint az  $1528\text{ cm}^{-1}$  módusok megjelenése arra utal, hogy a PixD esetében proton kapcsolt elektron transzfer valósul meg, a 3. fejezetben ismertetett eredmények alapján ugyanis az  $1512\text{ cm}^{-1}$  módus a semleges tirozin gyöknek, az  $1528\text{ cm}^{-1}$  módus pedig a semleges flavin gyöknek felel meg. (A PixD fotoaktivációjának folyamatát egy későbbi cikkünkben<sup>111</sup> részletesen tárgyaltuk, de ezt helyhiány miatt itt nem ismertetem).

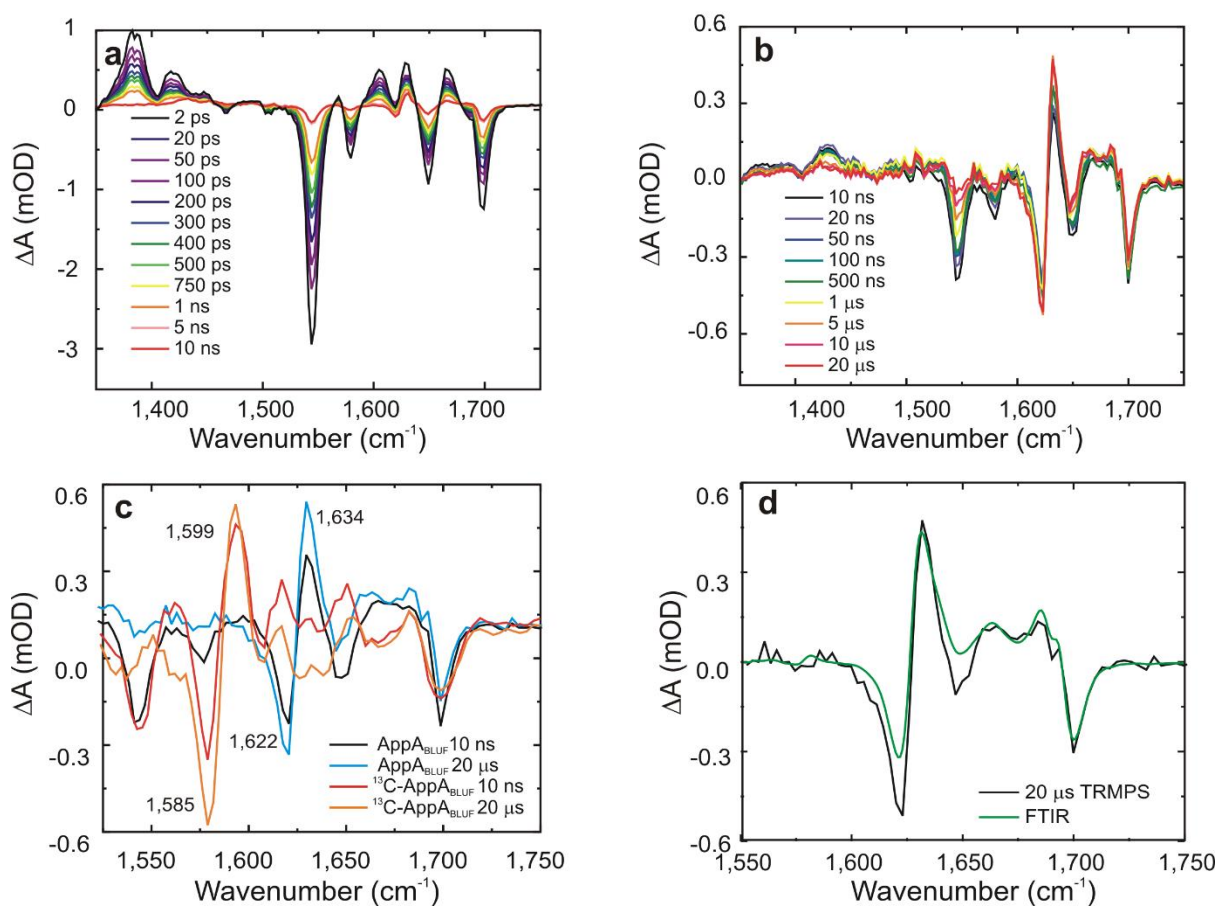


**5.17 ábra** Vad típusú PixD és Y8W PixD esetében mért TRIR adatok EADS spektrumai. A vad típusú PixD esetében a két meghatározó tranziens csúcs ( $1512\text{ cm}^{-1}$  valamint  $1528\text{ cm}^{-1}$ ) a semleges tirozin és FAD gyökök megjelenésének köszönhető. Az Y8W mutáns esetében az  $1488\text{ cm}^{-1}$  csúcs a triptofán kation gyök, az  $1517\text{ cm}^{-1}$  pedig a flavin anionos gyök megjelenésére utal

Az elektron transzfer kérdéskörét a PixD és az AppA mellett részletesen vizsgáltuk több más BLUF domén fehérjében, például a kórházi szuperbaktérium (*Acetobacter baumannii*) virulenciájáért és a biofilm képződésért felelős BlsA-ban, valamint az OaPAC-ban is. A BlsA-n végzett kísérleteink során nem tudtuk megfigyelni a flavin és tirozin/triptofán gyökök megjelenését<sup>100</sup>, míg az OaPAC-ben pedig ez egyértelmű volt (lásd a következő fejezetet). Feltételezésünk szerint az összes vizsgált BLUF domén fehérjében megvalósul az elektron transzfer, az AppA és a BlsA esetében azonban a töltérekombináció sebessége nagyobb, mint a töltéssztésváltásé, ezért nem sikerült megfigyelni<sup>112</sup>.

## 5.1.3 Fehérjék akcióban

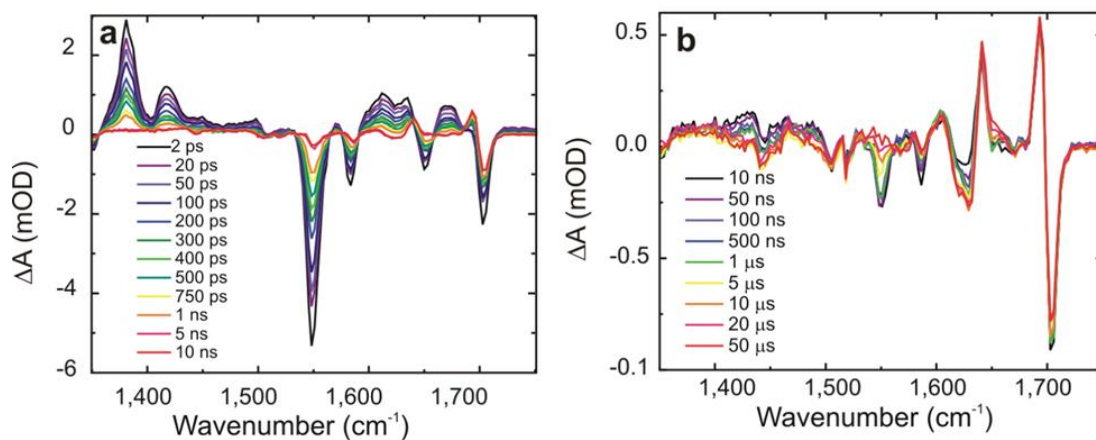
Az előző fejezetben tárgyaltak alapján láthattuk, hogy a gerjesztést követően a fehérjemátrix egy ultragyors strukturális változáson megy keresztül, amelynek kiváltó oka a Q63 glutamin tautomerizációja. Hasonlóan izgalmas kérdés, hogy ez az ultragyors strukturális hogyan terjed tovább a fehérjében és hogyan vezet a fehérje komplex disszociációjához. Ennek a strukturális változásnak a vizsgálata érdekében TRMPS (Time Resolved Multiprobe Spectroscopy) méréseket végeztünk, szintén az infravörös tartományban<sup>113</sup>. A módszer lényege, hogy a gerjesztéshez a 10 kHz-es Thales lézerrendszert használtuk, elektronikus késleltetéssel történt az infravörös próbaimpulzus időzítése. Ez utóbbit egy Spitfire Pro által működtetett Light Conversion OPA állította elő. Ezzel a módszerrel sikerült a nanoszekundumos, mikroszekundumos tartományt is lefedni egészen 1 milliszekundumig.



**5.18 ábra** AppA TRIR spektrumai A) 10 ns mérésáttáig B) 10 ns és 20  $\mu\text{s}$  között C) AppA és  $^{13}\text{C}$  izotó jelölt AppA spektrumának összehasonlítása 10 ns és 20  $\mu\text{s}$ -nál D) A 20  $\mu\text{s}$ -nál mért TRMPS spektrum összevetése az FTIR differencia (világos-sötét állapot) spektrummal Forrás: Brust, Lukacs et. al, JACS, 2013

Az **5.18 A ábrán** látható, hogy a TRIR spektrumokat 10 ns időtartományig a flavin vibrációs módusai dominálják; az  $1380\text{ cm}^{-1}$ ,  $1420\text{ cm}^{-1}$  esetében megfigyelt vibrációs módusok eltűnése arra utal, hogy a gerjesztett állapot 10 ns-on belül megszűnik. Az 5.18 B ábrán viszont látható, hogy az alapállapot nem áll helyre, mivel az  $1547\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  és  $1703\text{ cm}^{-1}$  módusok a mikroszekundumos tartományon is megfigyelhetők. Megjelenik ugyanakkor két intenzív csúcs  $1622$  és  $1631\text{ cm}^{-1}$  esetében. Feltételezésünk szerint ezek a módusok nem a flavinhoz tartoznak, ennek igazolására  $^{13}\text{C}$  izotóp jelölést végeztünk, amelynek érdekében az expresszió során az apoproteinhez tartozó szén atomok  $^{13}\text{C}$  izotópra lettek cserélve, a flavin szén atomjai viszont nem, ezt ugyanis a fehérjetisztítás későbbi szakaszában adtuk hozzá a fehérjéhez. Az izotóp jelölés az  $1622/1631\text{ cm}^{-1}$  csúcsok  $\sim 36\text{ cm}^{-1}$ -es eltolódásához vezetett, ami megfelel az elméleti várt értéknek. Ennek alapján világosan látszik, hogy ez a két frekvencia a fehérje rezgési módusainak feleltethető meg. Ennek a két csúcsonak a fehérjéhez rendelése összhangban van Masuda és munkatársai javaslatával, akik, akik a megfigyelt steady state FTIR különbség spektrum frekvenciái alapján azt javasolták, hogy ezek a változások a  $\beta$ -lemez szerkezet a C=O (amid) módusából erednek, amely a W104, Q63 és Y21 kulcs aminosavak révén kapcsolódik az  $\alpha$ -hélix régióba kötött FAD-hoz<sup>114</sup>.

Annak érdekében, hogy ezt a feltételezést megvizsgáljuk, további TRMPS méréseket végeztünk a W104A mutánsban. Ennek a mutánsnak és az analóg W104 mutánsoknak egyik érdekessége, hogy az abszorpciós spektrumában megfigyelhető a mintegy 10 nm-es eltolódás sötét és világos állapot között, ugyanakkor a  $\sim 80$ -szor gyorsabban tér vissza világos állapotból sötét állapotba, mint a vad típusú AppA. Ez utóbbi lényeges szerkezeti változásra utal, aminek következtében a fehérje gyorsabban tér vissza az alapállapotba.

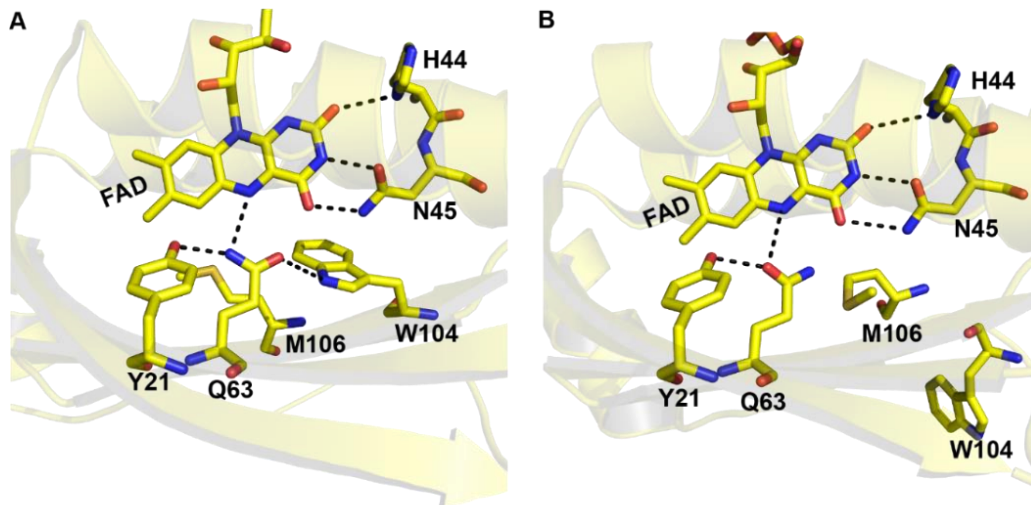


**5.19 ábra** A W104A mutáns 10 ns-ig (A), valamint 50  $\mu\text{s}$ -ig (B) terjedő skálán. Forrás: Brust, et. al, JACS, 2013

A W104A mutánsban végzett TRMPS mérések jelentős különbségeket mutatnak az infravörös tartományban: az 1622/1631  $\text{cm}^{-1}$  csúcsok kevésbé intenzívek a mutánsban, mint a vad típusú fehérjében. Már a 10 ns-os skálán megjelenik egy intenzív csúcs 1688  $\text{cm}^{-1}$ -nél, míg a vad típusú fehérjében ez csak a mikroszekundumos skálán jelenik meg. Ez a vibrációs módus a hidrogén kötések megerősödésének az eredménye, és arra utal, hogy a W104A mutánsban ez a domináns folyamat a gerjesztést követően. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a W104A mutánsban a fotociklus rövidebbre van zárva, ami azért különlegesen érdekes, mert ez a mutáció a funkció elvesztésével jár.

#### 5.1.4 A W104 triptofán pozíciójának meghatározása

Az AppA fotoaktivációjának vizsgálata során számos cikk foglalkozott a FAD-hoz közelebb eső 104-es számú triptofánnak a szerepével. A röntgenkristallográfiás adatok alapján úgy tűnik ugyanis, hogy az abszorpciót követően a triptofán elmozdul, de egymásnak ellentmondó modellek készültek, hogy ez miként valósul meg. Anderson első röntgenkristallográfiás szerkezete (**5.20 ábra**) esetében sötét állapotban a 104-es pozícióban levő triptofán a FAD-hoz közelebb esett (ez a Trp<sub>in</sub> konfiguráció) míg az M106-os aminosav távolabb esett a flavintól<sup>101</sup>. A Schlichting-csoport által meghatározott szerkezet esetében a triptofán a fehérje sötét és világos állapotban egyaránt a FAD-tól távoli pozícióban helyezkedett el<sup>115</sup>. Érdekes módon az AppA mellett más BLUF fehérjék esetében is a meghatározott szerkezetekben a W104 analóg triptofánok többnyire Trp<sub>out</sub> helyzetben helyezkednek el. A röntgenkristallográfiás kísérletek mellett több elméleti számítás és kísérlet foglalkozott azzal a kérdéssel, hogy vajon a W104 szerepe elengedhetetlen-e a fotoaktiváció során, vagy csak egy nem produktív, alternatív elektron transzfer útvonalban vesz részt. Funkcionális vizsgálatok azonban arra utaltak, hogy a W104 kritikus a fehérje működése során is, a W104 mutációja esetében ugyanis nem jött létre az AppA-PpsR komplex. A W104 szerepének feltárása érdekében több mutánst is készítettünk (W104A, W104F). Ezek spektrális szempontból a vad típusúhoz hasonlóak voltak, és egyben fotoaktívnak tűntek – megvilágítás hatására megfigyelhető volt a 450 nm körüli abszorpciós csúcs vöröseltolódása – világos állapotból sötét állapotba való visszatérésük azonban másodpercek alatt megvalósult szemben a vad típusnál megfigyelt fél órával. Ez arra utal, hogy a mutáció hatására egy olyan szerkezeti változás következik be, amely drasztikus hatással van a fotociklusra.



**5.20 ábra** Az AppA-BLUF-domén röntgenkristallográfiás szerkezetének szalag diagramjai. A ábra: WT AppA (pdb:1yrx). B ábra: C20S AppA (pdb:2iyg). A szaggatott vonallal jelölt hidrogén kötések kapcsán fontos alkotóelemek: Y21,H44,N45,Q63. A két ábra célja a W104 két lehetséges pozíciójának bemutatása. Az A ábra esetén a triptofán a FAD fele mutat, míg a B ábra esetén az ellentétes irányba áll.

A kérdés megoldásának érdekében a W104 pozícióját FRET segítségével kívántam karakterizálni, amelynek során a triptofánt kívántam donorként a FAD-ot pedig akceptorként használni. A távolságot FRET hatásfokának segítségével szándékoztam meghatározni a következő képlet segítségével<sup>116</sup>:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1 - E}{E}},$$

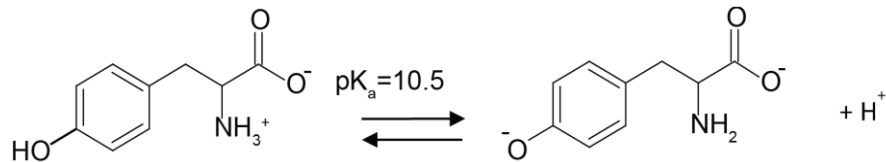
ahol R a donor-akceptor távolság, E a megfigyelt FRET hatásfok,  $R_0$  pedig az 50%-os transzferhatásfok esetében kapott donor akceptor távolság.

Mivel a FAD abszorpciója nélkül nem valósulhat meg a fotoaktiváció (a sötét állapotból a világos állapotba való átmenet) ezért a FRET-et az akceptor oldalról kívántam mérni, ehhez szükséges volt egy olyan mutánst használni, amelyben nincs triptofán. Ennek megfelelően elkészítettük a W64FW104A mutánst, amely a várakozásoktól eltérően triptofán nélkül is fluoreszcens volt abban a tartományban, ahol a triptofán fluoreszcenciája várható (lásd **5.22 ábra**). Az irodalom áttekintését követően kiderült, hogy a deprotonált tirozin (vagyis a tirozinát) spektrális tulajdonságai teljesen megegyeznek a triptofánéval (lásd **5.21 ábra**), erről már a hetvenes években beszámolt Artur G. Szabo, aki CTA-nak és CTB-nevezett két triptofánt nem tartalmazó peptidben figyelte meg a tirozinát 345 nm körüli fluoreszcencia emissziós csúcsát<sup>117</sup>. Hasonló fluoreszcencia



emissziót figyeltünk meg a közelmúltban a *Leptospira interrogans*ból való triptofánt nem tartalmazó MreB fehérje esetében is.

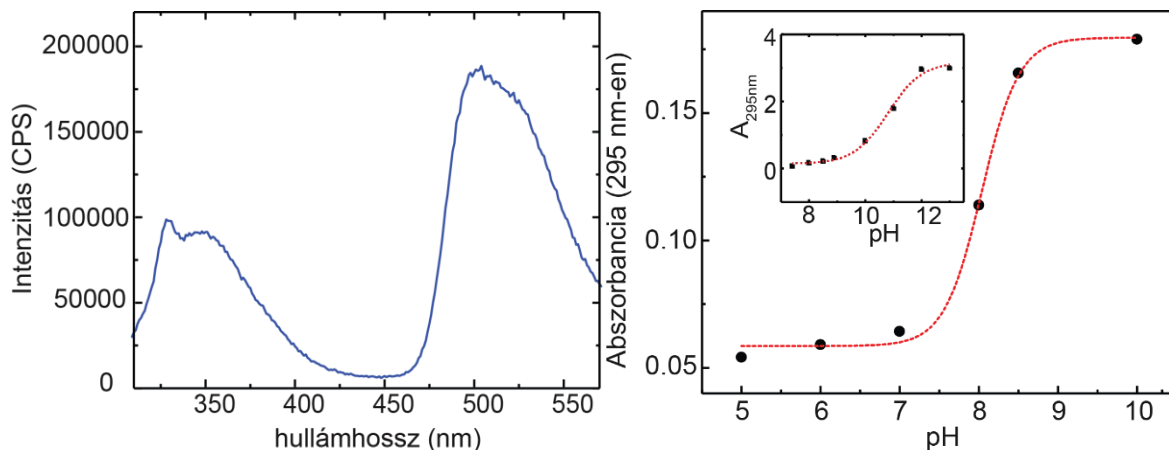
Az esetek jelentős többségében a tirozinát megjelenésére nem kerül sor, mert a tirozin pK értéke olyan magas, hogy nem képződik tirozinát.



5.21 ábra Tirozin és tirozinát szerkezete

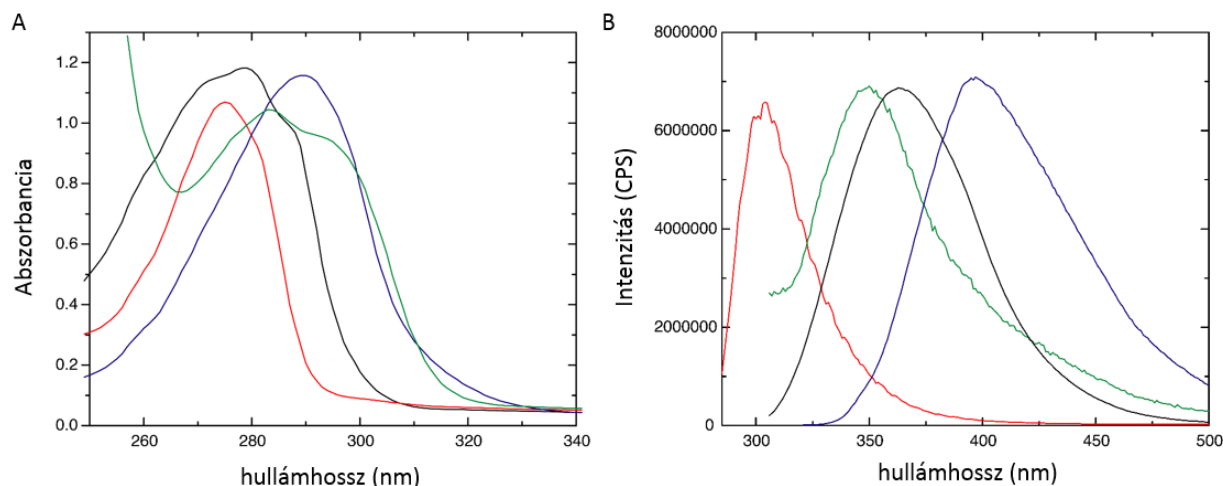
Oldatban ugyanis a tirozin pK értéke 10 körüli, és ez a legtöbb vizsgált fehérje esetében szintén hasonlóan magas, az Appa esetében viszont – ahogyan ezt meghatároztuk – ez az érték 8 körüli. Ilyen módon már nem meglepő, hogy a triptofán mentes W64FW104A mutánsnak jelentős fluoreszcenciája volt 295 nm-es gerjesztés esetén.

Annak érdekében, hogy a tirozinát és triptofán fluoreszcenciáját elválasszuk egymástól olyan triptofán analógot kerestünk, amelynek spektrális tulajdonságai jól elválaszthatóak a természetes triptofánétól.



5.22 ábra A) W64F/W104A AppABLUF ( $\lambda_{\text{gerj.}}=295\text{nm}$ ) emissziós spektruma. A keskeny kitéremkedő csúcs ~330 nm-nél a víz Raman szórásának járuléka. B) A W64F/W104A AppABLUF mutáns 295 nm-en mért tirozinát abszorpciójának pH-függő változása, valamint az oldatban levő L-tirozin azonos hullámhosszon mért abszorpciója (inzer). A szigmoid görbét Boltzman egyenlettel illetve  $\text{pK} = 8.0$ -t kapunk az AppA<sub>BLUF</sub>-ban jelen levő tirozinra, valamint  $\text{pK} = 10.5$ -t az oldatban levő L-tirozinra.

A választásunk a 7-aza-triptofán analógra esett, amely esetében az abszorpciós és emissziós maximum is a magasabb hullámhosszknál volt megfigyelhető (lásd **5.23 ábra**). A W104-es pozícióban található triptofánt tehát egy triptofán auxotróf sejtvonall<sup>118,119</sup> segítségével a 7-azaTrp analógra cseréltük. Ahogyan az 5.23-as ábrán látható a 7-aza-Trp abszorpciója mintegy 10 nm-rel a vörös felé tolódik, abszorpciós maximuma ~ 300 nm-nél található. Emissziós spektruma még jelentősebb vörös eltolódást mutat, oldatban ~ 420 nm körül figyelhető meg az emissziós maximuma. Annak érdekében, hogy a tirozinokat biztosan ne gerjesszük, a donor gerjesztési hullámhosszának 310 nm-t választottunk.



**5.23 ábra** A ábra: L-tirozin (vörös) abszorpciós spektruma, L-Trp (fekete) és 7-aza-trp (kék) 50 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 8.00 pufferben, valamint L-tirozin (zöld) glicin/NaOH pH 11.0 pufferben. B ábra: Emissziós spektrumok: L-tirozin (vörös) (pH=8.0,  $\lambda_{\text{gerj.}}=280$  nm), L-tirozin (zöld) (pH=11.0,  $\lambda_{\text{gerj.}}=295$  nm), L-triptofán (fekete) (pH=8.00,  $\lambda_{\text{gerj.}}=295$  nm) és 7-aza-triptofán (kék) (pH=8.00,  $\lambda_{\text{gerj.}}=310$  nm).

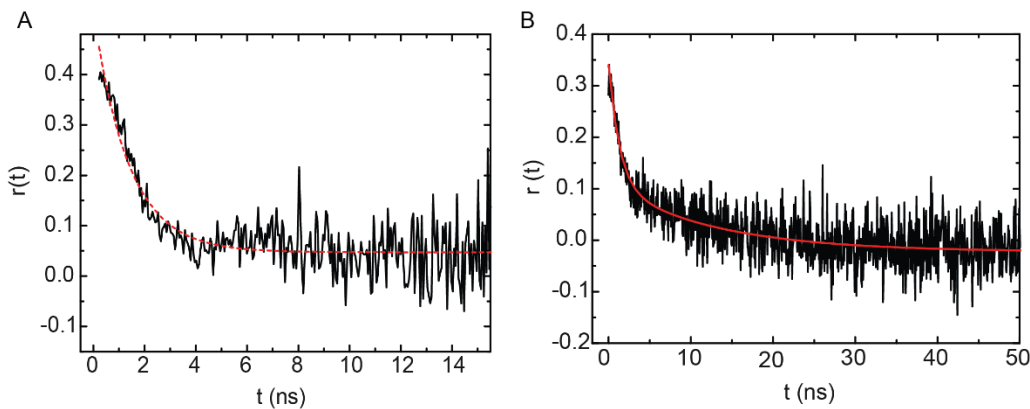
A 7-aza-Trp segítségével sikerült megvalósítani a FRET méréseket annak érdekében, hogy meghatározzuk a W104 -FAD távolságot. A FRET hatásfokot az akceptor fluoreszcenciájának növekedéséből határoztuk meg. A donor oldali FRET hatásfok számításhoz ugyanis szükség lett volna egy csak a donort (7-aza-Trp) tartalmazó mintára, FAD nélkül. A FAD eltávolítása egyrészt nem nagyon egyszerű, másrészt a FAD-nak kulcsszerepe van a fotoaktivációban, hiányában a világos állapot nem valósul meg.

A FRET hatásfok számítását a következő képlet alakpán végeztük el:

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right]$$

ahol  $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})$  az acceptor extinkciós együtthatója a donor gerjesztési hullámhosszán (310 nm),  $\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})$  a donor extinkciós együtthatója ugyanezen a hullámhosszon,  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  és  $I_A(\lambda_A^{em})$  az akceptor fluoreszcencia intenzitása a donor jelenlétében illetve annak hiányában. Az így meghatározott FRET hatásfok  $E_{sötét}=42\%$  and  $E_{világos}=59\%$  volt, amelyből a sötét és a világos állapotban számolt távolság  $R_{sötét}=17.7 \text{ \AA}$  és  $R_{világos}=8.3 \text{ \AA}$  volt.

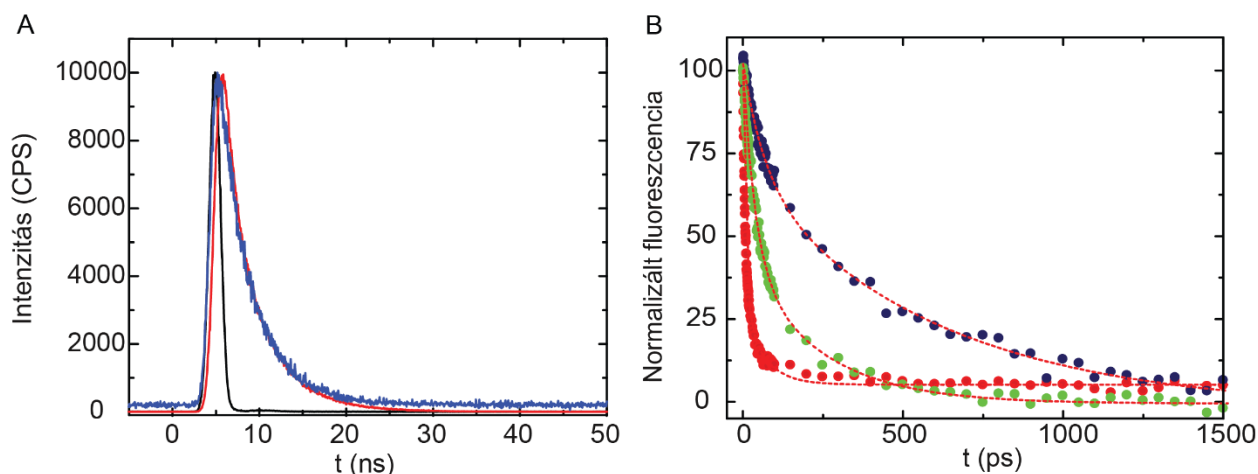
A triptofán analógokat tartalmazó mintákon fluoreszcencia anizotrópia lecsengés méréseket is végeztünk. Ezek során sötét állapotban egy gyorsabb  $\tau_{sötét}=1.5 \pm 0.06 \text{ ns}$  and világos állapotban pedig egy jelentősen lassabb,  $\tau_{világos}=11.1 \pm 0.5 \text{ ns}$  anizotrópia lecsengést sikerült megfigyelnünk. A fluoreszcencia anizotrópia lecsengés eredmények arra utalnak, hogy sötét állapotban a triptofán a FAD-tól távoli orientációban helyezkedik el, mozgása mobilisabb, ennek köszönhető a gyorsabb anizotrópia lecsengés (**5.24 ábra**). (A triptofán anizotrópia lecsengése vizes oldatban  $\sim 0.6 \text{ ns}$ ). Világos állapotban viszont pont az ellenkezője valósul meg: a triptofán a flavinhoz közel helyezkedik el és hidrogén kötésbe kerül – valószínűleg a glutaminnal. Ennek köszönhető a lassabb anizotrópia lecsengés, de ezt támasztja alá a FRET hatásfokból számolt kisebb triptofán-FAD távolság is. Az a tény, hogy a legtöbb kristályszerkezet esetében a triptofán a távoli pozícióban helyezkedik el, arra utal, hogy nem sikerült világos állapotban tartani a kristályt a teljes mérés során.



**5.24 ábra** Fluoreszcencia anizotrópia lecsengés sötét (A) és világos (B) állapotban.

A W104-FAD távolság meghatározása érdekében időkorrelált egy-foton számlálásos (TCSPC) és Kerr-kapuzott fluoreszcencia élettartam méréseket végeztünk több mutánson a pikoszekundumos időtartományon. Alapfeltételezésünk az volt, hogy ha a fotoaktiváció során a W104 triptofán közelebb kerül a FAD-hoz, akkor rövidebb fluoreszcencia élettartamot kell kapnunk, a triptofán ugyanis elektron donorként részt vehet a fotoindukált elektron transzfer folyamatban. A mérések során először a Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> mutánson valamint szabad FMN mintánsat végeztünk TCSPC méréseket. Ahogyan az **5.25 ábrán** látható abban az esetben, amikor a FAD körül a potenciális elektron donor aminosavakat egy fenilalaninnel helyettesítettük (Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub>) a fluoreszcencia élettartam teljesen megegyezett a szabad FMN élettartamával (3.8 ns).

Kerr-kapuzott fluoreszcencia élettartam méréseket végeztünk a W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutánson sötét és világos állapotban, valamint a Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutánson. Ez utóbbi esetben eltávolítottuk a további potenciális elektron donorokat; a W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutáns esetében pedig – az egyszerűség kedvéért – eltávolítottuk a mintegy 10-12 Å-re elhelyezkedő triptofánt, amely szintén potenciális elektron donor. A sötét állapot esetében domináns élettartam 500 ps volt, a világos állapot esetében 11 ps, az Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutáns esetében pedig 36 ps volt.



**5.25 ábra A)** Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> (kék) és szabad FMN (piros) fluoreszcencia lecsengése 455 nm-es gerjesztést követően ( $\lambda_{em}=510$  nm). A válasz függvényt ( $\sim 1$  ns) feketével ábrázoltuk. **B)** Az AppA W64F kinetikája 520 nm-en sötét (kék) és világos állapotban (piros) valamint a Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> (zöld) kinetikája szintén 520 nm-en

A távolság kiszámításához a Dutton-szabályt alkalmaztuk<sup>120</sup>:

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6R - 3.1 \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{\lambda}$$

Akadálymentes elektron transzfert feltételezve  $\Delta G = -\lambda$ , a távolságok sötét állapotban  $R_{sötét} = 9.5 \text{ \AA}$ , világos állapotban pedig  $R_{világos} = 6.7 \text{ \AA}$ . A világos állapot esetén kapott távolság megfelel annak a távolságnak és az anizotrópiai lecsengésből adódó képnek, hogy a 104-es pozícióban található triptofán világos állapotban a FAD-hoz közelebb helyezkedik el. A sötét állapotban kapott különbség (a FRET méréshez képest) valószínűleg annak köszönhető, hogy más elektron donor (Y21, Y56) is részt vesz a folyamatban.

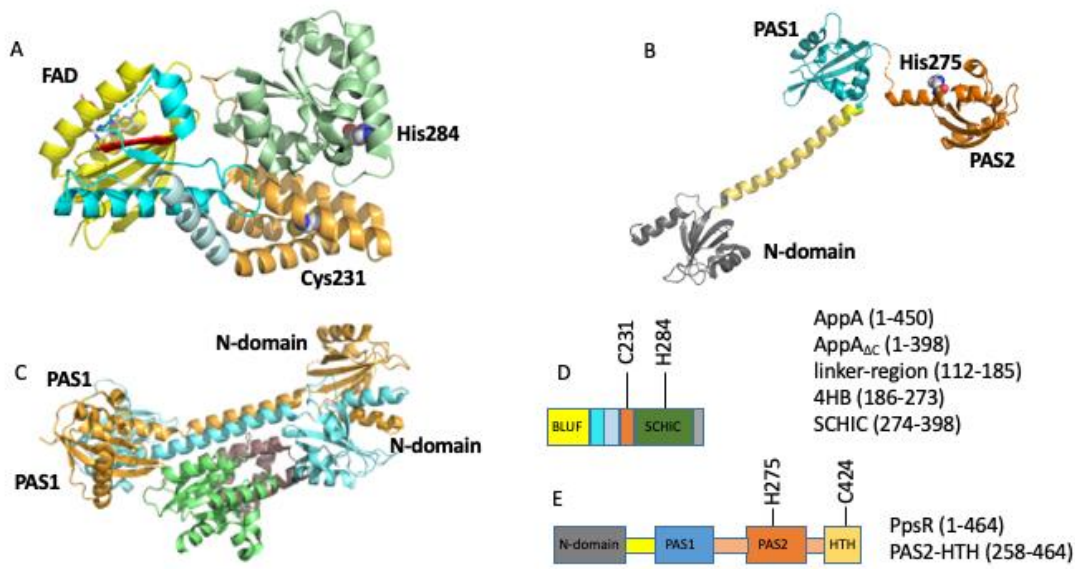
A FRET mérések, az anizotrópia lecsengés mérések valamint a fluoreszcencia élettartam mérések arra utalnak, hogy sötét állapotban a triptofán a FAD-tól távoli pozícióban van, ahol szabadon mozog (ez az oka a gyorsabb anizotrópia lecsengésnek) világos állapotban pedig a flavinhoz közelebb helyezkedik el és valószínűleg hidrogén kötésben van a flavinnal, ezért láthattunk egy lassabb fluoreszcencia anizotrópia lecsengést.

Az általunk megismert és leírt jelenséget a közelmúltban egy másik BLUF domén fehérjében, a következő fejezetben tárgyalt OaPAC esetében sikerült röntgenkristallográfiás módszerekkel igazolni. Chretien és munkatársai az Európai Szinkrotron Központ (ESRF) D23-2 nyalábját használva egyértelműen látták, hogy sötét állapotban a W90 a FAD-tól távoli pozícióban helyezkedik el, a megvilágítására azonban a FAD-hoz közeli pozíciót vesz fel (Chretien et al, bioXriv, 2023).

### 5.1.5 Az AppA szerepe az oxigén szint érzékelésében

Már a felfedezésekor feltételezték, hogy az AppA nem csak a fény esetén tölt be regulációs szerepet, hanem az oxigén szint esetén is és az alap hipotézis (5.1 ábra) az volt, hogy az AppA-PpsR komplex a magas oxigén szint esetében is disszociálódik. A fotoindukált kísérletek mellett az is érdekelt bennünket, hogy ezt a funkciót az AppA milyen módon látja el. Az irodalomban publikált korábbi kísérletek során feltételezhető volt, hogy az oxigén érzékelése hem csoport segítségével valósul meg. Saját tapasztalataink is erre utaltak, előfordult ugyanis, hogy a teljes hosszúságú AppA expressziójakor a fehérjéhez hem is kötődött. Más tanulmányok kimutatták, hogy a hem döntő szerepet játszik a *Rhodobacter sphaeroides* fakultatív fotoheterotróf baktérium jelátviteli mechanizmusában, kölcsönhatásba lép az AppA/PpsR transzkripciós szabályozó komplexszel és kulcs szerepet játszik a fotoszintetikus rendszer működésében. Az AppA/PpsR-ről azt feltételezték, hogy oxigénfüggő transzkripciós reosztátként működik, amely a fotoszintetikus gének átírását a változó oxigénkoncentrációra adott válaszként szabályozza<sup>121</sup>. Magas oxigén szint esetén, valamint alacsony és köztes oxigénszinttel kombinált intenzív fényviszonyok esetén az AppA/PpsR megvédi a sejtet a fotooxidatív károsodástól azáltal, hogy megakadályozza a fotoszintetikus gének expresszióját<sup>98,122-125</sup>.

Az AppA és a PpsR interakcióját az AppA SCHIC (oxygen sensing containing heme instead of cobalamin) régiója szabályozza azáltal, hogy egy inaktív AppA-PpsR<sub>2</sub> komplex jön létre, amely megvilágítás hatására disszociálódik. A szabályozásban fontos szerepet játszik a hem SCHIC doménhez való kötődése. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a hem erősebben kötődik az AppA-hoz a fehérje sötét állapotában, mint világos állapotban. A hem ugyanakkor a PpsR PAS2 és HTH doménjeihez is kötődik, amely konformációs változásokat indít el a fehérjében. Annak ellenére, hogy az AppA, a PpsR és az SCHIC domén röntgenkristallográfiás szerkezete ismert, nincsen szerkezeti információ hem kötött komplexekről. A hem kötés karakterizálása érdekében EPR és FRET méréseket végeztünk, ultragyors tranziens abszorpció segítségével vizsgáltuk az AppA és a PpsR gáz szenzor (CO, NO) képességeit<sup>126</sup>.



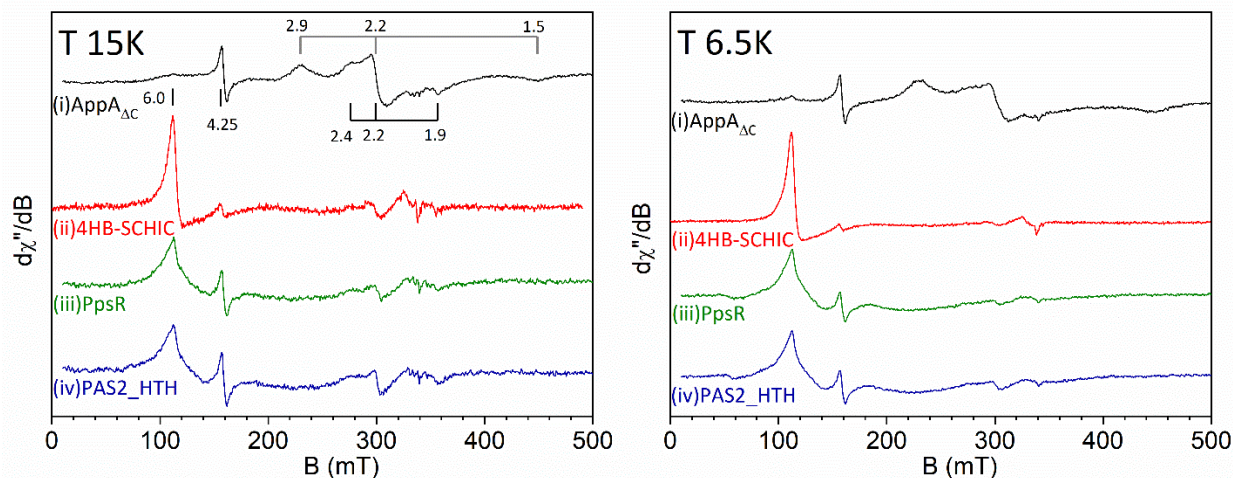
**5. 26 ábra** (A) Az AppA $\Delta$ C (pdb:4hh1) szerkezete, amelyen a BLUF domén (sárga), a linker régió (cián és világos cián), a 4HB domén (világosbarna) és a SCHIC domén (zöld). FAD, His284 és Cys231 látható. A  $\beta$ 5 szál piros színnel látható. (B) A dimer PpsR egyik monomerjének szerkezete a HTH domén nélkül (pdb:4hh2). (C) Az AppA-PpsR2 magkomplex (pdb:4hh3) szerkezete, amely a PpsR N- és PAS1-doménjét (1-es monomer: világoskék és 2-es monomer: világosbarna), valamint az AppA SCHIC-doménjét (zöld) és a 4HB-t (piszkos ibolya) mutatja. (D) Az AppA teljes hosszúságú doménszerkezete, amely mutatja a BLUF (sárga), a linker régiót (cián és világos cián), a 4HB (világosbarna), a SCHIC (zöld) és a Cys-gazdag (szürke) doméneket. (E) A PpsR doménszerkezete, amely az N- (szürke), PAS1- (kék), PAS2- (narancssárga) és HTH (okkersárga) doméneket mutatja.

### EPR mérések

EPR-méréseink során a hemnek az AppA $\Delta$ C-hez (teljes hosszúságú AppA-ból a cisztein gazdag régió lett eltávolítva), valamint a PpsR-hez való kötődését vizsgáltuk.

Az AppA $\Delta$ C-hem komplex 15 K-en mért spektruma két alacsony spinű jelcsoportból áll  $g = (2,9, 2,2, 1,5)$  és  $g = (2,4, 2,2, 1,9)$  értékeknél (**5.27 ábra**, bal oldali panel). A  $g = 6,0$  körüli magas spinű jelek mennyisége elhanyagolható, amint az a magas spinű jeleket erősítő körülmények között ( $T = 6,5$  K, 1 mW) végzett kísérletekből látható (**5.27 ábra**, jobb oldali panel). Ezzel szemben a 4HB-SCHIC domén esetében a spektrumot egy erős jel jellemzi  $g = 6,0$ -nál, amely a lazán kötött, magas spinű ferri állapotú hem-nek tulajdonítható, és egy jóval kisebb intenzitású alacsony spinű jel  $g = (2,4, 2,2, 1,9)$  mellett.





**5.27 ábra** Az (i) AppA $\Delta$ C-hem komplex, (ii) 4HB-SCHIC-hemin komplex, (iii) PpsR-hemin komplex és (iv) PAS2-HTH-hemin komplex EPR spektrumai 15 K (bal oldali panel) és 6,5 K (jobb oldali panel) hőmérsékleten. A  $g=4,3$ -nál lévő jel a rombuszos vasszennyeződésnek köszönhető, kisebb Mn(II)-szennyeződés (6 vonalas jel  $g=2,00$ -nál) is látható. [hem]=100  $\mu$ M.

Korábbi cikkek az AppA SCHIC-doménben a His284 aminosavat javasolták a hem kötéshez szükséges axiális ligandumként<sup>127</sup>. A Cys231 (**5.26 ábra**) az egyetlen cisztein aminosav, amely a 4HB-SCHIC domén hélixén jelen van, ami arra utal, hogy mindkét fehérjében a His284/Cys231 ligáció valósul meg a ferri állapot esetében. Az EPR mérések során a 4HB-SCHIC doménhez és az AppA $\Delta$ C-hez való hem-kötési konfigurációban megfigyelt különbségek azonban arra utalnak, hogy a BLUF domén módosíthatja a 4HB-SCHIC domén konformációját, befolyásolva a hem vas koordinációját, összhangban a két domén közötti javasolt gyenge kölcsönhatással. A bis-His-komplexet alkotó His-aminosavak azonosságát nehéz meghatározni. Tekintettel azonban az AppA $\Delta$ C-komplexben a hem transzfer egyetlen  $k_{off}$ -értékére, feltételezzük, hogy ez csak akkor lehetséges, ha a két populáció (His/Cys-hez kötött hem és His/Hishez kötött hem) közötti csere sokkal gyorsabban történik, mint a hem-diszociáció. Feltételezzük, hogy ez a csere akkor történhet gyorsan, ha a His284 a közös ligandum a két populáció között, és a második His ligandum közel van a His284-hez, ami a His308 esetében így van (5.24 B ábra). Ráadásul mind a His284, mind a His308 rugalmas hurokban van jelen (5.26 D-E ábra).



A PpsR és a PAS2-HTH/hemin komplexeket a Cys/His vagy Cys/OH- ligációnak köszönhető alacsony spin-jelek jellemzik  $g = (2,4, 2,2, 1,9)$  (3. ábra) és egy hemin-kötött magas spinű populáció jelenléte ( $g = 6,0$ ) (5.17 B ábra). Ezek az eredmények a HTH-doménben lévő Cys424 aminosavat a hem axiális ligandumaként azonosítják oxidáló körülmények között, ahogyan azt korábban optikai spektroszkópia és mutációk<sup>128</sup> alapján javasolták. Redukáló körülmények között mind a His275 (a PAS2 doménben jelenlévő) (5.18 C ábra), mind a Cys424-et axiális ligandumként javasolták<sup>128</sup>.

### *FRET mérések*

Annak érdekében, hogy a hem pozícióját megállapítsuk FRET méréseket végeztünk, kihasználva azt, hogy a hem-kötésért felelős hisztidinhez közel, az AppA hem-kötő doménjában található egy triptofán (W302), a W302-H284 távolság a szerkezet alapján  $\sim 25$  Å. A PpsR pedig szintén tartalmaz egy triptofánt a PAS2 doménben, amely a hem-kötésért felelős; ebben az esetben a W361-H275 távolság  $\sim 23$  Å. Mivel a triptofán emissziós spektruma és a hem abszorpciós spektruma átfed, jelentős FRET figyelhető meg. Az így kapott távolságok  $\sim 30$  Å az AppA,  $\sim 19$  Å pedig a PpsR PAS2 domén esetében, jól egyeznek a szerkezetből kapott értékekkel; az eltérés abból fakad, hogy a szerkezetből számolt értékek esetében a triptofán-hisztidin távolság határozható meg és nem közvetlenül a triptofán-hem távolság.

### *A CO-kötés dinamikája AppA és PpsR esetében*

Mind az AppA, mind a PpsR hem -komplexek esetén beszámoltak arról, hogy gáz molekulákat, például szén-monoxidot vagy nitrogén-monoxidot kötnek<sup>121,127</sup>. Kísérleteink során az AppA és a PpsR-nek ezt a tulajdonságát is vizsgáltuk. A hem-CO kötés a megvilágítás hatására felhasad, és a CO kiszabadulhat a hem zsebből (végül a fehérjéből), de vissza is kötődhet. A CO visszakötődésének ezt a dinamikus viselkedését ultragyors transziens abszorpciós spektroszkópiával vizsgáltuk.

Az **5.28 ábra** (i., ii. és iii. kis ábrák) az AppA<sub>ΔC</sub> transziens abszorpciós spektrumát mutatja a Soret-sáv tartományban, a fehérje sötét és világos állapotában, redukált vagy oxidált flavin

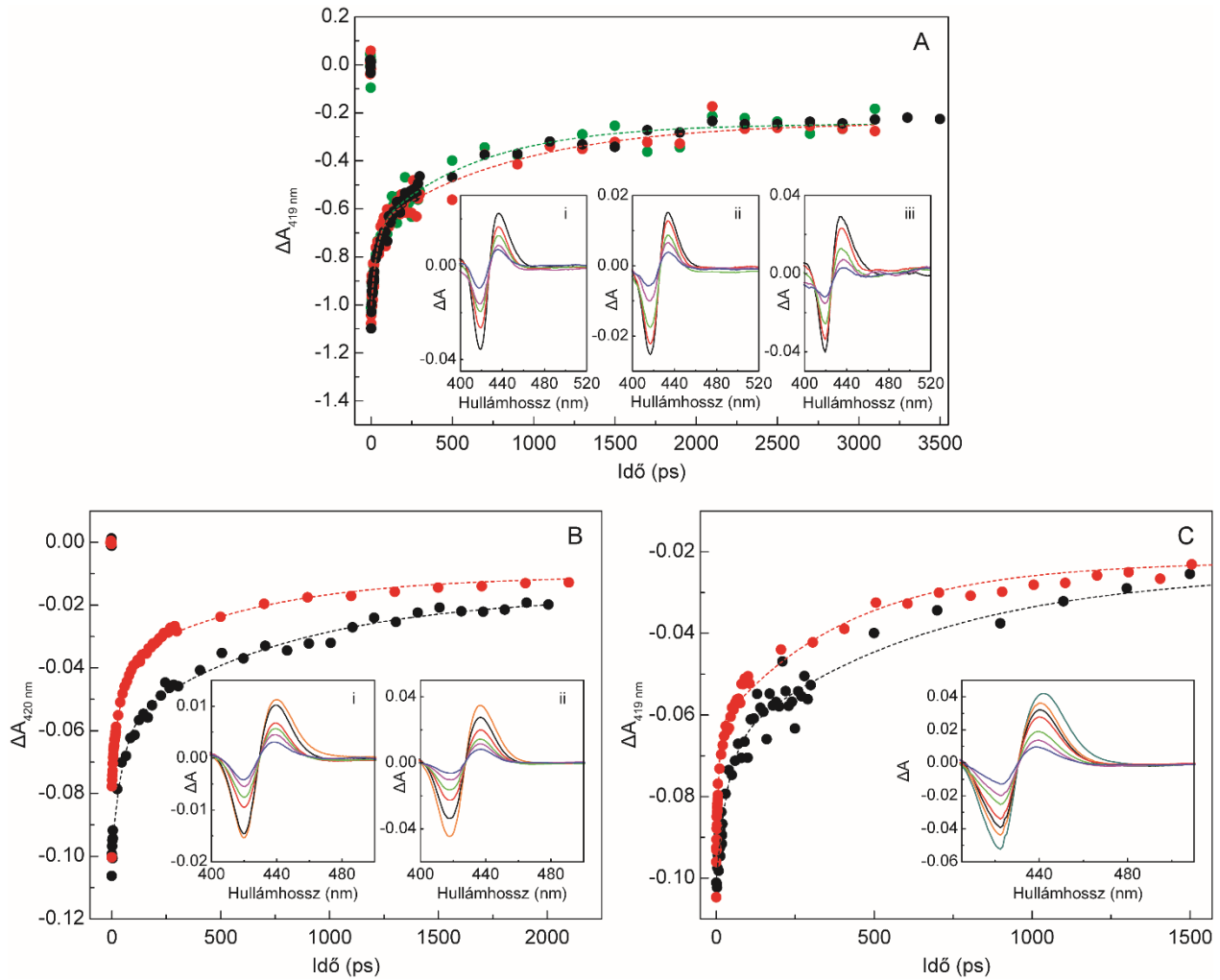
jelenlétében. Az AppA<sub>ΔC</sub> fehérje esetében mindhárom esetben a hem-CO visszakötődés kinetikája két fázissal írható le, melyek időállandói ~40 ps (30%), ~700 ps (40%) és az aszimptotikus fázis (30%). Egyértelműen úgy tűnik, hogy a flavin oxidációs állapota vagy a különböző fényviszonyok nem befolyásolják a fehérje SCHIC-doménjében a hemhez való CO-visszakötődés dinamikáját (5.28 B. ábra).

Hasonló, de nem azonos kinetikát figyeltünk meg az izolált 4HB-SCHIC fehérje esetében, amelyet két kötődési fázis jellemez ~50 ps (30%), ~900 ps (40%) és az aszimptotikus fázis (30%). Az a megfigyelés, hogy a 4HB-SCHIC doménben a CO újrakötési dinamikája hasonló a teljes hosszúságú fehérje dinamikájához, összhangban van azzal a megállapítással, hogy a teljes hosszúságú fehérjében a BLUF domén redox- vagy fényviszonyai nem befolyásolják a ligandumkötési dinamikát a hem-kötő doménben.

A ligandumkötés dinamikáját a hem-kötő doménben szintén nem befolyásolja jelentősen a BLUF-domén hiánya vagy jelenléte. Mind a BLUF, mind a SCHIC doménről kimutatták, hogy a linker régiót és a 4HB-t "kötőplatformként" használják, anélkül, hogy erős kölcsönhatások lennének a határfelületükön<sup>129</sup>.

Az 5.28 C. ábra kis ábrái a PpsR és a PAS2-HTH tranziens abszorpciós spektrumát mutatják a Soret-sáv tartományban a CO-disszociációt követő különböző késleltetési idők esetén pikoszekundumos és nanoszekundumos időtartományában. Az tranziens spektrumok, amelyek minimuma 420 nm körül van, maximuma pedig 440 nm körül, az 5 koordinátájú hemnek a CO-disszociáció során történő kialakulását tükrözik. A CO disszociációját követően a hem zsebben található CO vagy újra kötődhet a hemhez (geminát újrakötődés), vagy kivándorolhat a fehérjéből. A CO részben a pikoszekundumos-nanoszekundumos időskálán rekombinálódik, amit a tranziens spektrumok amplitúdójának csökkenése jelez. A spektrumok alakja azonban ezen az időskálán változatlan marad, ami arra utal, hogy csak a CO hemhez való visszakötődése valósul meg, egy hat koordinátájú komplex kialakulása viszont nem.

Az összes PpsR-komplex kinetikáját egy néhány pikoszekundumos fázis jellemzi, amely főként fotofizikai folyamatokat tükröz, amelyet egy többfázisú CO visszakötődés követ. A PpsR esetében az utóbbi folyamat 100 ps (41%) és 1,4 ns (48%) időállandóval és egy aszimptotikus fázissal (11%) illeszthető (5.28 C. ábra, i. alábra). A PAS2-HTH-ban szintén megfigyelhető volt egy többfázisú visszakötődés 46ps (37%) és 660ps (48%) időállandóval és egy aszimptotikus fázissal (15%) (5.28 C. ábra, ii. betét).

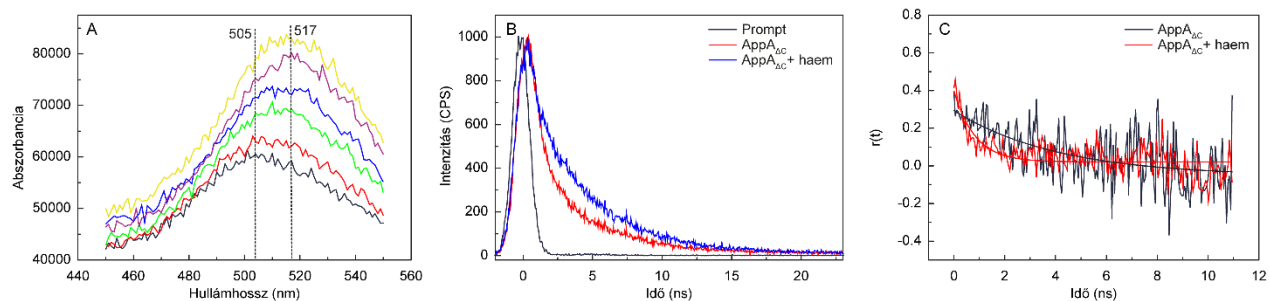


**5.28 ábra (A)** A flavin-oxidált AppAΔC heme-CO-komplexeinek 419 nm-en megfigyelt tranzienseinek összehasonlítása a sötét (fekete) és a világos (zöld) állapotban, valamint a flavin-redukált AppAΔC heme-CO-komplexeinek összehasonlítása (piros). i) az oxidált AppAΔC heme-CO komplexének átmeneti abszorpciós spektrumai a sötéthez állapotban a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (2,3, 50, 200, 500 és 1700 ps). ii) az oxidált AppAΔC heme-CO komplexének átmeneti abszorpciós spektrumai a világos állapotban a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (2, 15, 100, 500, 500, 2300 ps). iii) a redukált AppAΔC heme-CO komplexének átmeneti abszorpciós spektrumai a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (3, 30, 200, 1300 és 3100 ps). **(B)** Az oxidált AppAΔC heme-CO-komplexein a fényhez (fekete) adaptált állapotokban és a 4HB-SCHIC fehérje heme-CO-komplexén (piros) 419 nm-en megfigyelt tranziensek összehasonlítása. Kis kép: A 4HB-SCHIC fehérje heme-CO komplexének átmeneti abszorpciós spektrumai a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (5, 21, 46, 106, 406, 806, 1906 ps). **(C)** A hem-CO-PpsR (fekete) és a hem-CO-PAS2-HTH komplex (piros) esetében a CO ligandum fotodiszociációja után megfigyelt átmeneti abszorpciós összehasonlítása 420 nm-en. i). A hem-CO-PpsR komplex tranziens abszorpciós spektrumai a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (1,3, 6, 106, 226, 506 és 1106 ps). ii). A hem-CO-PAS2-HTH komplex átmeneti abszorpciós spektrumai a CO ligandum fotodiszociációját követő különböző késleltetési időkben (1,2, 20, 100, 300, 900 és 2500 ps).

A rövid hosszúságú PAS2-HTH fehérje esetében tehát lényegesen gyorsabb kinetikát figyeltünk meg, ami arra utal, hogy az N-terminális és a PAS1 domén hatással van a hem-környezetre, amennyiben olyan terhelést gyakorolnak a hem-kötő zsebre, hogy az nyitottabbá válik. Érdekes módon, minőségileg hasonló hatásokat figyelték meg, amikor a teljes hosszúságú CO-szenzor RcoM<sup>-</sup> 2-t és annak izolált hem-doménjét hasonlították össze (lassabb újrakötődés a teljes hosszúságú fehérjében) <sup>130</sup>. A PpsR és a PAS2-HTH ligand-rekombinációs kinetikájának összehasonlítása az 5.28 C. ábrán látható.

*A hem az AppA<sub>ΔC</sub> 4HB-SCHIC doménjéhez való kötődése konformációs változásokat indukál a BLUF doménben*

Mivel a kék fény besugárzása a flavin körüli hidrogénkötés-hálózat átrendeződését eredményezi, fontos tudni, hogy fordítva, a C-terminális doménben történő hem kötésnek van-e hatása a flavin környezetére is. Ennek érdekében fluoreszcencia spektroszkópiai méréseket végeztünk. Az AppA<sub>ΔC</sub>-hez való hem kötődés a sötét állapotban a flavin fluoreszcencia emissziós maximumának 505 nm-ről 517 nm-re történő növekedését és vörös eltolódását eredményezi (**5. 27 A. ábra**), ami arra utal, hogy a hemhez kötés a flavin környezetében olyan változást hoz létre, amelynek következtében a FAD az oldószernek jobban kitett állapotban található. Erre utalnak a TCSPC mérések is: a hem AppA<sub>ΔC</sub>-hez való kötődése a flavin átlagos fluoreszcencia-életidejének jelentős növekedését eredményezte, ~2 ns-ről (hemmentes AppA<sub>ΔC</sub>) 4,4 ns-ra (hem-kötött AppA<sub>ΔC</sub>). Ez utóbbi érték ugyanabban a tartományban van, mint a flavin oldatban mért fluoreszcencia-élettartama (~3-5ns) és arra utal, hogy a flavin fluoreszcenciáját a hem-kötött AppA<sub>ΔC</sub>-ben a szomszédos aminosavak nem oltják ki, hanem a flavin ki van téve az oldószernek.



**5.29 ábra** (A) Az AppA<sub>ΔC</sub> fluoreszcencia-emissziós maximumának eltolódása növekvő hemkoncentráció esetén, sötét állapotban. (B) Az AppA<sub>ΔC</sub> fluoreszcencia élettartama hem hiányában (piros) és jelenlétében (kék) 455 nm-es gerjesztés után ( $\lambda_{em} = 520$  nm). A műszer válaszfüggvénye (~1 ns) feketével látható. (C) Az AppA<sub>ΔC</sub> fluoreszcencia-anizotrópiájának csökkenése hem hiányában (fekete) és hem jelenlétében (piros).

A fluoreszcencia-élettartam mérésekkel összhangban a flavin rotációs korrelációs ideje a sötét állapotú AppA<sub>ΔC</sub>-ben hem jelenlétében drámaian csökken,  $\tau = 0,8 \pm 0,1$  ns, szemben a hem hiányában mért  $\tau = 4,1 \pm 1,4$  ns értékkel (**5. 29 C ábra**). A gyors rotációs korrelációs idők (~1 ns) a fluorofór gyors mozgására utalnak, ezzel szemben a hosszabb korrelációs idők (akár több tíz ns) a fluorofór vagy a teljes fehérjekomplex lassabb forgását tükrözik<sup>116</sup>. Összességében tehát a fenti fluoreszcencia-mérések arra utalnak, hogy a sötét állapotban a flavin flexibilis környezetben van jelen.

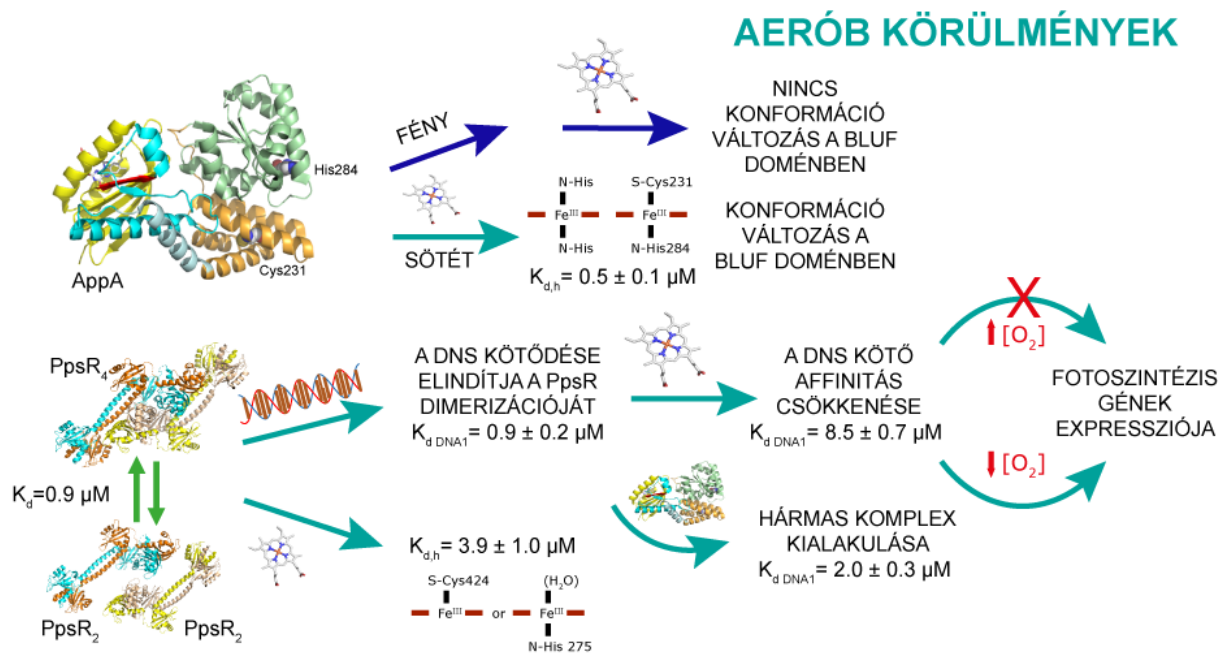
A kristályszerkezet alapján a BLUF és SCHIC domének közötti gyenge kölcsönhatást feltételezték. Saját méréseink arra utalnak, hogy sötéthez állapotban a hem kötődés hatással van a flavin környezetre, amit a fehérje fluoreszcens tulajdonságainak megváltozása jelez. További érdekesség, hogy a hem csoportot kötő AppA fotociklusa jelentősen csökken (felezési idő ~4 perc) a hem nélküli AppA-hoz képest (felezési idő ~15 perc). Ezek az eredmények világosan illusztrálják az AppA két doménje közötti gyenge összekapcsolódást. Ezzel szemben világos állapotban a flavin környezete olyan, hogy a 4HB-SCHIC domén hem kötése nem okoz további strukturális változásokat.

#### *Az AppA/PpsR komplex oxigén érzékelése*

Az AppA/PpsR komplex oxigén érzékelésében a főszereplő a PpsR, amely a PAS doménből és a HTH effektor doménből áll, amely a DNS-t köti. Méréseink alapján arra következtetünk, hogy magas oxigén szint esetén a hem által kötött vas ferri állapotban van és gyengén koordinálódik a PpsR-hez, részben a Cys<sup>274</sup>-en keresztül (amely a HTH doménben található), részben pedig a His<sup>275</sup>-en keresztül. A DNS kötés affinitása akkora, hogy az nem disszociálódik, így nem valósul meg a fotoszintetikus gének szintézise, vagyis megóvja a fotoszintetikus rendszert az oxidatív stressztől. Alacsony oxigén szint esetén a vas a Fe(II) oxidációs állapotban kevésbé vagy egyáltalán nem kötődik a Cys<sup>424</sup>-hez, ami jelentős konformációs változást indukál a fehérjében. Ez a konformációs változás vezet végül ahhoz, hogy a DNS PpsR-hez való kötése megváltozik és disszociálódik a fehérjéről, lehetővé téve fotoszintetikus gének expresszióját.

Meglepő módon – ahogyan ezt kísérleteink igazolták – a hem nemcsak a PpsR-rel, hanem az AppA-val is képes kölcsönhatásba lépni. Ez a kölcsönhatás valószínűleg egy újabb szabályozási

szintet biztosít a fotoszintetikus rendszer számára. A hem AppA-ban betöltött szerepe azonban továbbra sem egyértelmű. Korábbi tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy az AppA-PpsR szabályozó rendszer oxigénfüggő transzkripció reosztátként működik. Kimutatták, hogy az oxigén koncentrációfüggő módon képes disszociálni a hemet az AppA-ból<sup>121</sup>. Későbbi vizsgálatok azonban kimutatták, hogy az AppA mind anaerob, mind aerob körülmények között képes a hemet megkötni. Tekintettel arra, hogy csak a sötét állapotban lévő AppA képes kötődni a PpsR-hez a hem megkötése kedvez az AppA-PpsR komplex kialakulásának, és így elősegíti a fotoszintetikus gének bioszintézisét. Így biztosított, hogy elegendő mennyiségű hem álljon rendelkezésre az elektronátvitel alapvető funkciójának ellátásához<sup>127</sup>. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy kék fény megvilágítás esetén – az oxigénszinttől függetlenül – a hem-kötött AppA elősegíti az AppA-PpsR komplex kialakulását és ezáltal a fotoszintetikus apparátus bioszintézisét. Ezzel szemben magas oxigénszint és nagy intenzitású kék fény egyidejű jelenlétében a PpsR a DNS-hez kötődve marad, és gátolja a fotoszintetikus apparátus kialakulását és a kapcsolódó fotooxidatív károsodást.



**5.30 ábra** A hem AppA és PpsR kölcsönhatásának sematikus ábrája *Rhodobacter sphaeroides*-ben. Sötétben és aerob körülmények között a heme kölcsönhatásba lép az AppA-val és konformációs változásokat idéz elő a BLUF doménben. Ezzel szemben világos körülmények között a hem megkötése miatt a SCHIC-doménben bekövetkező változások nem befolyásolják a BLUF-domént. A PpsR-hez kötődő hem csökkenti a PpsR DNS-kötési affinitását, de magas oxigénkoncentráció mellett gátolja a fotoszintetikus gének génexpresszióját. Alacsonyabb oxigénkoncentráció esetén a ferro hem kötődése várhatóan olyan konformációs változásokat eredményez, amelynek következtében a a DNS disszociálódik elősegítve a fotoszintetikus gének bioszintézisét.

## 5.2 Az OaPAC funkcionális dinamikájának vizsgálata<sup>5</sup>

### 5.2.1 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 (**5.31 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.

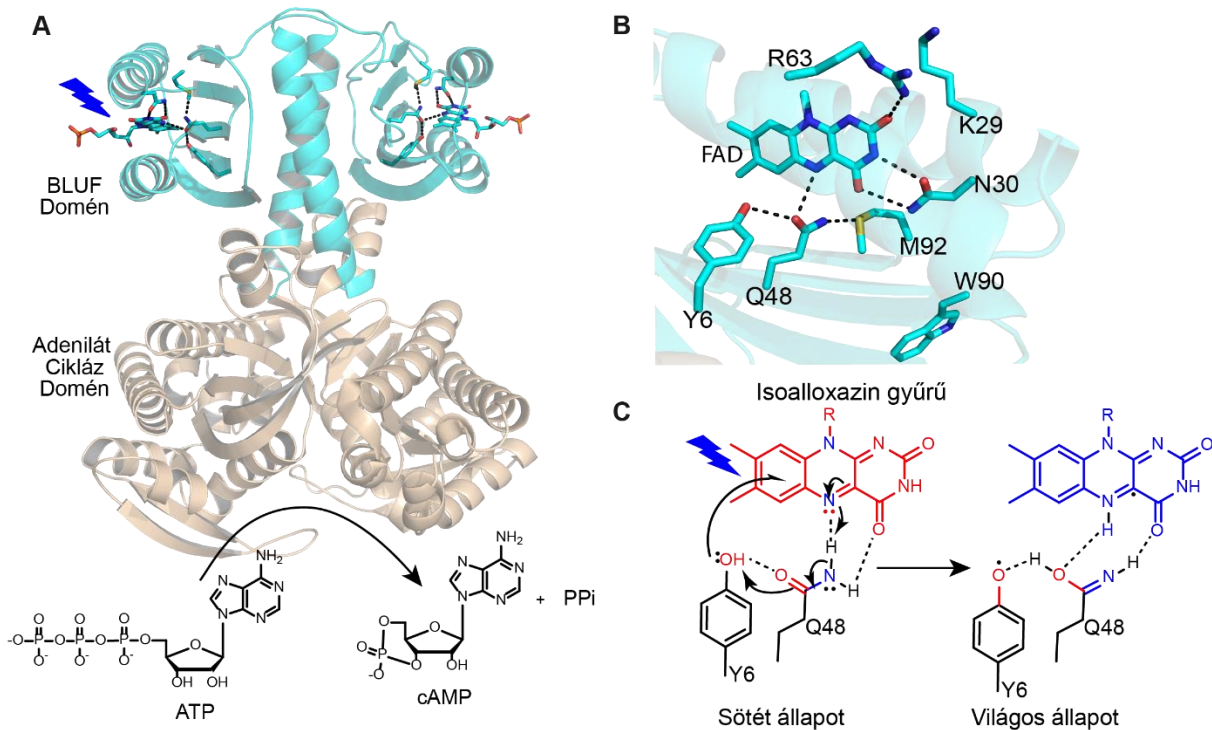
A kék fény által aktivált adenilát ciklázok működése általában egy BLUF vagy ritkábban egy LOV domén segítségével valósul meg. Az első ismert PAC az *Euglena gracilis* nevű csillós ostoros egysejtűből lett izolálva, és ennek megfelelően EuPAC-nak lett elnevezve. Az EuPAC egy 400 kDa méretű heterotetramer, amely két-két  $\alpha$  és  $\beta$  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 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 kontrollja<sup>131</sup>. A bPAC-ot a közelmúltban transzgenikus egerekben alkalmazták motilitásukat veszített spermiumok flagelláris mozgásának helyreállítására<sup>132</sup>.

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 szabályozását<sup>133</sup>. 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. 31 A. ábra), egy 366 aminosavból álló homodimer, amely egy N-terminális BLUF doménből és egy C-terminális AC doménből áll <sup>133,134</sup>.

<sup>5</sup> A fejezet a Collado et al., *ACS Chem Biology*,2022, a Raics et al., *J. Biol. Chem.*,2023 és a Collado, Bodis et al., *J. Mol. Biol*, 2023 cikkekben megjelent eredményeinket foglalja össze.





**5.31 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: 5x4t<sup>134</sup>). 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<sub>kinn</sub> 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 $\gamma$ -C $\delta$  kötése körülbelül 40°-kal elfordul, míg a Q48 N $\epsilon$ 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).

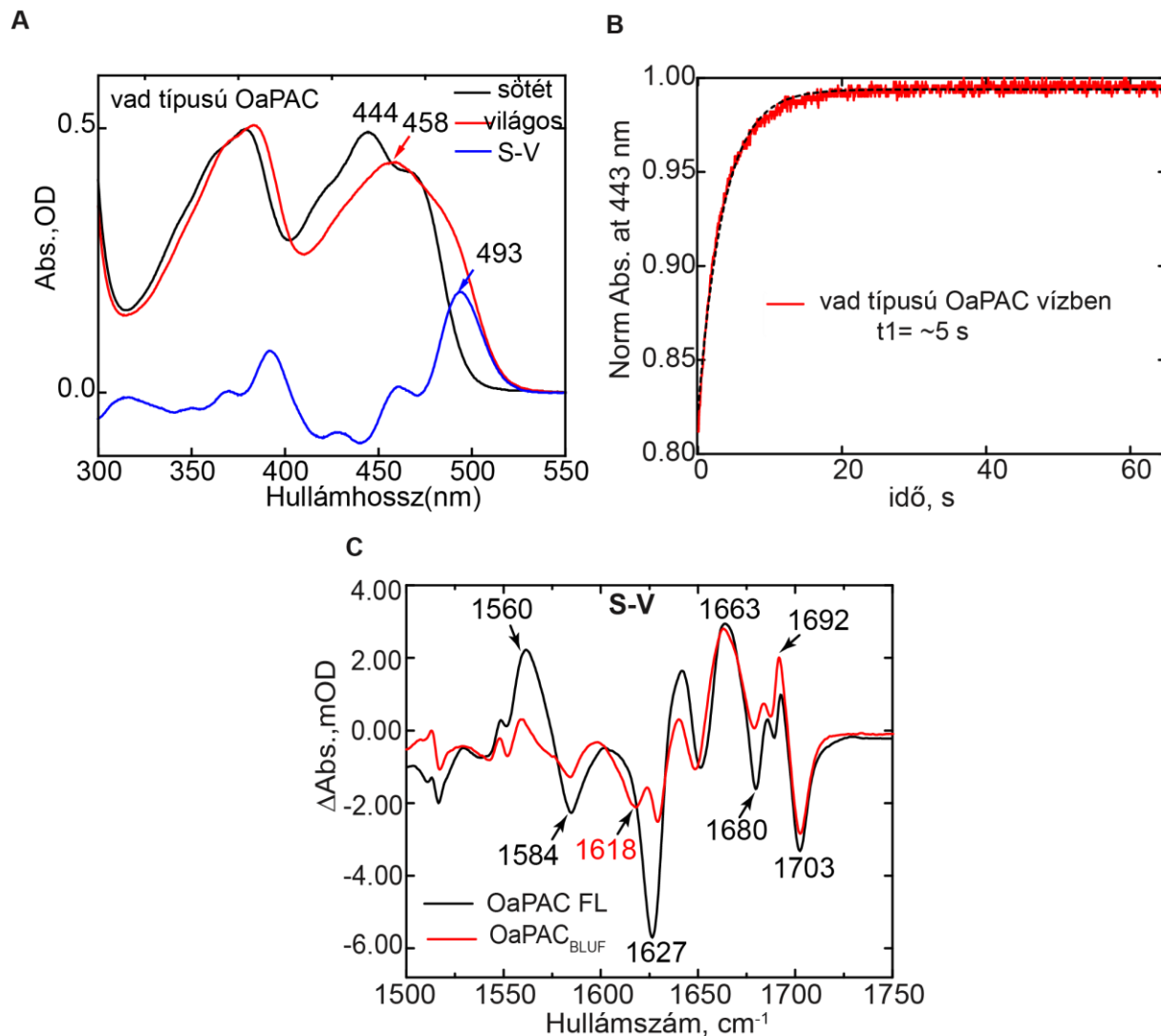


Ohki és munkatársai<sup>134</sup> egy olyan mechanizmust javasoltak, amely magában foglalja a Q48 oldallánc tautomerizációját, valamint a Q48 keto forma és az Y6 közötti hidrogénkötési kölcsönhatást (5.31 C. ábra). Ez a mechanizmus megköveteli az FADH• és Y6• gyökpár létrejöttét, amely becslésük szerint 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 fotoaktiváció vizsgálata UV/VIS és FTIR spektroszkópia segítségével*

Az **5. 32 A. ábrán** a vad típusú OaPAC abszorpciós spektruma látható a 450 nm-es kék fényű LED-del való (~500  $\mu$ W 455 ( $\pm$ 10) nm-es fény, 20 s-os megvilágítás) megvilágítás előtt és után. A megvilágítás hatására a flavin abszorpciós spektrumában mintegy 14 nm-es vöröseltolódás figyelhető meg. Ahogyan ezt korábban tárgyaltam, ugyanez a jelenséget figyelhettük meg az AppA esetében (valamint az összes fotoaktív BLUF fehérjénél), és a flavin körüli hidrogénkötés-rendszer átalakulásának köszönhető. Az abszorpciós különbségi spektrum (5. 32A. ábra, kék spektrum) 493 nm-en mutat abszorbancia maximumot, amely a világos állapot kialakulásához köthető. A megvilágítás megszűnése után az abszorpciós spektrum visszanyeri a megvilágítás előtti alakját, mintegy 5 s időállandóval (5.32 B. ábra). Az OaPAC sötét állapotba való visszatérése jelentősen gyorsabb, mint a többi BLUF fehérje esetében, beleértve a PixD-t (45 s), az AppABLUF-ot (23 perc) és a BlsA-t (8 perc).<sup>135,136</sup>



**5. 32 ábra OaPAC UV/VIS valamint FTIR spektruma** A. Az OaPAC steady-state abszorpciós spektruma sötét és világos állapotában, valamint a különbségi (világos-sötét) spektrum B. A 444 nm-es csúcs sötét állapotba való visszatérése A megfigyelt időállandó ~5 s. C. A teljes hosszúságú és a BLUF domén FTIR különbségi spektruma. (A különbségi spektrum felvételéhez 1 mM koncentrációjú fehérjét használtunk, majd a világos állapotban mért spektrumból levontuk a sötét állapotban mért spektrumot.

A világos állapot kialakulását kísérő szerkezeti változásokat először steady-state FTIR spektroszkópiával tanulmányoztuk. Az OaPAC különbségi spektrumát úgy állítottuk elő, hogy a sötét állapotú FTIR spektrumot kivontuk abból, amit kaptunk, miközben a mintát a mintarekeszbe helyezett 460 ( $\pm 5$ ) nm-es LED-del folyamatosan megvilágítottuk, és objektív segítségével a cellára fókuszáltuk. Az 5.33 C. ábrán világos – sötét infravörös különbségi spektrum látható az 1800-1100  $\text{cm}^{-1}$  közötti tartományban, ahol a pozitív csúcsok a fény által indukált, a negatív csúcsok pedig az alapállapotú rezgési módusokhoz tartoznak. Magasabb hullámszámoknál a vad típusú OaPAC

különbségi spektruma hasonló a többi BLUF fehérje esetében megfigyelthez, ahol két kiemelkedő sáv 1692(+)/1703(-)  $\text{cm}^{-1}$ -nél a C4=O karbonil módus eltolódását jelzi: világos állapotban a C4=O karbonil több hidrogénkötést alkot, így ez a módus az alacsonyabb frekvenciák felé tolódik<sup>21,102</sup>. Az 1550-1650  $\text{cm}^{-1}$  régióban az alacsonyabb hullámszámú módusok a peptid lánc gerincének, különösen a jelátvitel szempontjából fontos  $\beta 5$  rezgéseinek változásait jellemzi.

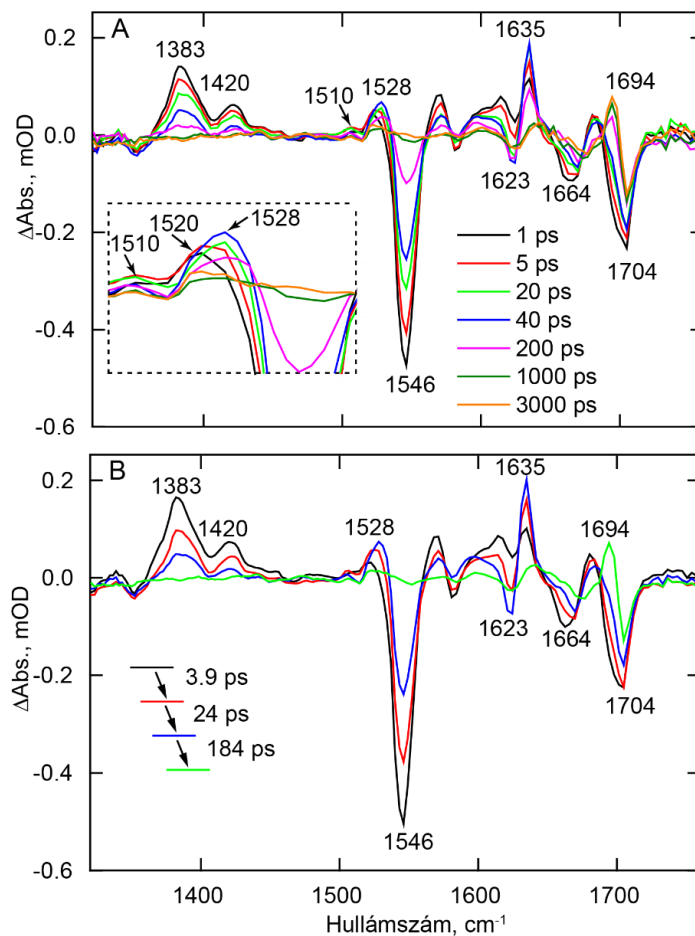
A teljes hosszúságú fehérje mellett megmértük az AC domént nem tartalmazó OaPAC BLUF domén (1-141 aminosav; OaPAC<sub>BLUF</sub>) FTIR különbségi spektrumát is. Amint az 5.32 C. ábrán látható az OaPAC<sub>BLUF</sub> esetében az 1550 és 1650  $\text{cm}^{-1}$  közötti tartományban – különösen 1627  $\text{cm}^{-1}$ -nél – a módusok kevésbé intenzívek, ami arra utal, hogy a BLUF domén kevésbé érzékeny a fehérjelánc fényindukált strukturális változásaira. Hasonló megfigyelésről számoltak be a ciklikus-di-GMP foszfodiészteráz YcgF/Blrp teljes hosszúságú fehérjében és BLUF doménjében bekövetkezett, fényindukált szerkezeti változások összehasonlításakor<sup>137</sup>. Hasonló vizsgálatot végeztek a teljes hosszúságú bPAC és bPAC<sub>BLUF</sub> esetében is. A teljes hosszúságú bPAC esetében a különbségi spektrumban intenzív pozitív csúcsot figyeltek meg az  $\alpha$ -hélix amid I rezgésére jellemző frekvenciatartományban, 1650  $\text{cm}^{-1}$  körül, ami arra utal, hogy a fotoaktivációt követően a cikláz doménben helikális struktúrák alakulnak ki. A vad típusú OaPAC FTIR különbségi spektrumában nem figyeltünk meg hasonló pozitív csúcsot az 1650  $\text{cm}^{-1}$  régióban, ami arra utal, hogy a vad típusú OaPAC fényindukált szerkezeti változásai eltérhetnek a bPAC-ban megfigyelttől. Ez nem teljesen váratlan, mivel a bPAC C-terminális régiója rövidebb, mint az OaPAC; érdekes módon a rövidebb C-terminális régió a bPAC-ban hatékonyabb cAMP-termelést eredményez az OaPAC-hoz képest<sup>138</sup>.

### *Tranziens infravörös abszorpció mérések*

Az **5.33 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.

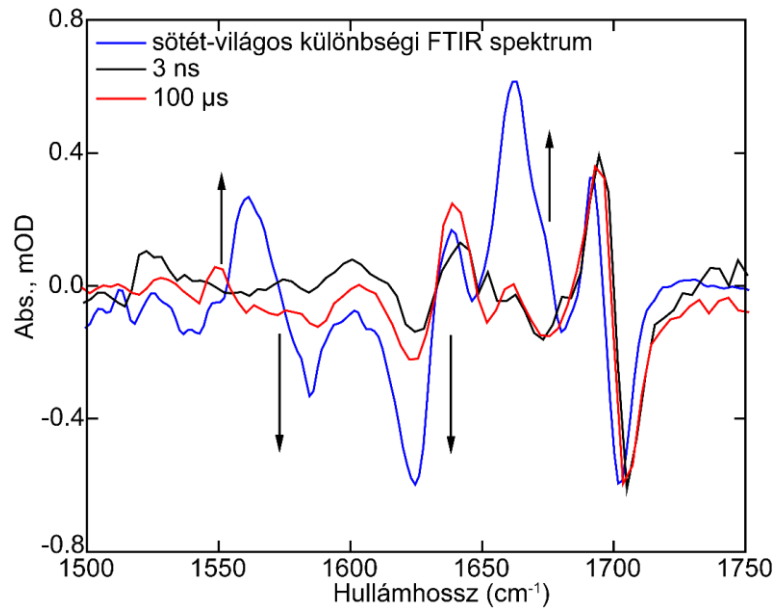
A vad típusú OaPAC TRIR-spektrumai hasonlóak az AppA és a PixD esetében megfigyelt BLUF domén infravörös spektrumokhoz<sup>100,103,108,111</sup>. Az 5.33 B. ábrán a globális illesztés eredményeként

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<sup>-1</sup>-nél tranziens csúcsok, valamint az alapállapotot jellemző bleachek (~1546, ~1664 és ~1704 cm<sup>-1</sup>-nél) jellemzik, amelyek az izoalloxazin gyűrű C10a-N1, C2=O és C4=O rezgési módusainak felelnek meg (lásd 5.1 Táblázat).<sup>40,103</sup> Szintén az első EADS spektrumban 1520 cm<sup>-1</sup>-nél egy tranziens csúcs figyelhető meg, ami azt jelzi, hogy a FAD<sup>•-</sup> intermedier a gerjesztés után nagyon korai időpontokban jön létre (5. 31 A. ábra, kis ábra)<sup>40,48</sup>. A második EADS 3,9 ps időállandóval jön létre, és ezt a spektrumot egy új tranziens megjelenése jellemzi ~1528 cm<sup>-1</sup>-nél, amely a félig redukált flavin (FADH<sup>•</sup>) rezgési markere, amely a flavodoxinban és a glükóz-oxidázban is megfigyelhetünk<sup>40,139</sup>. Az FADH<sup>•</sup> tranziens 1528 cm<sup>-1</sup>-nél 24 ps időállandóval fejlődik ki és 184 ps-os időállandóval relaxálódik. A FADH<sup>•</sup> képződéssel és relaxációval egyidejűleg 1635 cm<sup>-1</sup>-nél egy másik tranziens képződését figyeljük meg, amely egybeesik az 1623 cm<sup>-1</sup>-nél megfigyelhető bleach növekedésével. Az 1623 (-)/1635 (+) cm<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>-nél megfigyelhető tranziens csúcs kialakulása, ami a világos állapot megvalósulását tükrözi; ez a rezgési módus a flavin C4=O rezgésének felel meg (**5.1 Táblázat**). Az 1704 cm<sup>-1</sup>-ről 1694 cm<sup>-1</sup>-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.



**5.33 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<sup>•</sup>-hoz (1528 cm<sup>-1</sup>) és a FAD<sup>•+</sup>-hoz (1520 cm<sup>-1</sup>) 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.

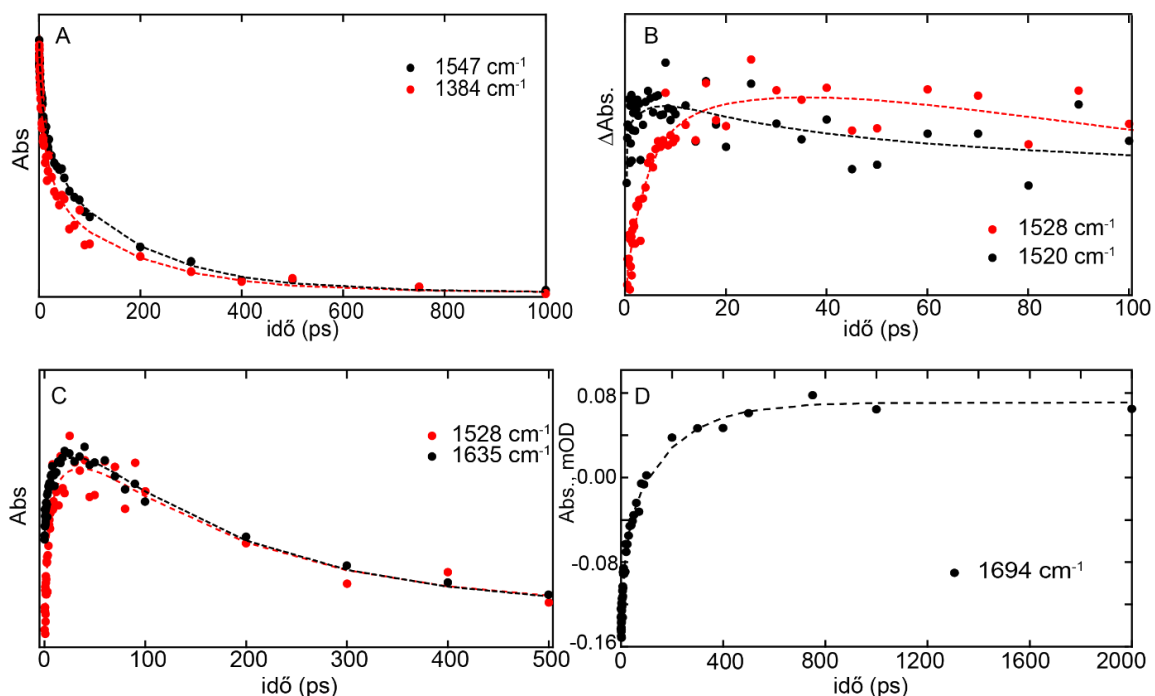


**5.34 ábra** A 3 ns-hoz tartozó TRIR, a 100  $\mu$ s-hoz tartozó TRMPS és a (világos – sötét) FTIR spektrumok összehasonlítása.

A 3 ns-os TRIR spektrumot, a 100  $\mu$ s-os TRMP spektrumot, valamint az FTIR differencia spektrumot szuperponálva (**5.34 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  $\text{cm}^{-1}$  tartományban arra utal, hogy a fehérjében 100  $\mu$ 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 (**5.35 ábra**) Az 1383  $\text{cm}^{-1}$  hullámszámnál megfigyelhető tranziens (ez a flavin gerjesztett állapotának rezgési markere) gyorsabban relaxálódik, mint ahogyan a bleach (1546  $\text{cm}^{-1}$ ), ami arra utal, hogy a gerjesztett állapot relaxációjában egy elektron transzfer folyamat vesz részt. Az 5.35 B. ábrán az anionos ( $\text{FAD}^{\bullet-}$ ) és a félig redukált ( $\text{FADH}^{\bullet}$ ) flavin gyök kinetikáját hasonlítottuk össze: az ábrán az látszik, hogy az anionos gyök és a félig redukált gyök létrejötte szekvenciálisan valósul meg, de nagyon gyorsan követik egymást. Összehasonlítva az 1528  $\text{cm}^{-1}$  és az 1635  $\text{cm}^{-1}$  tranziens csúcsok kinetikáját jól látszik, hogy ezek megegyeznek, ami arra utal, hogy az 1635  $\text{cm}^{-1}$  rezgésmód a flavin  $\text{FADH}^{\bullet}$

állapotának rezgési markere. Ezenkívül az  $1694\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt tranziens (5.35 D. ábra) a világos állapot kialakulásának kinetikáját írja le.



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

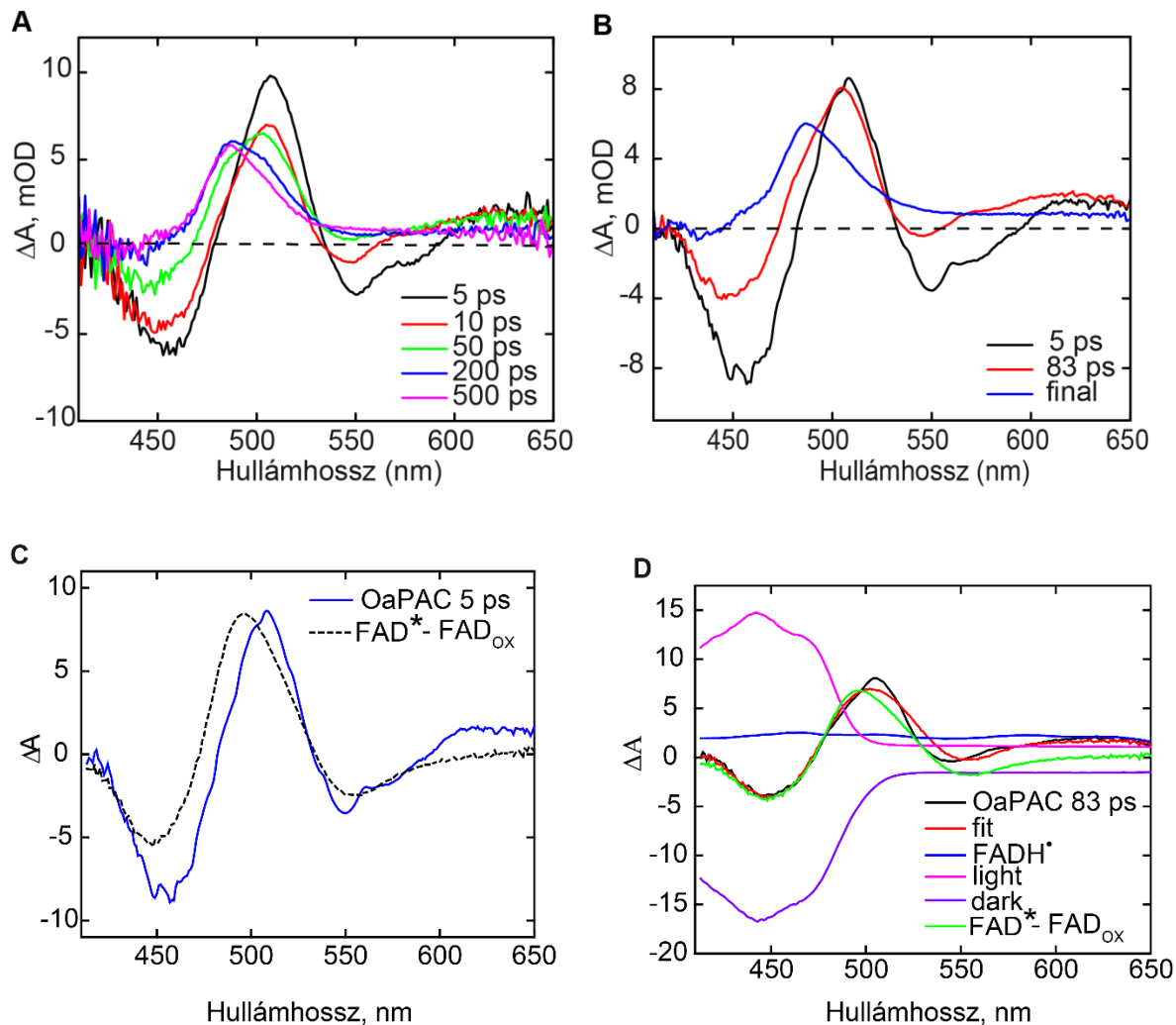
Az OaPAC fotociklusát összehasonlítva a PixD fotociklusával az figyelhető meg, hogy a világos állapot hasonló lépésekkel valósul meg, de más időállandókkal. A PixD-ben az  $1515\text{ cm}^{-1}$ -nél lévő anionos gyökre jellemző tranziens 2,5 ps alatt képződik, majd 20 ps körül relaxálódik, ezt követően jön létre (110 ps alatt) a  $\text{FADH}^\bullet$  állapot ( $1535\text{ cm}^{-1}$ ). A PixD-ben tehát a  $\text{FAD}^* \rightarrow \text{FAD}^{\bullet-} \rightarrow \text{FADH}^\bullet$  fotociklus figyelhető meg hasonlóan a növényi kriptokrómokhoz<sup>79,140</sup>. A vad típusú OaPAC esetében nem figyelhető meg egyértelműen tranziens csúcs  $1515\text{ cm}^{-1}$ -nél, mint a PixD esetében, és nem kanonikus aminosavak esetében (lásd később), ahol az  $1515\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt csúcs az anionos flavin gyök kialakulására utal. A vad típusú OaPAC-ban az  $1520\text{ cm}^{-1}$ -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  $\text{FADH}^\bullet$  populáció jelenlétét

támasztja alá az  $\sim 1510 \text{ cm}^{-1}$ -es tranziens gerjesztést követő gyors megjelenése. Mivel az  $1510 \text{ cm}^{-1}$ -es tranziens a semleges tirozin gyök rezgési markere<sup>139</sup>, 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 modellel<sup>141</sup>. Az  $1520 \text{ cm}^{-1}$  tranziens jelenléte arra utal, hogy két lehetséges (párhuzamos) elektronátviteli út létezik, ahol az anionos és a semleges flavin gyök egyidejűleg létrejön.

### *Látható tranziens abszorpciós spektroszkópai mérések*

A fotoaktiváció fotofizikájának további karakterizálása érdekében a látható tartományban is végeztünk tranziens abszorpciós méréseket (**5.36 ábra**). A tranziens infravörös mérésekhez hasonlóan a látható tranziens abszorpciós mérések kiértékelésekor a globális illesztés során az aszimptotikus végső komponens mellett két domináns EADS komponenst kaptunk. Az első 5 ps-os EADS spektrum az oxidált flavin gerjesztett állapotának ( $\text{FAD}^*\text{-FADox}$ ) feleltethető meg, amelyen megtalálhatóak a jellegzetes sávok: 450 nm körül a bleach, 500 nm körül a gerjesztett állapot abszorpciója, az 520-550 nm sávban pedig a stimulált emisszió. A FAD pufferben mért tranziens abszorpciós spektruma jól egyezik az 5 ps-os EADS spektrummal (lásd 5.36 C.ábra). A következő domináns EADS spektrum a 83 ps időállandóhoz tartozó spektrum, amely jelentősen eltér a gerjesztett állapotra jellemző spektrumtól: a második EADS komponens a stimulált emissziós sáv csökkenését mutatja 550 nm-en valamint erősen hasonlít a félig redukált flavin gyök spektrumára (a spektrális illesztés a  $\text{FADH}^\bullet$  jelentős hozzájárulását mutatja). A végső, aszimptotikus EADS (végső vagy aszimptotikus spektrum, kék vonal), amelyet úgy kaptunk, hogy az illesztés során rögzítettük az 1  $\mu\text{s}$  időállandót, vad típusú OaPAC világos és sötét állapotát jellemző abszorpciós spektrumainak különbségeként modellezhető.



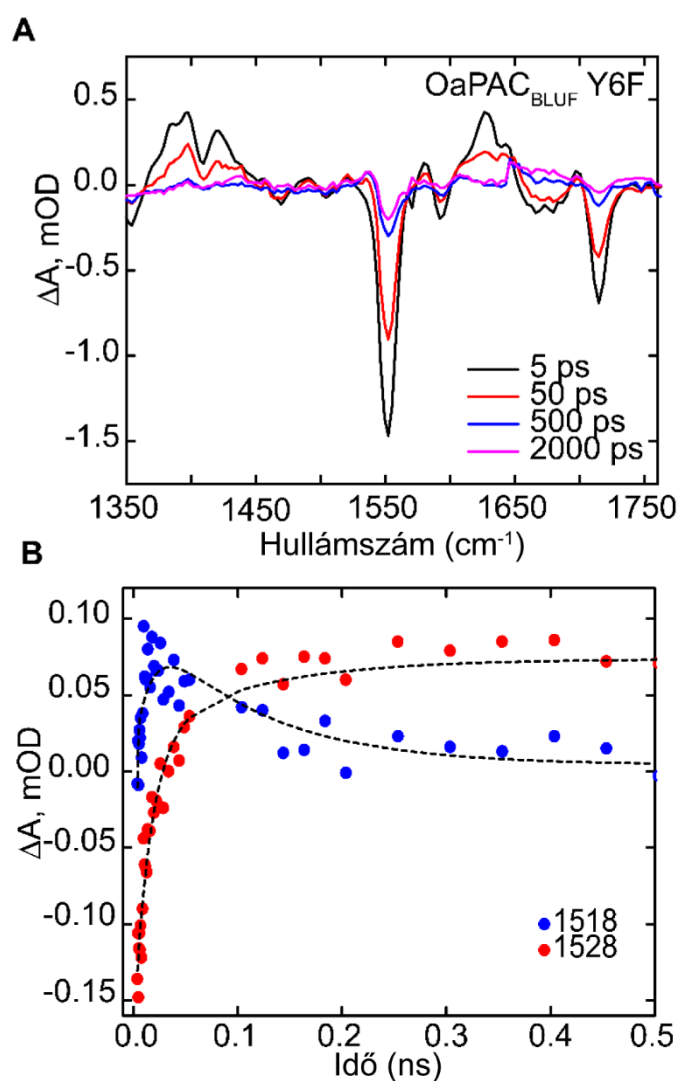


**5.36 ábra.** A vad típusú OaPAC TA spektrumai. **A.** A különböző időbeli késleltetésekhöz tartozó spektrumok. **B.** A vad típusú OaPAC globális analízis során meghatározott EAS spektrumai. **C.** A globális illesztés során a legrövidebb időállandóhoz tartozó EADS spektrum a FAD gerjesztett állapotára jellemző tranziens abszorpciós spektrumra hasonlít leginkább. **D.** A 83 ps állandóhoz tartozó EADS spektrumot a gerjesztett állapot, a félig redukált FAD, a sötét és világos állapot spektrumainak lineáris kombinációjával illesztettük.

#### *Az Y6F és W90F mutánsok vizsgálata*

A világos állapot kialakulásához vezető elektrontranszfer folyamat jellemzése érdekében készítettünk két olyan mutánt is, amelyekben kicseréltünk egy-egy kulcs aminosavat. Az Y6F mutáns esetében a tirozint egy fenilalaninre cseréltük, aminek következtében a FAD erről a helyről nem kap elektront. Ebben az esetben egy potenciális elektron donor marad a FAD környezetében, a W90 triptofán.

A tirozin kicserélése fenilalaninre részben hasonló eredményre vezetett, mint más BLUF doméneken végzett hasonló vizsgálataink: az OaPAC elvesztette fotoaktivitását, kék fényvel való megvilágítás hatására nem volt megfigyelhető a 450 nm körüli FAD abszorpciós csúcs mintegy 10-15 nm-es eltolódása. Az OaPAC Y6F mutáns abban különbözik az általunk vizsgált homológ BLUF mutánsoktól (AppA Y21F, PixD Y8F) hogy azok a mutációt követően a megvilágítás hatására is oxidált állapotban maradtak. Az OaPAC Y6F mutáns esetében azonban, folyamatos megvilágítás hatására a FAD teljesen redukált ( $\text{FADH}^-$ ) állapotba kerül; a bPAC esetében az Y7F mutánsban a FAD félig redukált állapotba került<sup>142</sup>.

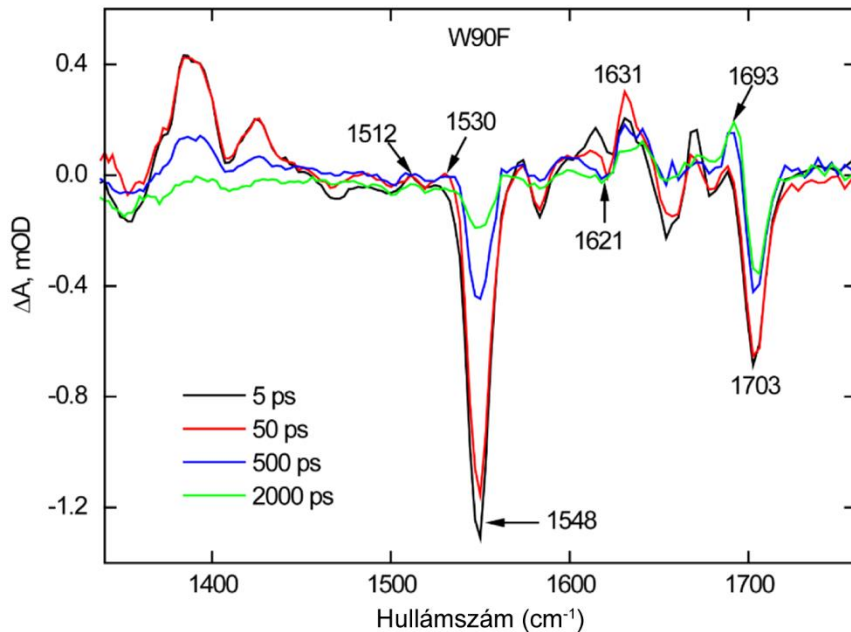


**5.37 ábra.** Az Y6F mutánson végzett TRIR mérések **A.** Az Y6F mutáns TRIR spektrumai különböző késleltetésekkel **B.** A  $\text{FAD}^{\bullet-}$  és a  $\text{FADH}^{\bullet}$  kinetikái az Y6F mutánsban.

Ahogy az **5.37 ábrán** látható, annak ellenére, hogy az Y6F mutáns esetében a megvilágítás hatására nem jön létre a világos állapot, a tranziens infravörös mérések a  $\text{FAD}^{\bullet-}$  ( $1518 \text{ cm}^{-1}$ ), majd a  $\text{FADH}^{\bullet}$  ( $1528 \text{ cm}^{-1}$ ) képződését mutatják. Az  $1488 \text{ cm}^{-1}$  hullámszám esetében egy tranziens csúcs is megfigyelhető, ami a triptofán kation gyök ( $\text{TrpOH}^{\bullet+}$ ) jelenlétére utal, ez pedig azt jelenti, hogy az Y6 hiányában a W90 triptofán elektrondonorként működhet<sup>139</sup>. Az Y6F TRIR spektruma tehát azt mutatja, hogy a konzervált tirozin fenilalaninre való cserélése nem szünteti meg az elektrontranszfert, ugyanakkor a flavin gyökök képződése szekvenciális módon valósul meg – hasonlóan ahhoz, ahogy a PixD-ben<sup>111</sup> – de lényegesen lassabban.  $1518 \text{ cm}^{-1}$ -nél először az anionos flavin gyök ( $\text{FAD}^{\bullet-}$ ) képződése figyelhető meg 16 ps-os időállandóval, ezt követi a semleges ( $\text{FADH}^{\bullet}$ ) flavin gyök kialakulása –  $1528 \text{ cm}^{-1}$  –  $\sim 100 \text{ ps}$  alatt. Ahogy az várható volt,  $1694 \text{ cm}^{-1}$ -nél nem figyelhető meg tranziens csúcs, mivel ebben a mutánsban nem alakul ki világos állapot.

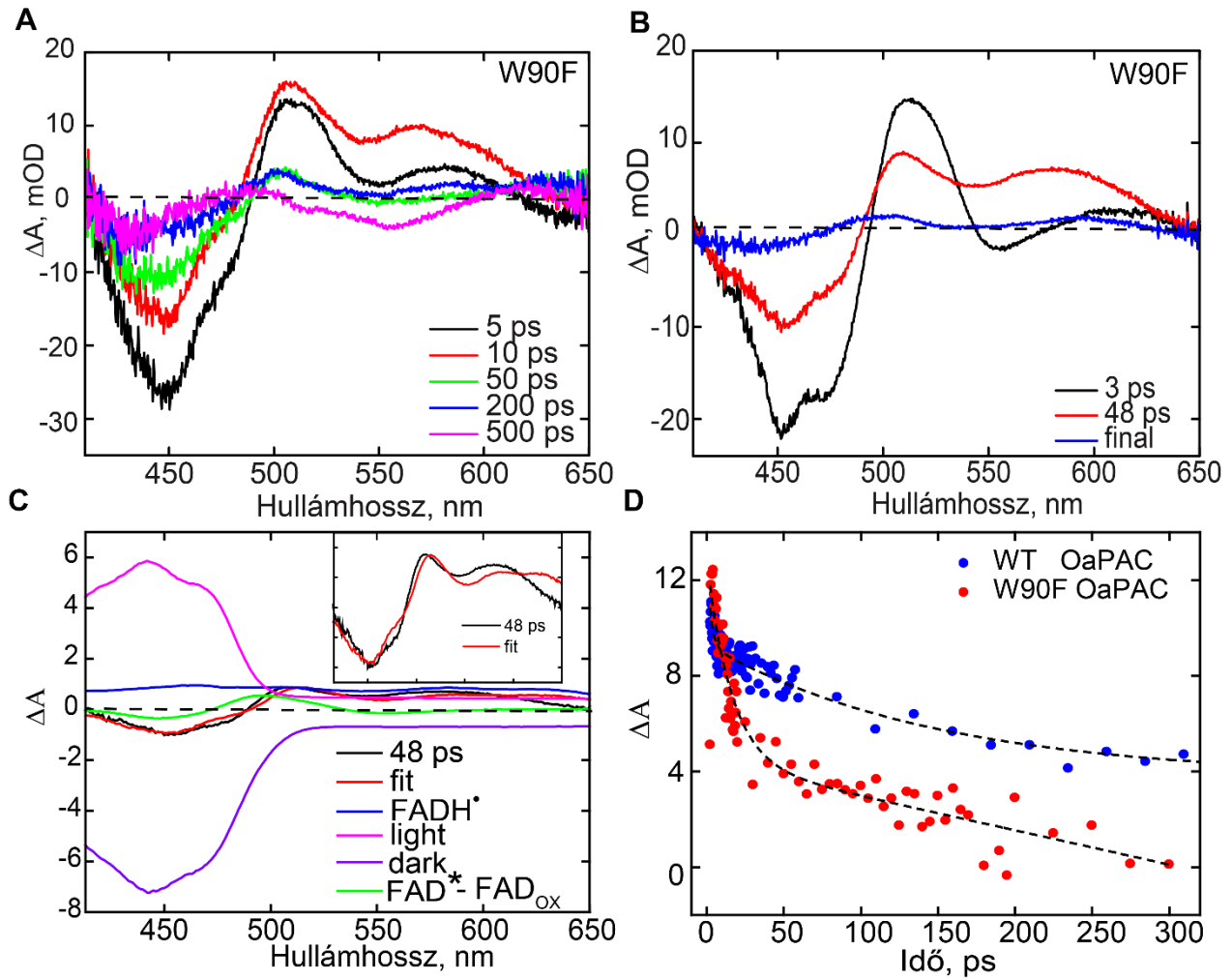
Az Y6F mutánszal szemben a W90F mutáns esetében a mutáció nem tette inaktívvá a fehérjét, az **5.38. ábrán** látható, hogy megvilágítás hatására a FAD  $S_0 \rightarrow S_1$  abszorpciós csúcsa eltolódik. Ezt a mutációt azért valósítottuk meg, mert azt akartuk vizsgálni, hogy hogyan változik meg a fotociklus abban az esetben, ha kiiktatjuk a W90 triptofánról induló elektrontranszfert.

A W90F mutánson végzett tranziens infravörös mérések során látszik, hogy a triptofán kation gyökre jellemző tranziens csúcs – ahogyan az várható – hiányzik. 50 ps-os késleltetés esetén viszont jól látható a semleges tirozin gyök ( $1512 \text{ cm}^{-1}$ ) valamint a félig redukált FAD gyök ( $1530 \text{ cm}^{-1}$ ) megjelenése. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a W90F mutáns esetében a tirozinről az elektron és a proton transzfer egyidejűleg valósul meg, vagyis a proton kapcsolt elektrontranszfer megy végbe.



**5.38 ábra.** A W90F mutáns TRIR spektrumai különböző késleltetéseknél.

A W90F mutánsban a látható tartományban is végeztünk tranziens abszorpciós méréseket (lásd **5.39 ábra**). A vad típusú mérésekhez hasonlóan a TA méréseken végzett globális illesztés három időállandót és az ezekhez tartozó EADS spektrumot eredményezett. A W90F első EADS spektruma a vad típusú OaPAC-ban megfigyelt a gerjesztett FAD és a FAD különbségi spektrumára hasonlít. A többi EADS spektrum esetében azonban feltűnő különbség figyelhető meg a második EADS 520-570 nm-es tartományában, ahol a vad típushoz képest nagyobb pozitív járulékot láthatunk. Az EADS2 spektrális illesztése azt mutatja, hogy ennél a mutánsnál a vad típusnál nagyobb mértékben járul hozzá a spektrumhoz félig redukált FAD (FADH•) spektruma. Ez arra utal, hogy a protonkapcsolt elektrontranszfer folyamat hatékonyabb a W90F mutánsban, mint a vad típusban, mivel a szomszédos triptofán eltávolítása megszünteti az alternatív elektronátviteli utat. Ez a különbség a vad típusú és a W90F mutáns között nem volt nyilvánvaló a TRIR adatokban. A TA adatok azt mutatják, hogy a gerjesztett állapot 510 nm-en történő lecsengése a W90F esetében gyorsabb, mint a vad típusé, ami azt jelzi, hogy a PCET folyamat hatékonyabb a mutánsban. A W90F esetében kapott 48 ps-os időállandó szignifikánsan gyorsabb, mint a vad típus esetében, ami arra utal, hogy a triptofán hiányában a flavin gyorsabban vissza-oxidálódik.



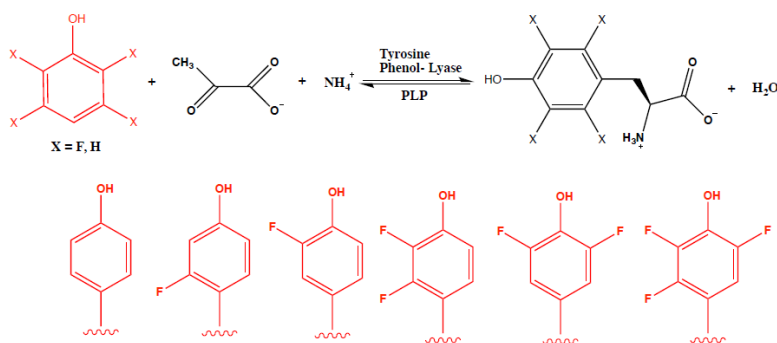
**5.39 ábra** A) Tranziens abszorpciós mérések a W90F mutánsan. A vad típushoz képest szembevetülő különbség az 550 nm körül megfigyelt abszorpció növekedés. Ez nagy valószínűséggel a FADH<sup>•</sup> állapot intenzív megjelenésének köszönhető. B) A globális illesztés során kapott időállandók. C) Az EAS2 spektrális illesztése D) A gerjesztett állapot relaxációja 510 nm-en.

### 5.2.2 Az OaPAC fotociklusának vizsgálata fluorotirozin analógok segítségével

Az Y6 minden BLUF-domén fehérjében (Y21 AppA, Y8 PixD, Y7 bPAC, Y7 BlsA esetében) egy szigorúan konzervált aminosav, 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  $Y^\bullet/Y$  redoxpár pH-függő potenciálja pH-egységként 59 mV-tal nő. Végül, ha a pH savasabb, mint a pKox, az elektronátvitel a kationgyököt ( $Y^{\bullet+}$ ) hozza létre<sup>143</sup>.

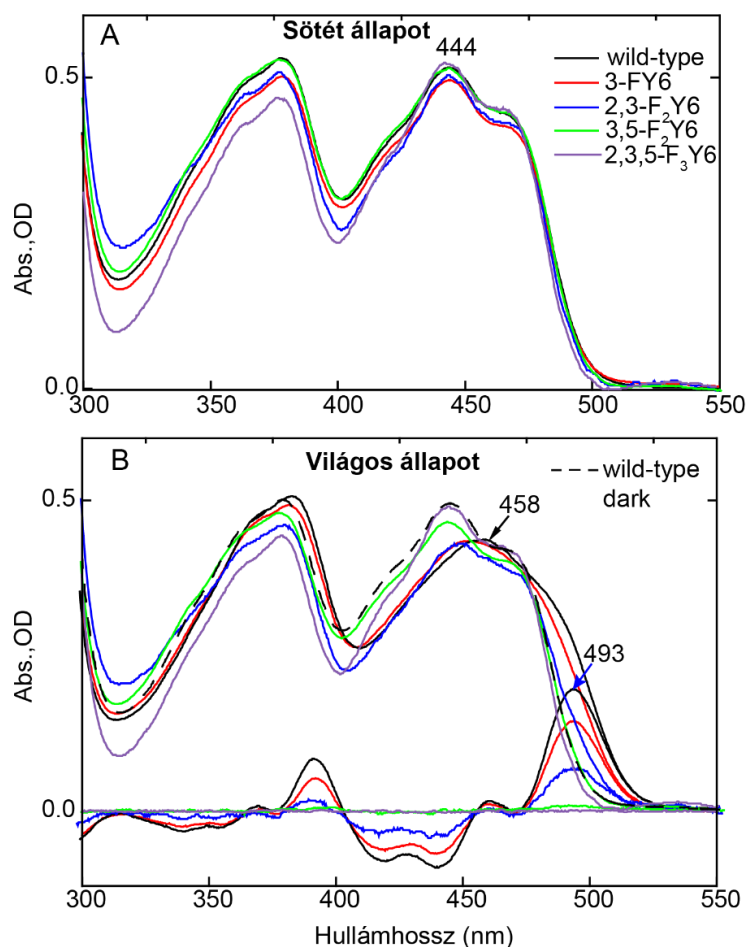
A tirozin pKa szerepének az OaPAC fotoaktiválására gyakorolt hatásának feltárása érdekében ezért az Y6-ot fluorotirozin-analógokkal (F-Tyr) helyettesítettük, hogy a fenol savasságát moduláljuk. A tirozinnal (pKa 9,9) ellentétben a 2,3,5-F3Tyr pKa értéke 6,4, így ~3000-szer savasabb, mint a tirozin, redukációs potenciálja pedig ( $Y^\bullet/Y^-$ ) ~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 **5.40 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.



**5.40 ábra** A fluorotirozin analógok szintézise (forrás: Seyedsayamdost et al. <sup>144</sup>) 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 a megvilágítást követően. Az **5.41** ábrán jól látható hogy minden esetben a  $\lambda_{\max}$  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 flavin-kötő zseb környezetét. A kék fényvel való megvilágítás azonban csak a 3-FY6 és 2,3-F<sub>2</sub>Y6 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-F<sub>2</sub>Y6, sem a 2,3,5-F<sub>3</sub>Y6 OaPAC esetében nem volt megfigyelhető vöröseltolódás. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pK csökkentése befolyásolja a világos állapot létrejöttét, illetve annak stabilitását.

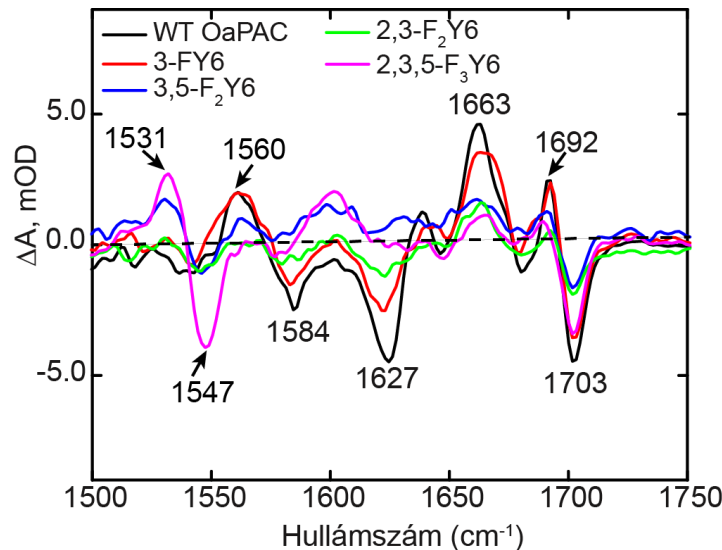


**5.41 ábra.** Az n-FY6 OaPAC mutánsok elektromos (abszorpciós) spektruma vízben. A sötét és világos állapot abszorpciós spektrumainak összehasonlítása n-FY6 és vad típusú OaPAC esetében. Látható, hogy a flavin abszorpcióját nem zavarta meg számottevően a fluorotirozin analóg jelenléte. Csak a 3 – FY6 és a 2,3 – F<sub>2</sub>Y6 OaPAC mutánsok esetében valósult meg a vörös eltolódás a 450 nm hullámhosszú LED-es megvilágítás hatására.

*Az n-FY6 OaPAC mutánsok FTIR különbségi spektruma*

Az egyes OaPAC n-FY6 variánsokon FTIR méréseket is végeztünk: az FTIR különbségi spektrumokat a vad típusú OaPAC esetében mért (sötét-mínusz világos) különbségi spektrummal hasonlítottuk össze. Az **5.42 ábrán** jól látható, hogy leginkább a 3-FY6 analógot tartalmazó OaPAC variáns differencia spektruma hasonlít a vad típusú OaPAC esetében megfigyelt spektrumra. Ebben az esetben a  $\sim 1663 (+)$  és  $1692 (+)/1703 (-)$   $\text{cm}^{-1}$  frekvenciák megtalálhatóak az analógot tartalmazó fehérje esetében.

A 2,3-F2Y, 3,5-F2Y és 2,3,5-F3Y variánsok esetében mért FTIR differencia spektrumok az 1500-1650  $\text{cm}^{-1}$  tartományban térnek el leginkább a vad típusú OaPAC spektrumától. Bár a flavin C4=O karbonil csoportja körül kismértékű változás figyelhető meg ( $1694 (+)/1703 (-)$   $\text{cm}^{-1}$ ), az 1600  $\text{cm}^{-1}$  régióban a fehérjegerinc marker módusaiban csak minimális változás figyelhető meg. A 3,5-F2Y és 2,3,5-F3Y variánsokhoz képest a 2,3-F2Y6 variáns különbségi spektruma mutatja a legtöbb fény által kiváltott változást a fehérjeváz módusokban (1584 és 1627  $\text{cm}^{-1}$ ). Érdekes módon a 2,3,5-F3Y6 mintának két módusa van 1531 (-)/1547 (+)  $\text{cm}^{-1}$  értéknél, amelyek nem figyelhetők meg a vad típusú fehérjében, de megtalálhatók a többi n-FY6 analógban, jóllehet alacsonyabb intenzitással.

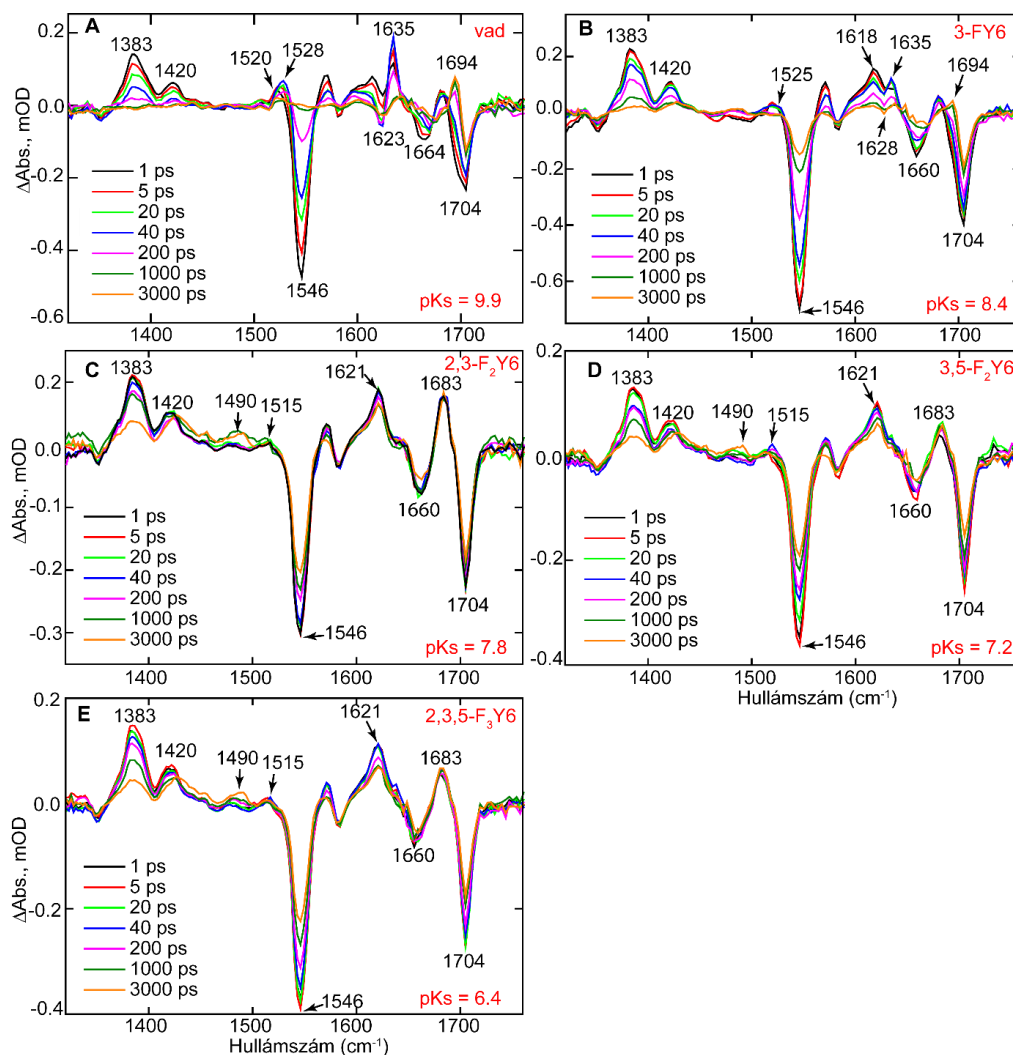


**5.42 ábra.** A vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok FTIR különbségi spektrumai. Egyedül a 3-FY6 mutáns „világos mínusz sötét” differencia spektruma fed teljes mértékben a vad típus esetében megfigyelt differencia spektrumra.



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

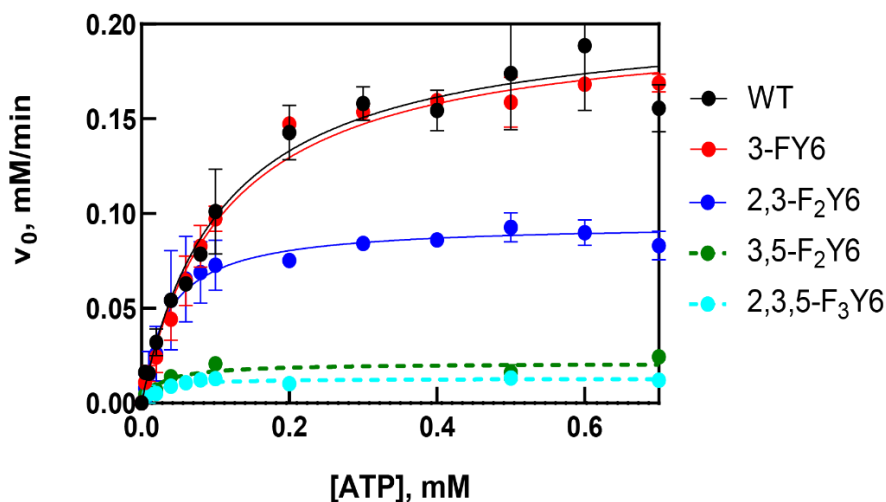
A fluorotirozin analógoknak a fotociklusra gyakorolt hatását tranziens infravörös abszorpciós spektroszkópia segítségével is vizsgáltuk. Az **5.43 ábrán** a vad típusú, valamint a 3-FY, 2,3-FY 3,5 FY és a 2,3,5 FY fluorotirozin analógokat tartalmazó mutánsok tranziens abszorpciós spektrumait hasonlítottuk össze. A kísérletek hasonló eredményre vezettek, mint korábban a PixD esetében, ahol a pK csökkenése megakadályozta a félig redukált FAD létrejöttét<sup>20,111</sup>. A tranziens infravörös abszorpciós spektrumokból jól látszik, hogy 8-as pK érték alatt már csak az anionos FAD (1515 cm<sup>-1</sup>) gyök jön létre, de a félig redukált (1528 cm<sup>-1</sup>) már nem.



**5.43 ábra.** A vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok tranziens 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<sup>-1</sup> csúcás **B.** A 3-FY6 analóg esetében az 1528 cm<sup>-1</sup> helyett 1525 cm<sup>-1</sup> csúcás figyelhető meg **C.** A 2,3-F<sub>2</sub>Y6 analóg esetében már jól megfigyelhető a 1515 cm<sup>-1</sup> módus (FAD<sup>•-</sup>) **D.** 3,5-F<sub>2</sub>Y6 és **E.** 2,3,5 - F<sub>3</sub>Y6

Ez valójában nem meglepő, alacsony pK értéknel 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 spektroszkópiai 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 esszéket 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 esetében volt megfigyelhető számottevő aktivitás, míg a 3,5-F2Y6 és 2,3,5-F3Y6-nak nem volt kimutatható aktivitása (5.44 ábra). Az adatok 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 pseudo-világított állapotban van, amely képes az ATP-t cAMP-vé konvertálni fény hiányában is.

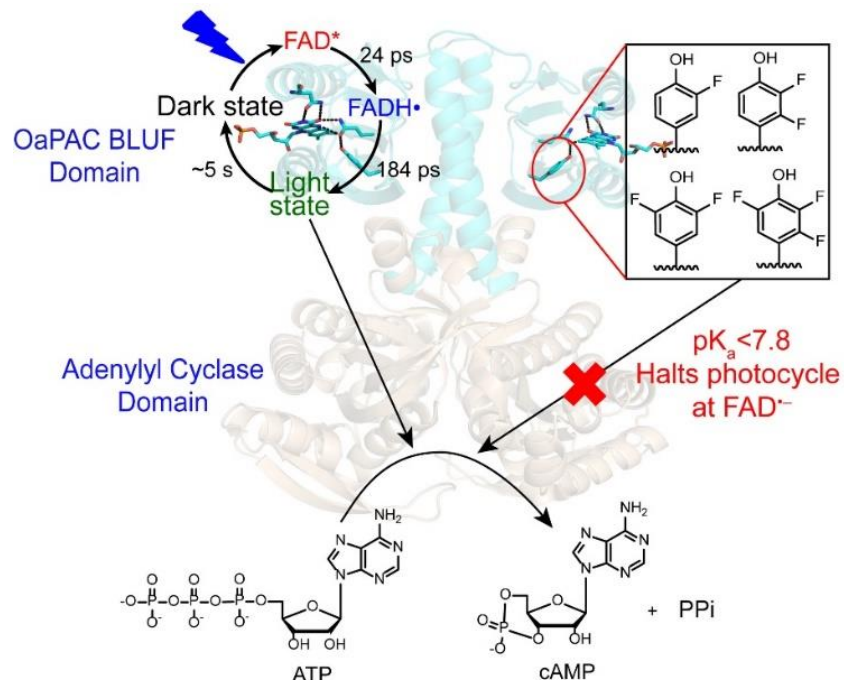


5.44 ábra. A vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok Michaelis-Menten görbéi. Az egyes ATP koncentrációkhoz tartozó sebességi állandók a 340 nm-en megfigyelt időbeni abszorpcióváltozás kezdeti lineáris szakasznak illesztéséből származnak.

### Az OaPAC fotociklusa

Bár a BLUF fotoreceptorok fotokémiáját több fajta spektroszkópiai módszerrel széles körben tanulmányozták, 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<sup>100,111,137,145</sup>. 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 enzimatis 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<sup>146,147</sup>. Érdekes módon több BLUF domén fehérjében (például az AppA-ban, BlrB-ben és BlsA-ban) nem figyelhető meg az elektron transzfer folyamata sem, nem figyelhető meg a flavin gyökök a világos állapot kialakulása során<sup>22,110</sup>.

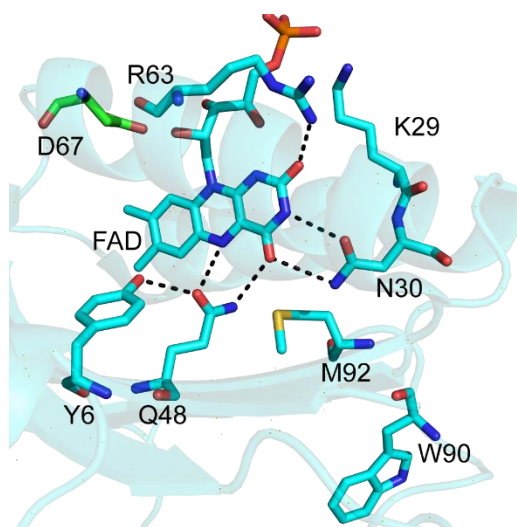


**5.45 ábra.** Az OaPAC fotoaktivációjának mechanizmusa. A kék fény gerjesztés indítja el az ATP konverziót, ha a tirozin pK értéke lecsökken, a proton-kapcsolt elektron transzfer folyamat és egyúttal az ATP konverzió is leáll.

Forrás: Collado et al., ACS Chem Bio (szeptemberi címlap)

### 5.2.3 Az elektron transzfer szerepe az OaPAC funkciójában

Az elektron transzfernek az OaPAC funkciójában betöltött szerepét kívántuk vizsgálni egy speciális mutációval, amelyről elméleti számítások azt feltételezték, hogy felgyorsítja a fotoindukált elektron transzferet. A számítások szerint – amelyet egy másik BLUF domén fehérjében végeztek el – a FAD környezetében található aszpartát aszparaginre vagy esetleg egy pozitív töltésű aminosavra való cseréje felgyorsítja az elektron transzfer folyamatot<sup>148</sup>. Az eredeti számolás ezt a PixD BLUF fehérje 69-es számú aszpartátjára vonatkoztatta. Tekintettel arra, hogy az OaPAC és a PixD BLUF doménje jelentős homológiát mutat, az aszpartát-aszparagin cserét elvégeztük OaPAC-ban is, ahol a D67-es aszpartátot cseréltük aszparaginra (lásd az **5.46 ábrát**), majd tranziens abszorpció és fluoreszcencia spektroszkópia segítségével vizsgáltuk az elektron transzfer folyamatot.



**5.46 ábra** A flavin körüli aminosavak az OaPAC-ben. Elméleti számítások szerint az elektron transzfer folyamat hatékonyságában a D67 és R63 aminosavak jelentős szerepet játszanak.

A D67N OaPAC korai időbeli késleltetéseknél mért TA spektrumai (**5.47 ábra**) hasonlóak a vad típusú OaPAC esetében megfigyelt tranziens abszorpciós spektrumokhoz: 450 nm körül egy intenzív negatív csúcs (bleach) figyelhető meg, amely a flavin  $S_0 \rightarrow S_1$  abszorpciójának eltűnését tükrözi. Az 510 nm körüli pozitív csúcs a gerjesztett állapot abszorpciójának, míg a korai

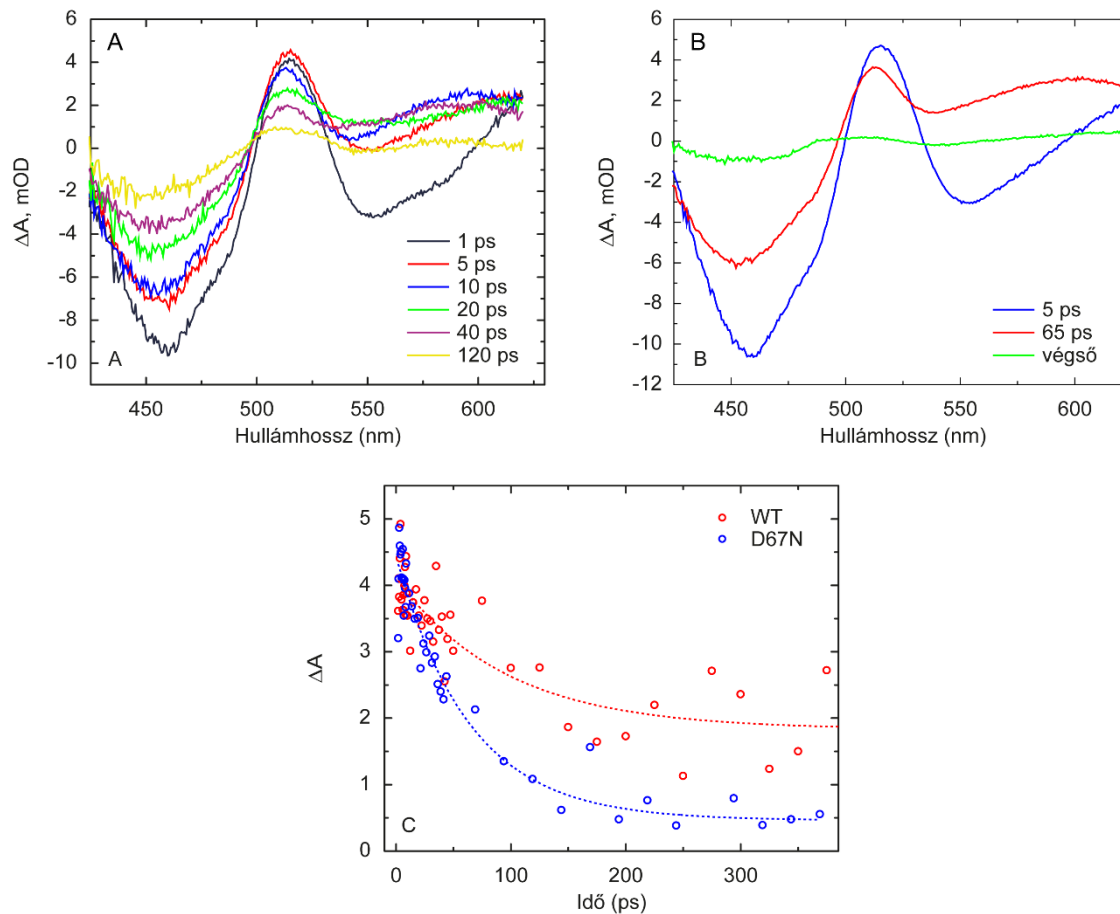
időkéséseknél megfigyelt széles negatív csúcs  $\sim 550$  nm-en a flavin stimulált emissziójának tulajdonítható. A vad típusú fehérjén végzett mérésekhez hasonlóan a D67N mutánson kapott adatokat is globálisan illesztettük három különböző időállandóval (5.47 B ábra): 5 ps, 65 ps és végtelen. A FAD\* relaxációjának tulajdonított 5 ps-os EAS hasonlít a vad típusú 5 ps-os EAS spektrumához, és az EAS2 (65 ps-os fázis a D67N esetében) ugyanúgy a gerjesztett flavin és a semleges flavin gyök spektrumának kombinációjaként modellezhető. A kapott időállandók alapján arra lehet következtetni – szekvenciális modellt feltétlezeve – hogy a FAD gerjesztett állapotát követően mintegy 5 ps alatt alakul ki a semleges gyök, amelyet követően a FAD 65 ps alatt oxidálódik. A FAD\* relatív hozzájárulása az EAS2-hez azonban kisebbnek tűnik a D67N esetében ( $\sim 75\%$  a WT-ben és  $\sim 60\%$  a D67N-ben), ami szintén diszperzív, de gyorsabb általános FAD\*-bomlásra utal (lásd alább).

A flavin gerjesztett állapotú abszorpciós csúcsának (ESA) kinetikáját ( $\sim 505$  nm) megfigyelve, a mutáns relaxációja jelentősen gyorsabbnak tűnik, mint a vad típusú fehérje esetében (5.47 C ábra). A gyorsabb FAD\*-csökkenés jó összhangban van azzal az elméleti várakozással, hogy az aszparaginsav semleges vagy akár pozitív töltésű aminosavra történő cseréje felgyorsítja az elektrontranszfer folyamatot<sup>148</sup>.

Annak érdekében, hogy további információkat szerezzünk a 67-es pozícióban található aszparaginnek az OaPAC-ban zajló elektrontranszfer-folyamatra gyakorolt hatásáról, ultragyors tranziens fluoreszcencia méréseket végeztünk a saját építésű Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópai berendezésünkkel. A Kerr-kapus megközelítés alkalmazásának előnye a fluoreszcencia upkonverzióval szemben az, hogy a fluoreszcencia emissziós spektrumát minden időkéleltetésnél megkaphatjuk, míg a fluoreszcencia felkonverziós módszerben a fluoreszcencia intenzitásának lecsengését egy bizonyos hullámhosszon mérjük. Az **5.48 A) és B)** ábrán a tranziens fluoreszcencia-adatsor globális illesztésével kapott EAS-spektrumok láthatók. A fluoreszcencia emisszió maximuma  $\sim 513$  nm-nél van, ami valamivel magasabb, mint az AppA BLUF esetében megfigyelt érték ( $\sim 500$  nm) és lényegesen alacsonyabb, mint a szabad flaviné ( $\sim 530$  nm). A WT és a mutáns OaPAC emissziós maximumai között nincs jelentős különbség, ami arra utal, hogy a mutáció nem okozott jelentős változást a flavin környezetében.

A vad típusú OaPAC fluoreszcenciája, amelyről korábban nem számoltak be, erősen diszperzívnek bizonyult, ahogyan az AppA<sup>51</sup> esetében is megfigyelhető volt. A tranziens fluoreszcencia-adatsor

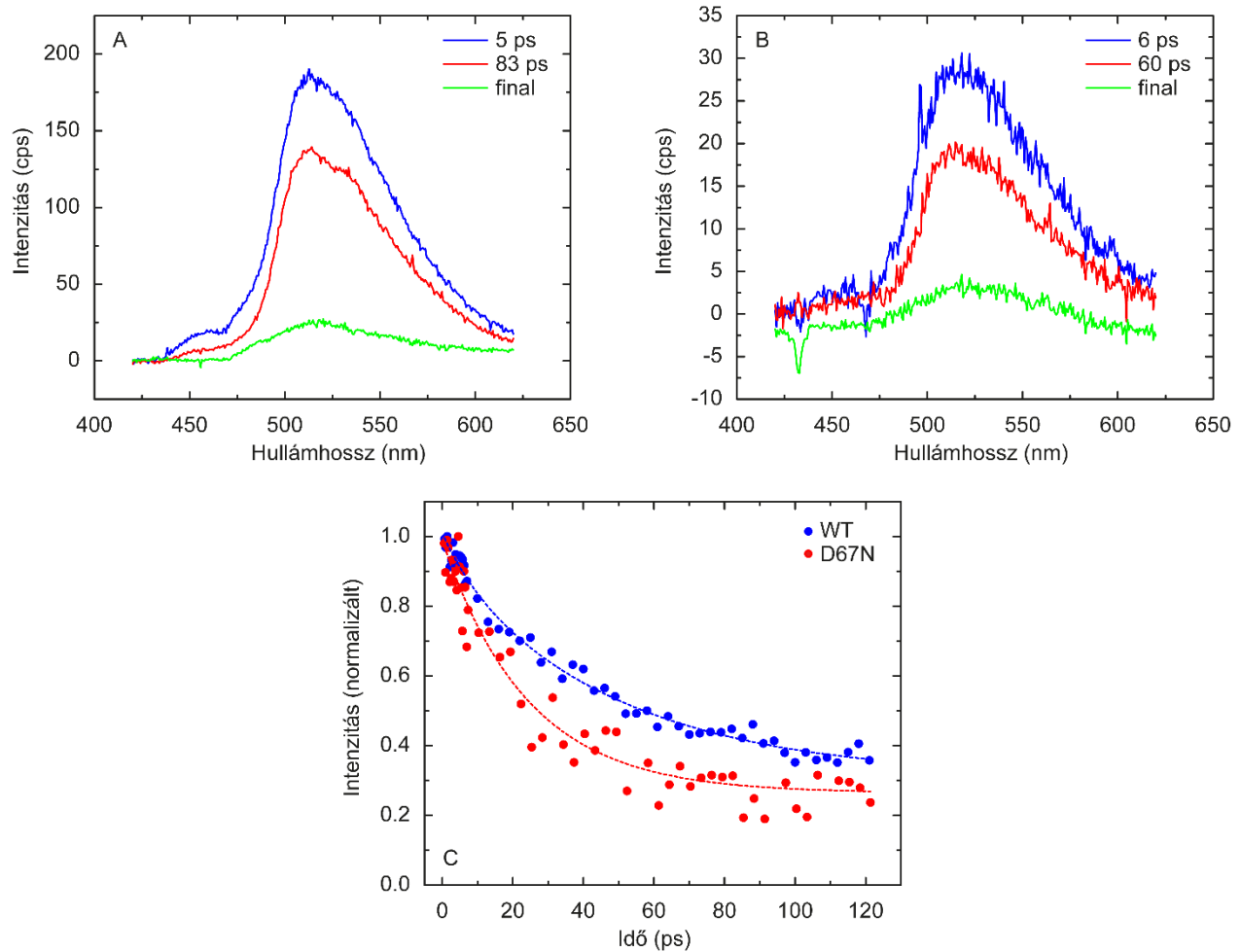
jól leírható volt ugyanazzal a három élettartammal (5 ps, 83 ps és végtelen), mint amit a TA-kísérletekben kaptunk.



**5.47** ábra A) A D67N mutánsnál már transziens abszorpciós spektrumok különböző késleltetéseknél. B) A D67N mutánsnál végzett transziens abszorpciós mérések globális elemzésével kapott EAS spektrumok. C) Az 530 nm-en megfigyelt fluoreszcencia-csökkenés egyedi kinetikája.

A globális illesztés a D67N mutáns esetében szintén három komponenst oldott fel (5 ps, 60 ps, végtelen, 5.48 B ábra), rövidebb időállandóval a vad típusú fehérjéhez képest. Az 513 nm-en megfigyelt kinetikákat összehasonlítva látható, hogy a gerjesztett állapot relaxációjának felezési ideje a D67N-ben majdnem fele a WT fehérjénél megfigyelthez képest (5.48 C ábra).

Érdeemes megemlíteni, hogy az aszpartát-aszparagin mutációt javasolták a PixD esetében, ahol a szerzők arra számítottak, hogy a mutáció jelentősen fokozza az elektrontranszfer kinetikáját. Mi is elvégeztük ezt a homológ mutációt (D69N), és ez szintén gyorsabb fluoreszcencia-csökkenést és rövidebb időállandókat eredményezett.

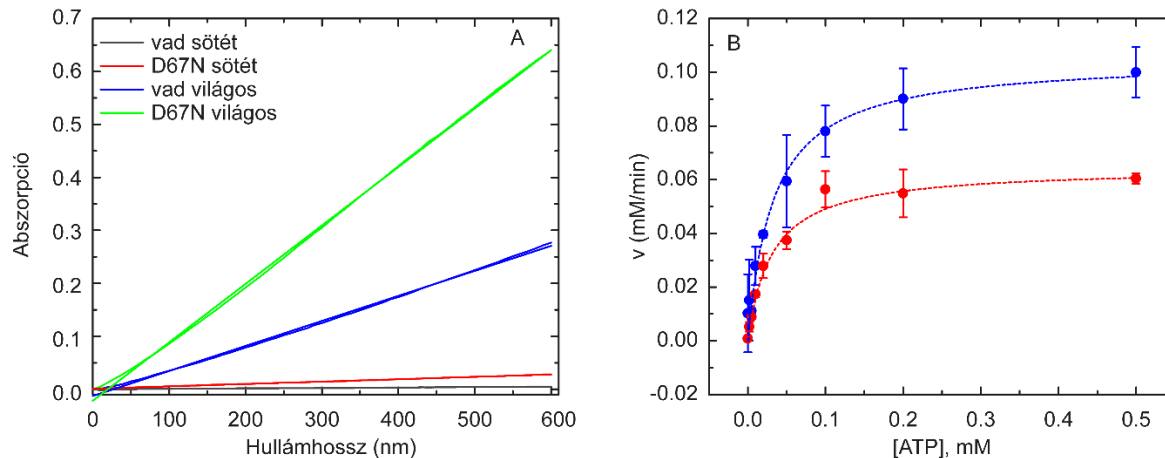


**5.48 ábra** Vad típusú OaPAC (A) és a D67N mutáns (B) esetében végzett Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiai mérések eredménye. Az alsó ábrán az 520 nm esetén megfigyelt kinetika látható.

Annak érdekében, hogy a mutációnak a funkcióra gyakorolt hatását vizsgáljuk egy enzimátikus esszét. Az 2  $\mu\text{M}$  vad típusú OaPAC és a D67N OaPAC adenilát-cikláz aktivitását egy olyan spektrofotometriás teszttel követtük nyomon, amely az OaPAC által felszabaduló pirofoszfátot detektálja, amikor az ATP-t cAMP-á alakítja. Megvilágítás nélkül a mutáns enzimaktivitása a vad típusúhoz képest képest képest kissé magasabb, de még mindig nagyon alacsony (**5.49 ábra**). Megvilágítás hatására a WT és a D67N mutáns esetében is erősen megnőtt a konverziós sebesség, a D67N mutáns azonban hatékonyabban alakítja át az ATP-t, mint a vad típusú fehérje.

Az enzimátikus vizsgálatokat növekvő mennyiségű szubsztrát felhasználásával végeztük, és az eredményeket a klasszikus Michelis-Menten módon értékeltük ki (**5.49 B. ábra**): a D67N OaPAC-ban megnövekedett cAMP-termelődést mutatnak, a konverzió maximális sebessége  $\sim 1,5$ -szer nagyobb volt a mutánsban. A félmaximális sebesség koncentrációja ( $K_M$ ) szintén kissé magasabb

a mutánsban, de ami még fontosabb, a katalitikus állandó ( $k_{cat}$ ) - amely megadja, hogy az egyes enzimek hány szubsztrát molekulát képesek termékké alakítani egységnyi idő alatt -  $\sim 1,5$ -szer magasabb a D67N-ben, mint a WT OaPAC-ban (lásd **5.3 táblázat**).



**5.49 ábra** Az ATP- cAMP konverzió közvetett mérése az abszorpció mérésel. A vad típusú (piros) és D67N OaPAC esetében megfigyelt Michelis-Menten görbék

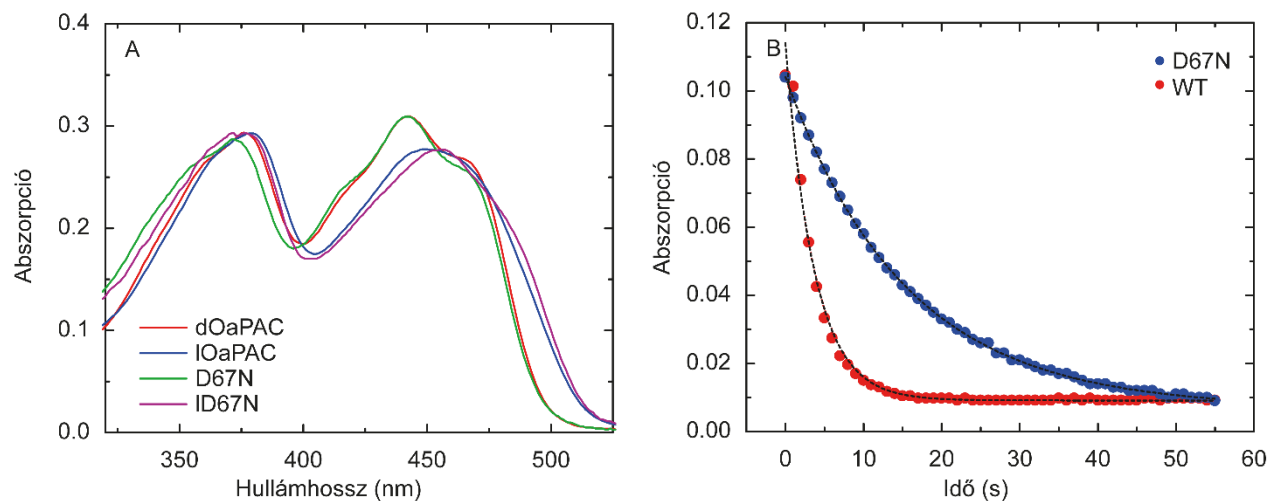
Kinetikai értékek	Vad típus	D67N
$V_{max}$ (mM min <sup>-1</sup> )	0.0644 ± 0.0069	0.1001 ± 0.002
$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	32.2	50.05
$K_M$ (mM)	0.031 ± 0.001	0.0412 ± 0.005

**5.3 Táblázat** A táblázatban az enzimikus esszé során kapott paraméterek láthatóak. Ennek alapján a  $v_{max}$  és a  $k_{cat}$  is jelentősen megnő a D67N mutánsban

A mutáns abszorpciós spektruma az  $S_0$ - $S_1$  abszorpciós csúcs tipikus vörös eltolódását mutatja (442 nm-ről 455 nm-re) kék fény besugárzása után, hasonlóan a vad OaPAC és más BLUF domén fehérjékhez (**5.50 A. ábra**). Megmértük a vad típusú fehérje és a D67N OaPAC sötét állapotba való visszatérésének a kinetikáját. A BLUF-domének világos állapotból sötét állapotba való visszatérése harminc perctől néhány másodpercig terjed. Az AppA-ban a fotociklus viszonylag hosszú, a helyreállítási élettartam  $\sim 25$  perc, a PixD-ben lényegesen rövidebb ( $\sim 26$  s) és az OaPAC-ban csak néhány másodperc<sup>145,149,150</sup>. A D67N mutáns sötét állapotba való visszatérése az AppA-



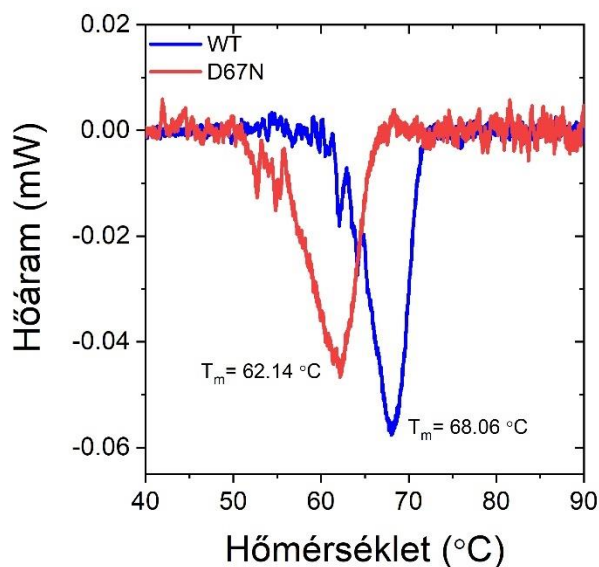
hoz képest nagyon gyorsan, kevesebb mint egy perc alatt megvalósult, de mintegy ötször lassabban, mint a vad típus esetében (5.50 B. ábra). Ez a jelentős változás a mutáns és a natív fehérje közötti lehetséges szerkezeti különbségre utal. A D67N lassabb regenerálódása arra utal, hogy a fehérje a gerjesztést követően több időt tölt olyan szerkezetben, amely lehetővé teszi a nagy sebességű cAMP átalakulást. Összességében a mutáns olyan szerkezetet vesz fel, amely nemcsak hatékonyabb az ATP-cAMP átalakításában, hanem lassítja az eredeti szerkezetbe való visszarendeződést is.



**5.50 ábra A)** A vad típusú és D67N OapAC abszorpciós spektrumai sötét és világos állapotban **B)** A sötét állapotba való visszatérés sebessége a 490 nm-en megfigyelt abszorpció nyomon követésével

Az enzimatisz aktivitásban és a sötét állapotba való visszatérésben tapasztalt különbség a vad típusú fehérje és a D67N mutáns között arra utal, hogy a mutáció valószínűleg megváltoztatta a fehérje szerkezetét. E hipotézis tesztelésére mindkét fehérjén differenciál pásztázó kalorimetriás (DSC) kísérleteket végeztünk (**5.51 ábra**). Méréseink jelentős különbséget mutatnak a mutáns és a vad típusú fehérje között. A WT termikus denaturációja meredek endotermikus denaturálódást mutatott 68,0°C-os  $T_m$  és 0.078 J/g  $\Delta H$  értékkel. A D67N mérése jelentősen alacsonyabb  $T_m$ -t (62,1°C) eredményezett, alacsonyabb  $\Delta H$ -val (0.069 J/g). Az olvadási hőmérséklet ( $T_m$ ) az a hőmérséklet, ahol a fehérje 50%-a denaturálódik, míg a görbe alatti terület a fehérje denaturálásához szükséges energiát tükrözi, amely az entalpiaváltozáshoz ( $\Delta H$ ) kapcsolódik. A D67N kisebb  $\Delta H$  értéke a D67N mutáns kevésbé kompakt és rugalmasabb konformációjára utal.

Ezt tükrözi a jelentősen (5.9 °C) alacsonyabb  $T_m$ -érték is (6. ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a D67N OaPAC megnövekedett aktivitásának hátterében a rugalmasabb szerkezet áll.



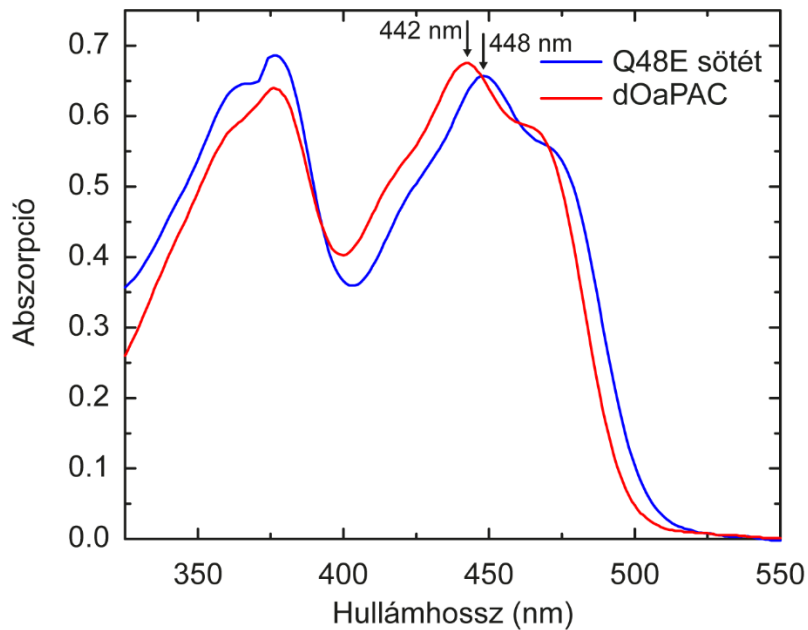
**5.51 ábra** DSC mérések a vad típusú fehérjén és a D67N mutánsan

A D67N mutánsan végzett kísérleteink igazolták azt az előfeltételezést, hogy az aszpartát aszparaginra való cserélése felgyorsítja a fotoindukált elektron transzfer folyamatot, valamint a flavin oxidációját is. A mutáció egyúttal a cAMP konverzió növekedéséhez is vezetett, amelynek az elsődleges oka valószínűleg nem az elektron transzfer folyamatban megfigyelt különbségek, hanem a mutáns szerkezetének megváltozása.

#### 5.2.4 A Q48 glutamin szerepe az OaPAC funkciójában

Ahogy a korábbi fejezetekben láthattuk a BLUF domének fotokémiája az izoalloxazin gyűrű körüli konzervált aminosavaktól függ<sup>54,102,108-110,151</sup>. A tirozin (Y6) és a triptofán (W90) mellett egy másik kulcsfontosságú aminosav, amely szintén jelen van minden BLUF-doménben, a flavin N5 atomjához közeli glutamin. Szerepét (Q48 az OaPAC-ban, Q63 az AppA-ban, Q50 a PixD-ben) a BLUF domén fehérjék fotoaktiválásában széles körben vizsgálták, mivel megfigyelték, hogy szükséges a BLUF doménből a fehérje C-terminális része felé történő szerkezeti változás átviteléhez<sup>102 152-154</sup>; AppA-ban a cseréje a BLUF-domén fehérjékben kék fény besugárzása esetén megfigyelt jellegzetes spektrális vöröseltolódás elvesztését eredményezte<sup>19,107</sup>. Az első modell, amelyet az AppA első szerkezetéből vezettek le<sup>101</sup>, azt javasolta, hogy a glutamin a fotoexcitációt követően elfordul. Tranziens infravörös kísérletek és kvantumkémiai számítások alapján – másokkal – együtt azt a javaslatot tettük, hogy keto-enol tautomerizációs mechanizmus vezet a hidrogénkötés ultragyors átrendeződéséhez<sup>19,102,155-157</sup>.

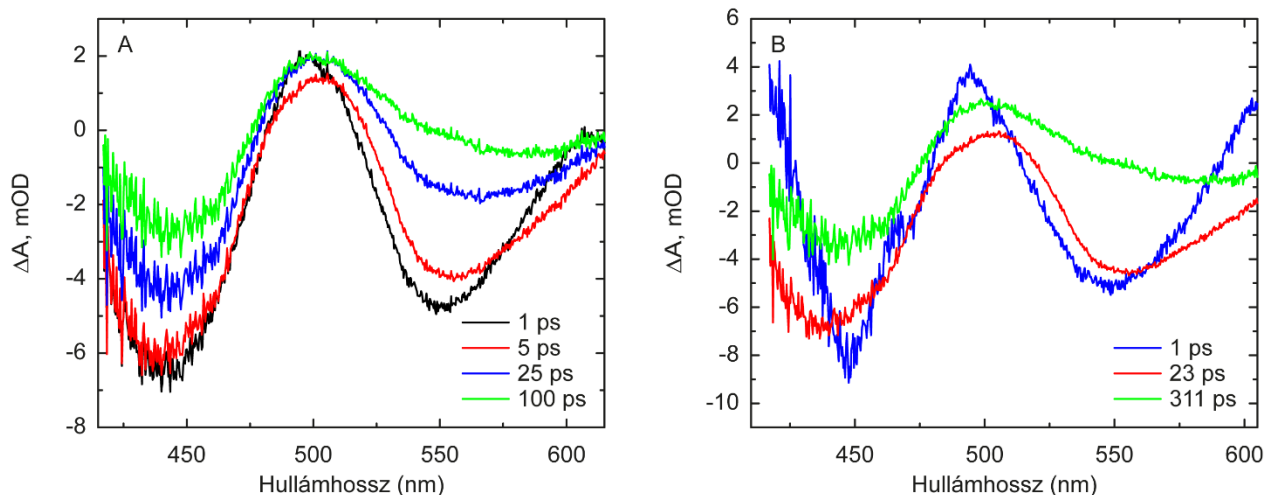
A Q48 glutaminnak az OaPAC funkciójában betöltött szerepének vizsgálata érdekében létrehoztuk a Q48E mutánst. A mutáns abszorpciós spektruma jelentős eltérést mutat a vad típusú fehérje abszorpciós spektrumához képest, a maximum 5 nm-rel a nagyobb hullámhosszok felé tolódott. Mivel ugyanezen átmenet 10-12 nm-es vörös eltolódását a sötétből a világos állapotba való átmenet esetén a flavin körüli hidrogénkötések átrendeződésének tulajdonítják, feltételezhető, hogy az abszorpciós maximum 5 nm-es eltolódása a flavin hidrogénkötéseinek szerkezeti változásaiból ered. Érdemes megemlíteni, hogy az AppABLUF analóg mutációja 3 nm-es vöröseltolódást eredményezett<sup>19</sup>. A Q63E AppABLUF-hoz hasonlóan a Q48E OaPAC mutáns sem mutat vörös eltolódást (**5.52 ábra**) kék fény besugárzásakor, ami arra utal, hogy a mutáns a várakozásoknak megfelelően fotoaktív.



**5.52 ábra** A vad típusú fehérje és a Q48E mutáns abszorpciós spektruma. A mutánsban jól látható egy jelentős vörös eltolódás, ez a hidrogén kötés hálózat megváltozására utal.

#### *Tranziens abszorpciós kísérletek a Q48E mutánsban*

A Q48E OaPAC mutáns fotokémiájának jellemzésére tranziens abszorpciós spektroszkópiát alkalmaztunk. Az adatok globális illesztése – szekvenciális kinetikai modellt feltételezve – heterogén a gerjesztett állapot heterogén relaxációját mutatott ki három idő állandóval, 1 ps, 23 ps, 311 ps (**5.53 ábra**). A Q48E tranziens abszorpciós spektruma meglehetősen "tiszta", nincs nyilvánvaló jele a flavin gyökök képződésének. Az a tény azonban, hogy a gerjesztett állapot több száz pikoszekundum alatt relaxálódik, hatékony elektrontranszfer folyamatra utal, különben sokkal hosszabb relaxációs időt ( $\sim 4$  ns) figyeltünk volna meg.



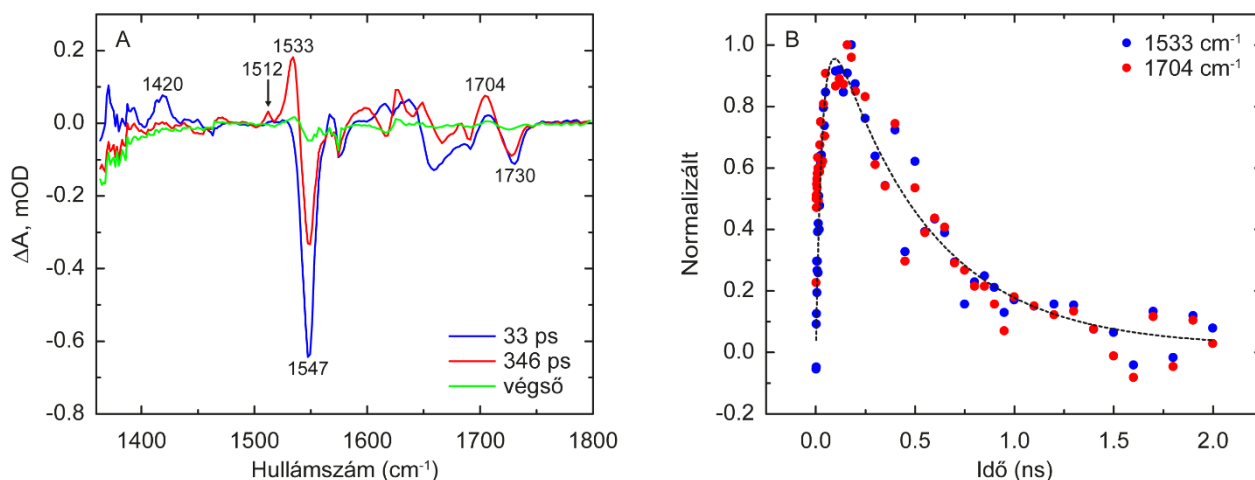
5.53 ábra A) Tranziens abszorpciós mérések a Q48E mutánsban B) A globális illesztéssel kapott EADS spektrumok

### Infravörös tranziens abszorpciós mérések

A Q48E mutáns kék fény gerjesztést követő változásainak vizsgálatára infravörös tranziens abszorpciós méréseket végeztünk, amely részletesebb képet adott, mint a látható tartományban végzett tranziens abszorpciós mérések. A TRIR-spektrumok jellegzetes módusai a flavin rezgési módusainak feleltethetők meg, és hasonlóak a vad típusú OaPAC-ban megfigyeltekhez. Az  $1547\text{ cm}^{-1}$ -nél lévő intenzív bleach és az  $1581\text{ cm}^{-1}$ -nél lévő kevésbé intenzív módus a korábbiakban az izoalloxazin gyűrű módusainak felelnek meg (5.54 ábra). A vad típusú OaPAC TRIR-spektrumához képest megfigyelhető legjelentősebb különbség az  $1730\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt negatív csúcs és az  $1704\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt pozitív csúcs. Ez a jelentős különbség arra utal, hogy a glutamin glutaminsavra történő cseréje a flavin körüli hidrogénkötés-hálózatban változást idéz elő. Ez nem váratlan: korábbi munkánkban<sup>103</sup> az AppA analóg Q63E mutációjával kapcsolatban izotópjelöléssel kimutattuk, hogy az új  $1730\text{ cm}^{-1}$ -es bleach nem egy flavin rezgési módus, hanem a glutaminsav oldalláncának rezgéséből származik. Azt is meg kell említeni, hogy az  $1730\text{ cm}^{-1}$ -es rezgési módus az irodalom alapján a protonált karboxil csoport várható abszorpciós tartományában ( $1700\text{--}1770\text{ cm}^{-1}$ ) figyelhető meg<sup>158-162</sup>. Ez a megfigyelés jól átfedésben van a Chen és munkatársai által az Y6WQ48EW90F OaPAC mutánsban végzett számítással<sup>163</sup>, amely azt mutatja, hogy az E48 hidrogénkötést képez a flavin N5-ösével.

Szekvenciális modellt feltételezve a TRIR adatok globális illesztése két fő komponensre adott 33 ps, 346 ps élettartammal és egy harmadik állandó komponensre végtelen élettartammal. Az első EADS

spektrum az oxidált flavin differenciaspektrumához rendelhető; az  $1420\text{ cm}^{-1}$  csúcs a flavin S1 gerjesztett állapotának vibrációs markere<sup>110</sup>. Az  $1420\text{ cm}^{-1}$  csúcs kinetikájára illesztve a gerjesztett állapot relaxációja  $39\pm 5\text{ ps}$ , ami összhangban van a globális illesztéssel kapott  $33\text{ ps}$ -os EADS1 időállandóval. Az EADS2-ben három különálló csúcs kialakulása figyelhető meg  $1512\text{ cm}^{-1}$ ,  $1533\text{ cm}^{-1}$  és  $1704\text{ cm}^{-1}$  frekvenciáknál. Az  $1533\text{ cm}^{-1}$ -nél lévő csúcs megjelenése a semleges (FADH<sup>•</sup>) flavin gyök kialakulására utal, mivel ez a csúcs a semleges flavin gyök ismert vibrációs markere<sup>38,150</sup>. Az  $1512\text{ cm}^{-1}$  csúcs, amelyet korábban a semleges tirozin gyök vibrációs markereként azonosítottunk azonos időállandóval jelenik meg, mint az  $1533\text{ cm}^{-1}$  – as csúcs, ami az Y6<sup>•</sup> gyök és a FADH<sup>•</sup> gyök egyidejű megjelenésére utal.

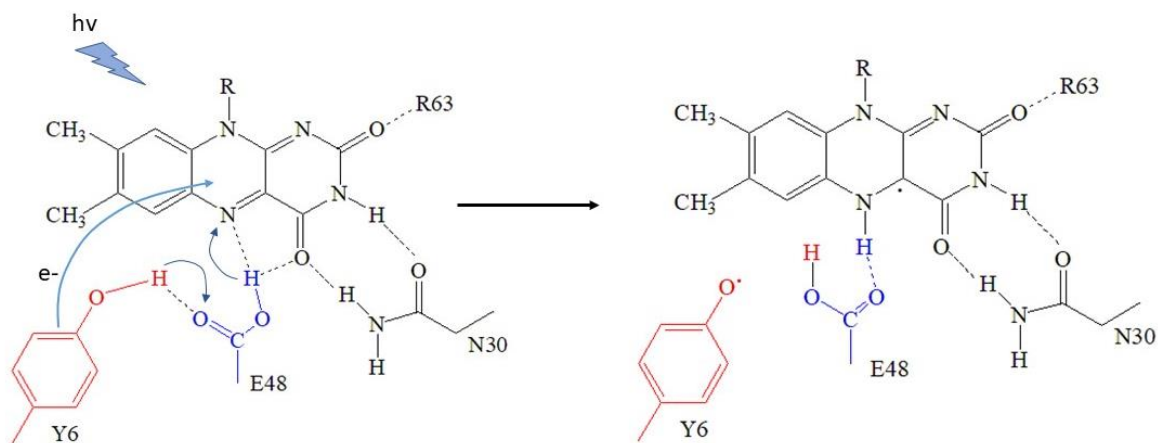


**5.54** A) A tranziens abszorpciós mérések során kapott globális illesztéssel kapott EADS spektrumok. A gerjesztést követően  $33\text{ ps}$  alatt alakulnak ki a gyök állapotok és  $346\text{ ps}$  alatt B) Az  $1533\text{ cm}^{-1}$  és  $1704\text{ cm}^{-1}$  csúcsoknál megfigyelt kinetikai görbék esetén jól megfigyelhető, hogy együtt futnak

Az  $1730\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt csúcs kinetikája arra utal, hogy a glutaminsav már a gerjesztés előtt vagy azzal egyidejűleg hidrogén-kötést alkot a FAD N5-ös atomjával. A gerjesztést követően a flavin protonációja valószínűleg Grotthus -mechanizmus alapján történik és a glutamát a hidrogén kötés mentén ad egy protont a FAD-nak.

A PixD-n végzett elméleti számítások alapján<sup>148</sup> kettős proton transzfert javasoltak az OaPAC-ban lejátszódó fotoaktiváció során<sup>141,150,164</sup>: gerjesztés után a tirozin egy protont ad a glutaminnak (Q48), és a glutamin protonálja a flavint, majd a proton visszatér a tirozinra, aminek következtében létrejön a semleges tirozin gyök. A Q48E mutáns esetében kapott eredményeink igazolták ezt a feltételezést (**5.55 ábra**). Az OaPAC-ban megfigyelt hasonló kinetika az  $1512\text{ cm}^{-1}$  és  $1533\text{ cm}^{-1}$

csúcsoknál arra utal, hogy a glutaminsavról a FAD irányába történő proton transzfernek ugyanaz az időállandója, mint a tirozinra visszafele irányuló proton transzfer. Ez a szinkron mechanizmus eltér a Chen és munkatársai által az Y6WW90FQ48E OaPAC mutáns esetében megfigyelt szekvenciális mechanizmustól <sup>163</sup>. Saját méréseik során gyors proton transzfert figyeltem meg a glutaminsavról a flavinra, amelyet egy lassabb protonátvitel követett a triptofán kationgyökből a glutaminsavra. Ez nem meglepő, mivel a tirozin kationgyök pK értéke lényegesen alacsonyabb ( $\sim -2$ ) <sup>165</sup>, mint a triptofán kationgyöké ( $\sim 4$ )<sup>166</sup>, ami a tirozin gyorsabb deprotonálódási lépését indokolja.

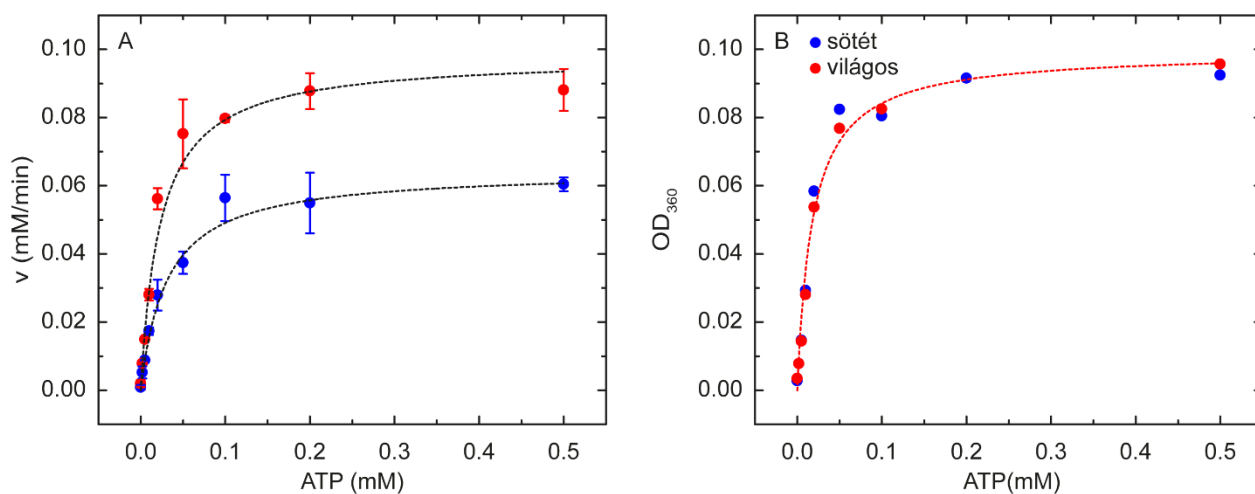


**5.55 ábra** A Q48E OaPAC mutáns fotofizikája: a gerjesztést követően a tirozin egy elektront ad a FAD-nak, illetve egy protont a glutaminsavnak, amely ezzel egy időben egy protont ad a FAD-nak. Ennek következtében stabilizálódik a semleges tirozin és szintén semleges FAD gyök.

#### *A cAMP átalakulási sebesség közvetett mérése*

A fotokémiai folyamatok karakterizálása mellett nagyon fontos volt annak a megfigyelése, hogy a glutamin glutamátra való cseréje mennyiben változtatja meg a fehérje funkcióját, vagyis a cAMP konverzió hatásfokát. A Q48E OaPAC mutánsban az ATP-cAMP átalakulási sebességét spektrofotometriás kapcsolt esszével mértük. Az 5A. ábra a 2  $\mu\text{M}$  vad típusú OaPAC és a 2  $\mu\text{M}$  Q48E mutáns sötét és fényindukált enzimaktivitását mutatja 500  $\mu\text{M}$  ATP jelenlétében. Sötétben a Q48E mutáns jelentős cAMP-termelődést mutat a vad típusú enzimhez képest, amelynek bazális aktivitása nagyon alacsony. Az enzimátikus vizsgálatokat növekvő ATP-koncentráció mellett végeztük annak érdekében, hogy a cAMP-képződés konverziós hatásfokát megkapjuk. Az **5. 56. ábra** a kék fényel besugárzott vad típusú és Q48E OaPAC mutáns enzimátikus aktivitásának

Michaelis-Menten-diagramját mutatja. Az átalakulási sebesség maximális sebessége  $\sim 1,5$ -szer nagyobb a Q48E mutánsban, míg a félmaksimalis sebesség ( $K_M$ ) koncentrációja  $\sim 0,6$ -kal alacsonyabb. A katalitikus állandó ( $k_{cat}$ ), amely megadja az enzim által egységként cAMP-á alakítható szubsztrátmolekulák számát,  $\sim 1,5$ -szer magasabb a Q48E OaPAC-ban, mint a vad típusú enzimben, miközben a Q48E mutáns sötét és világos állapotban mért enzimaktivitása azonos volt. Az enzimatis vizsgálatok eredményeit az **5.4 táblázat** foglalja össze. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár a Q48E mutáns nem fotoaktív (ami összhangban van az abszorpciós spektrumban kék fény megvilágításakor tapasztalható jellegzetes vöröseltolódás hiányával), képes az ATP folyamatos és hatékonyabb átalakítására cAMP-á, mint a vad típusú OaPAC. Ez arra utal, hogy a Q48E mutáció olyan konformációs változást idéz elő az OaPAC-ban, amely kedvez az ATP-konverzióknak, de elnyomja a fény által kiváltott változásokat a flavin hidrogénkötés-hálózatában.



**5.56 ábra** Michelis-Menten görbék A) Vad típus (kék) és a Q48E mutáns (piros) esetében B) A Q48E mutáns esetében sötét és világos állapotban. Jól látható, hogy a megvilágítás hatására az enzimatis aktivitás nem változik.

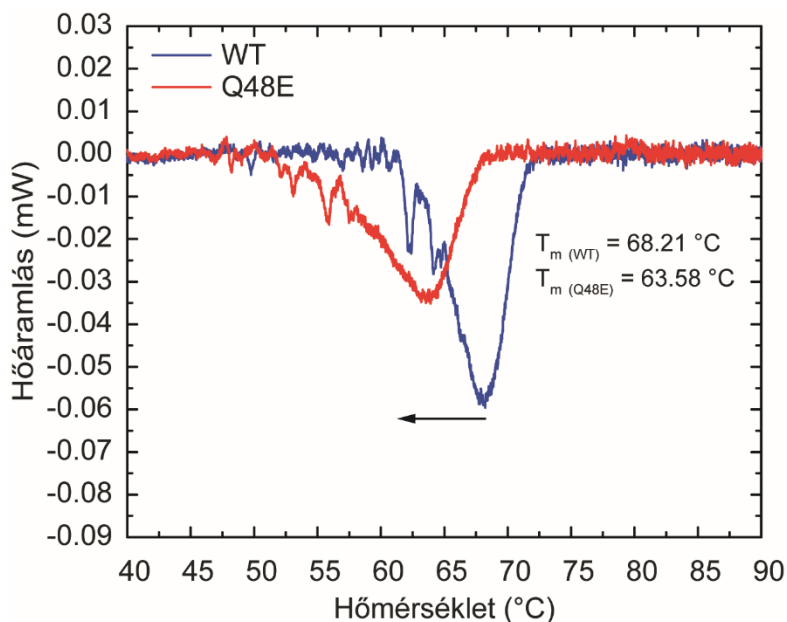
Kinetikai értékek	Vad típus	Q48E mutáns
$v_{max}$ (mM $\text{min}^{-1}$ )	$0.0644 \pm 0.0069$	$0.095 \pm 0.003$
$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	32.2	47.5
$K_M$ (mM)	$0.031 \pm 0.001$	$0.018 \pm 0.002$

**5.4 Táblázat** A táblázat a vad típusú OaPAC és a Q48E mutáns enzimatis a paramétereit tartalmazza. A mutáns esetében a sötét és világos állapotban kapott értékek megegyeztek.



*DSC mérések*

Mivel az OaPAC enzimaktivitása a Q48E mutációval jelentősen növekszik – ami a fehérje szerkezetének megváltozására utal – differenciál pásztázó kalorimetriás méréseket végeztünk a mutáns termostabilitásának vizsgálatára. Az **5.57 ábra** a vad típusú és a Q48E OaPAC hőáram DSC-görbéit mutatja, amelyeken az olvadási hőmérséklet ( $T_m$ ) azt mutatja, hogy hol denaturálódik a fehérje 50%-a, míg a görbe alatti terület a fehérje kibontakozásához szükséges energiát tükrözi, amely az entalpiaváltozással ( $\Delta H$ ) kapcsolatos. A mérések jelentős különbségeket mutatnak a vad típusú és a mutáns OaPAC között. Különösen a vad típusú OaPAC termikus denaturációja meredek endotermikus kibomlást mutat  $68,2\text{ °C}$ -os  $T_m$  értékkel és  $0,078\pm 0,005\text{ J/g}$   $\Delta H$  értékkel. A Q48E OaPAC  $T_m$ -je jelentősen alacsonyabb ( $T_m\ 63,6\text{ °C}$ ), de a kibomlás entalpiája  $\Delta H\ 0,072\pm 0,005\text{ J/g}$  nem változik jelentősen. Az alacsonyabb olvadási hőmérséklet a Q48E mutáns kevésbé kompakt és rugalmasabb konformációjára utal, ami a vad típusú OaPAC-hoz képest fokozott cAMP-termeléshez vezet.



**5.57 ábra** DSC mérések a vad típusú fehérjén és a Q48E mutánsan. A mérésből látszik, hogy a mutánsnak flexibilisebb szerkezete van.

Összefoglalva tehát, méréseink alapján az látszik, hogy a glutamin glutamátra való cserélése a flavin körüli hidrogén kötést rendszert olyan mértékben változtatja meg, hogy a gerjesztés által létrehozott strukturális változás nem képes a C-terminális rész felé haladni. A mutáció ugyanakkor egy olyan szerkezeti változást hoz létre, amely az adenilát cikláz folyamatos működéséhez vezet.

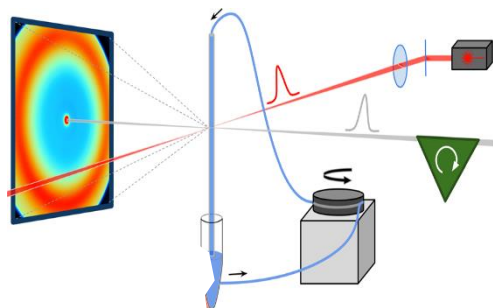
## 6. Kitekintés

Mint az előző fejezetekben bemutattam, ultragyors spektroszkópia segítségével jól karakterizálható a fotoaktív flavoproteinek fotokémiája, és részletes képet kaphatunk a gerjesztés után közvetlenül bekövetkező folyamatokról. Az újonnan megjelenő röntgenalapú szerkezeti technikák segíthetnek a fotokémiai események és a fehérjékben bekövetkező szerkezeti változások korrelációjában. Annak érdekében, hogy időben felbontott képet kapjunk a gerjesztés utáni szerkezeti változásokról, a közelmúltban széleskörű együttműködésben - Sofia Kapetanaki (IBS), Giorgio Schiro (IBS), David von Stetten, Arwen Pearson (DESY, Hamburg), EuXFEL - három különböző típusú kísérletet végeztünk elsősorban OaPAC mintákon.

### *Tranziens SAXS/WAXS mérések*

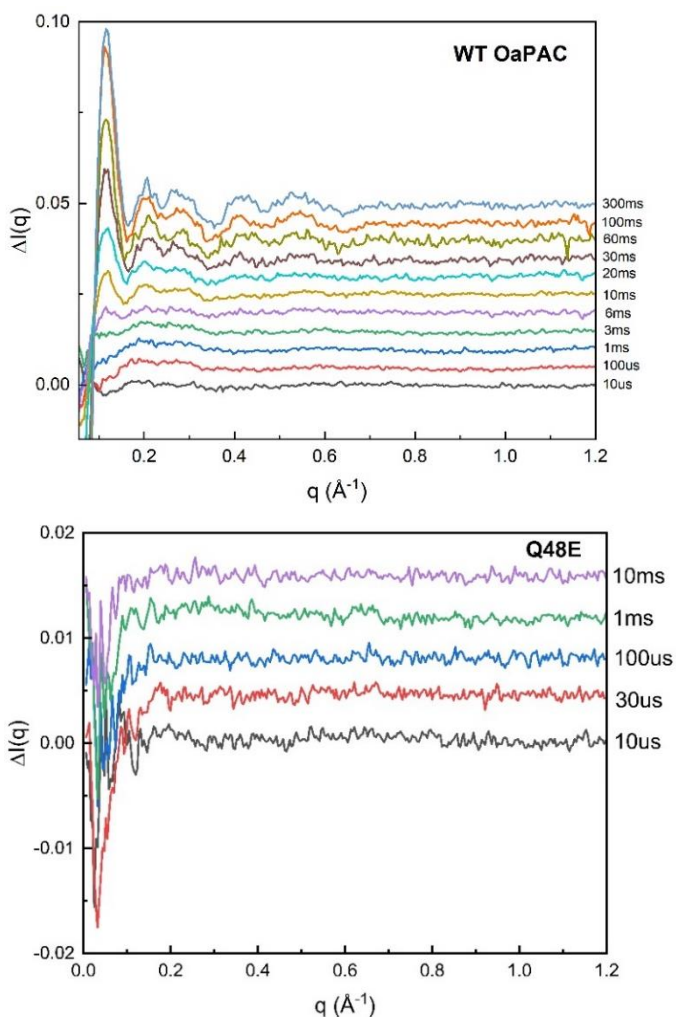
A fehérjeoldatból származó röntgensugár szórása azimutális irányban kiátlagolódik, de sugárirányban értékes információt ad. A kis szögű és nagy szögű röntgenszórásos kísérletek során a szórt intenzitás szögfüggését mérik. Ezt a függést az úgynevezett szórásvektorral jellemezzük,  $q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ , amely a szórásszög hullámhosszfüggését normalizálja.

A TR-SAXS/WAXS alapvetően egy hasonló, korábban már ismertetett pumpa-próba módszer, a fő különbség, hogy itt egy röntgenimpulzus a próbanyaláb: egy rövid lézertimpulzus indítja be a fotokémiát, a szórási adatokat pedig egy nagy felületű detektorral mérjük.



**6.1 ábra** A TR-SAXS/WAXS elrendezés sémája: a mintát egy kapillárisban áramoltatjuk, a piros impulzus a pumpa, a szürke impulzus a röntgenimpulzus (impulzus hossza 2-5  $\mu$ s) (forrás: Giorgio Schiro).

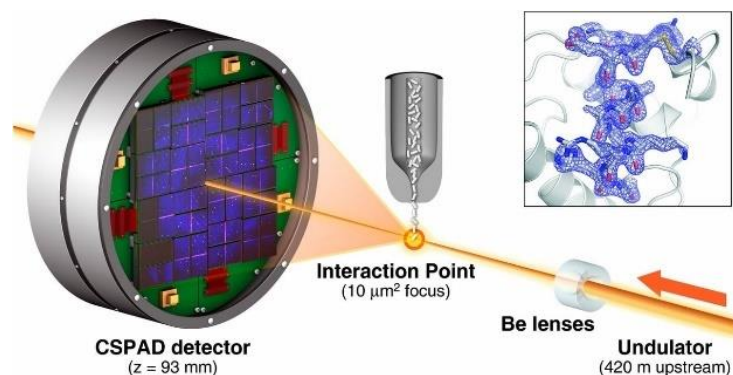
A vad típusú OaPAC esetében mért tranziens SAXS/WAXS adatok jól láthatóan időben jelentősen változnak, kis  $q$  értékek esetében jelentős növekedés figyelhető meg (**6.2 ábra**). Ez a tartomány a teljes fehérjében létrejövő változásoknak feleltethető meg, amiből az következik, hogy a fény hatására a fehérjében jelentős strukturális változások indulnak el. Ehhez képest a Q48E mutáns esetében nem figyelhető meg hasonló csúcsok és hasonló kinetika, ami arra utal, hogy a fény hatására bekövetkező strukturális változások csak a BLUF doménre lokalizálódnak és nem terjednek tovább az AC doménre.



**6.2 ábra** TR-WAXS mérések A) vad típusú OaPAC-on és B) a Q48E mutáns esetében. A vad típusú fehérjén mért adatsoron SVD analízist alkalmazva egy domináns komponens látszik, amelynek élettartama  $\tau = 50.1 \pm 3.7$  ms. Ezzel szemben a Q48E esetében kapott komponens 0.8 ms körül.

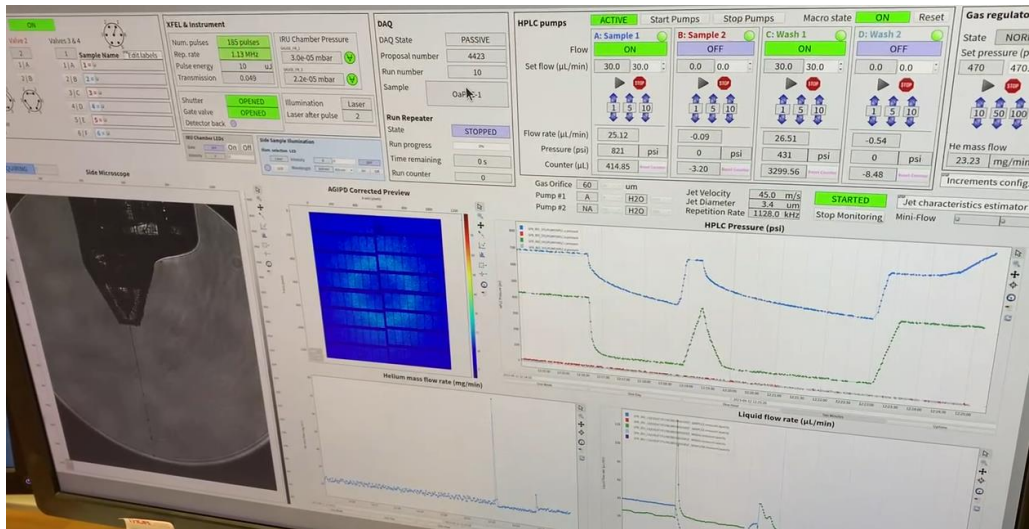
*Femtosekundumos röntgenkristallográfia (SFX)*

Az elmúlt években óriási lökést adott a szerkezeti vizsgálatoknak a szabad elektron lézereknek az elterjedése és használata. Az európai szabad elektron lézer (EuXFEL) 2017-ben készült el, az elsődleges elektron-forrás a hamburgi DESY szinkrotron, az onnan jövő nyalábot irányítják az undulátorokon keresztül a EuXFEL kísérleti csarnokába. A mérés egyszerűsített elve az alábbi ábrán látható: az undulátorokon való áthaladást követően nagyon rövid röntgen impulzusok jönnek létre, ezeket irányítják a mintára. A detektor közepén van egy lyuk itt halad át a direkt nyaláb annak érdekében, hogy a nagy energia ne tegye tönkre a detektort. A méréshez 20-50  $\mu\text{m}$  nagyságú kristályokat alkalmazunk, ezekről kapunk jó minőségű szórás jelet, a nagyobb kristályról érkező szórás olyan nagy energiával rendelkezik, hogy tönkre teszi a detektort. (Az EuXFEL általunk használt detektorán van néhány pont, ami kiégett, illetve egy pixel a mi méréseink alatt égett ki).



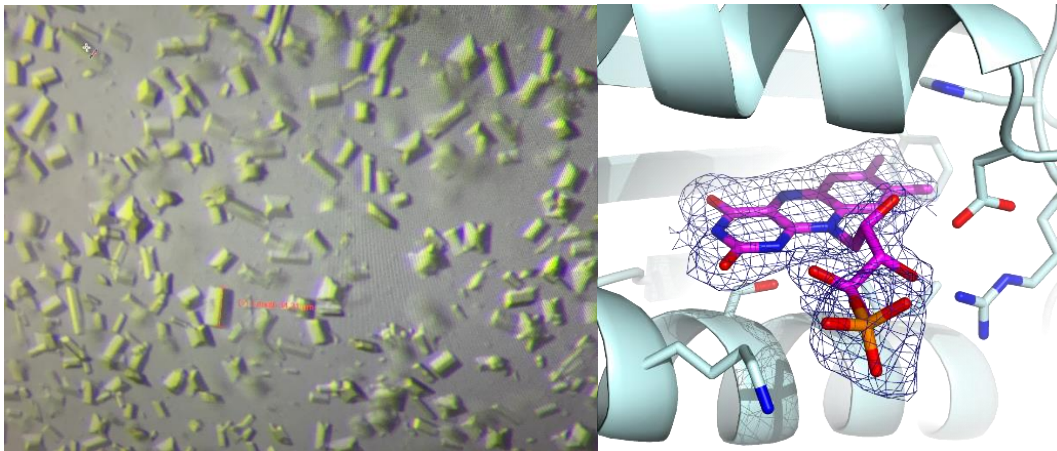
**6.3 ábra** Az XFEL mérés elvi rajza (forrás: Gruner, PNAS, 2014)

2022 októberében vad típusú OaPAC kristályokon végeztünk előkísérleteket. A kristályokat egy GVDN (gas dynamic nozzle) injektorttal áramoltattuk 2-3  $\mu\text{l}/\text{perc}$  sebességgel. Az injektor a **6.4 ábra** baloldalán látható, mellette látható a detektált diffrakciós mintázat. Ezen mérések során a kristályok és a diffrakció minőségét vizsgáltuk, de az időbeni függést még nem.



**6.4 ábra** Az XFEL mérés szoftverének injektáló panelje. Az ábra baloldalan látható a kristály „sugar”, amit a berendezés kibocsát.

A 6.5 ábra bal oldalán az általunk készített vad típusú OaPAC kristályok láthatóak, amelyek átlagos mérete  $20\ \mu\text{m}$  körül volt, az ábra jobb oldalán látható az általunk meghatározott sötét állapotú szerkezet, amelynek felbontása  $1.8\ \text{\AA}$ , ez kicsivel jobb, mint a korábban Ohki és munkatársai által meghatározott szerkezetek.

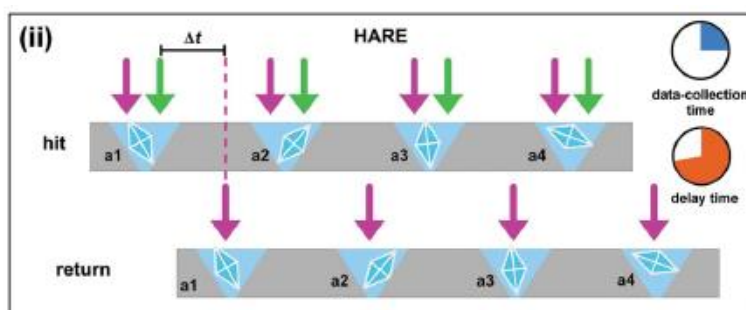


**6.4 ábra** Bal oldalon  $\sim 20\ \mu\text{m}$  nagyságú vad típusú OaPAC kristályok láthatóak. A jobb oldalsó ábrán látható az általunk meghatározott sötét állapotú szerkezet, amelynek felbontása  $1.8\ \text{\AA}$ .

*Időfelbontásos röntgenkristallográfia szinkrotron impulzusokkal (SSX)*

Azokban az esetekben, ahol nincs szükség femtoszekundumos időfelbontásra jó megoldás az időfüggő szinkrotron kristallográfia (Serial Synchrotron Crystallography = SSX)<sup>167,168</sup>. A harmadik és negyedik generációs szinkrotronok esetében az időfelbontás alapesetben a 100  $\mu$ s alatt van, és ez lecsökkenthető egészen a néhány száz pikoszekundumos határig, ez alatt inkább az előző paragrafusban említett XFEL-re van szükség.

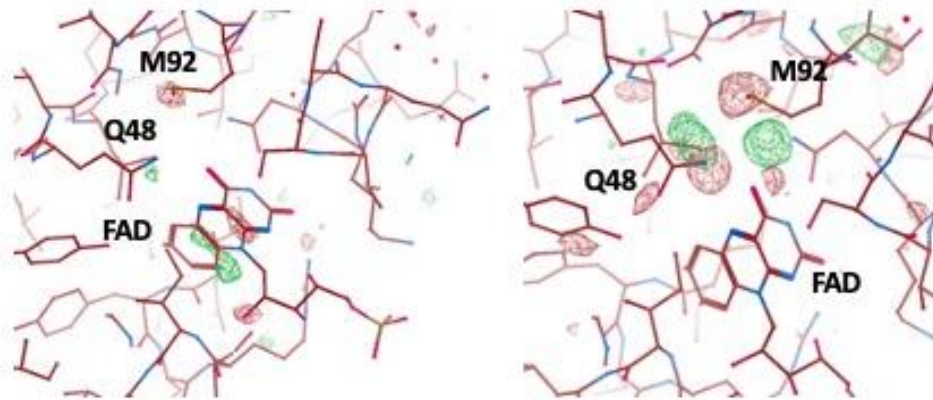
Az OaPAC szerkezetében bekövetkeztetett változások vizsgálatához a hamburgi DESY PETRA III szinkrotron EMBL P14-es nyalábját használtuk és a mikrokristályokat egy úgynevezett HARE (Hit and return) chip-re helyeztük fel. Ez az elrendezés, ahogy az alábbi ábrán is látszik lehetővé tette, hogy ugyanazt a mintát meghatározott késleltetést követően újra megvilágítsuk egy röntgen impulzussal. Ez a módszer sokkal kevesebb mintát igényelt, mint az XFEL-ben alkalmazott módszer, mivel a chip-en egy pozícióba mindössze 100-200  $\mu$ l mintát kell feltenni<sup>168,169</sup>.



**6.4 ábra** A HARE chip elvi rajza (Schulz et al., Acta Cryst. 2022)

Az első előzetes SSX-kísérletek nem teljesen várt eredményeket mutattak: A gerjesztés után 85 ms-t követően a Q48 és az M92 jelentős mozgása figyelhető meg. A WT OaPAC-on végzett átmeneti infravörös mérések azt mutatták, hogy a Q48 fényelnyelésre adott válasza pikoszekundumos időskálán, kevesebb mint 100 ps alatt történik. A TRIR és az SSX által kapott kép közötti szakadékot XFEL-ek alkalmazásával lehet kitölteni.





**6.5 ábra** Az első SSX mérés vad típusú OaPAC-on: Q-súlyozott Folight-Fodark Fourier-különbségtérkép  $\pm 3,5\sigma$  kontúrral (zöld, illetve piros), az Xtrapol87 segítségével 5 ms (balra) és 85 ms (jobbra) perióduson. (Sofia Kapetanaki (IBS), David von Stetten (DESY), Arwen Pearson (DESY) közreműködésével)



## 7. Összefoglalás

A továbbiakban azokat a megállapításokat összegzem, amelyet a saját munkám eredményének és új megállapításnak tartok.

- Polarizációs tranziens abszorpciós kísérletek segítségével megállapítottam, hogy vad típusú fotoliázban a ~30 ps-os fázis után a pozitív töltés 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.
- DFT számolás, izotópjelölés és infravörös tranziens abszorpciós mérések segítségével meghatároztam a FAD vibrációs markereit a flavin öt redox állapotában ( $\text{FAD}_{\text{ox}}$ ,  $\text{FADH}^-$ ,  $\text{FAHD}_2$ ,  $\text{FAD}^{\bullet-}$ ,  $\text{FADH}^\bullet$ ); meghatároztam valamint a kation és semleges tirozin gyök ( $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ ,  $\text{Tyr}^\bullet$ ) és a triptofán kation gyök ( $\text{TrpH}^{\bullet+}$ ) vibrációs markereit.
- A tirozin és a triptofán gyökök vibrációs markereinek ismeretében sikerült leírni igazolni, hogy a glükóz oxidázban a gerjesztéssel egyidejűleg (néhány száz femtoszekundumon belül) valósul meg az elektron transzfer a tirozintról, ezt követi egy proton transzfer a tirozintól az anionos flavin gyökre ( $\text{FAD}^{\bullet-}$ ) létrehozva a semleges gyök állapotot ( $\text{FADH}^\bullet$ ). Azt is sikerült igazolni, hogy a tirozin mellett a triptofán is részt vehet az elektron transzfer folyamatban.
- Tranziens abszorpciós mérésekkel sikerült feltárni, hogy a flavin N5 atomjához közeli aszparagin aminosav aszpartátra való cseréje nem elegendő ahhoz, hogy a fotoliáz növényi kriptokrómként viselkedjen.
- Látható és infravörös tranziens abszorpciós mérések segítségével bizonyítottam, hogy az AppA fotoaktivációja a flavin N5 atomjához közeli glutamin (Q63) tautomerizációjával valósul meg.
- Infravörös tranziens abszorpciós mérésekkel és  $^{13}\text{C}$  izotóp jelöléssel igazoltam, hogy az AppA fotoaktivációja során nem jelennek meg flavin gyökök
- Fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekkel, infravörös tranziens abszorpciós mérésekkel igazoltam, hogy az AppA fotoaktivációja során a W104 triptofán a flavinhoz közeli pozícióba mozdul és hidrogén kötést alkot a FAD-dal.
- Látható és infravörös tranziens abszorpciós mérésekkel igazoltam, hogy az OaPAC fotoaktivációja proton kapcsolt elektron transzfer segítségével valósul meg, mesterséges tirozinok alkalmazásával igazoltam, hogy a proton transzfer kiiktatása az enzim funkcióvesztéséhez vezet.

- Tranziens fluoreszcencia spektroszkópai valamint tranziens abszorpciós mérések segítségével igazoltam, hogy az elektron transzfer felgyorsítása OaPAC-ben az enzimatis aktivitás növekedéséhez vezet.
- Látható és tranziens infravörös tranziens abszorpciós mérések segítségével igazoltam, hogy OaPAC-ben a flavin N5 atomjához közeli glutamin glutamátra való cseréje az enzimet folyamatosan bekapcsolt állapotban tartja.

## 8. Irodalomjegyzék

- 1 Herrmann, J. M. & Dick, T. P. Redox Biology on the rise. *Biol Chem* **393**, 999-1004 (2012).  
<https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0111>
- 2 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>
- 3 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>
- 4 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>
- 5 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>
- 6 Losi, A. in *Flavins: Photochemistry and Photobiology* Vol. 6 217-269 (The Royal Society of Chemistry, 2006).
- 7 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>
- 8 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>
- 9 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>
- 10 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>
- 11 Deisseroth, K. Controlling the Brain with Light. *Scientific American* **303**, 48-55 (2010).  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican1110-48>
- 12 Deisseroth, K. Optogenetics. *Nature Methods* **8**, 26-29 (2011).  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324> | 10.1038/NMETH.F.324
- 13 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>
- 14 Hegemann, P. & Moglich, A. Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nature Methods* **8**, 39-42 (2011).  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.327> | 10.1038/NMETH.F.327
- 15 Wu, Y. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* **461**, 104-U111 (2009). <https://doi.org/10.1038/nature08241>
- 16 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>
- 17 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>

- 18 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>
- 19 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>
- 20 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>
- 21 Brust, R. *et al.* Proteins in action: femtosecond to millisecond structural dynamics of a photoactive flavoprotein. *J Am Chem Soc* **135**, 16168-16174 (2013).  
<https://doi.org/10.1021/ja407265p>
- 22 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>
- 23 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>
- 24 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>
- 25 Miura, R. Versatility and specificity in flavoenzymes: Control mechanisms of flavin reactivity. *Chemical Record* **1**, 183-194 (2001). <https://doi.org/10.1002/tcr.1007>
- 26 Sancar, A. Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chem. Rev.* **103**, 2203-2238 (2003).
- 27 Ritz, T. *et al.* Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys J* **96**, 3451-3457 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.072>
- 28 Dodson, C. A., Hore, P. J. & Wallace, M. I. A radical sense of direction: signalling and mechanism in cryptochrome magnetoreception. *Trends Biochem Sci* **38**, 435-446 (2013).  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.002>
- 29 STRICKLAND, D. & MOUROU, G. COMPRESSION OF AMPLIFIED CHIRPED OPTICAL PULSES. *Optics Communications* **55**, 447-449 (1985). [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(85\)90151-8](https://doi.org/10.1016/0030-4018(85)90151-8)
- 30 STRICKLAND, D., MAINE, P. & MOUROU, G. GENERATION OF ULTRAHIGH PEAK POWER PULSES WITH THE TECHNIQUE OF CHIRPED PULSE AMPLIFICATION. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision* **3**, P97-P97 (1986).
- 31 Laptенок, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A. & Vos, M. H. Subpicosecond Kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol Biol* **1076**, 321-336 (2014). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_13)
- 32 Greetham, G. *et al.* ULTRA: A Unique Instrument for Time-Resolved Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **64**, 1311-1319 (2010). <https://doi.org/10.1366/000370210793561673>
- 33 Massey, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans* **28**, 283-296 (2000).
- 34 Li, G. & Glusac, K. D. Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors. *J Phys Chem A* **112**, 4573-4583 (2008). <https://doi.org/10.1021/jp7117218>
- 35 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>
- 36 Zhong, D. & Zewail, A. H. Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11867-11872 (2001). <https://doi.org/10.1073/pnas.211440398>

- 37 Nag, L., Lukacs, A. & Vos, M. H. Short-Lived Radical Intermediates in the Photochemistry of Glucose Oxidase. *Chemphyschem* **20**, 1793-1798 (2019). <https://doi.org/10.1002/cphc.201900329>
- 38 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>
- 39 Mataga, N. *et al.* Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 10667-10677 (2000). <https://doi.org/10.1021/jp002145y>
- 40 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>
- 41 Auldridge, M. E. *et al.* LucY: A Versatile New Fluorescent Reporter Protein. *PLoS One* **10**, e0124272 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124272>
- 42 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. *J Phys Chem B* **110**, 15654-15658 (2006). <https://doi.org/10.1021/jp063686b>
- 43 Lukacs, A., Eker, A. P., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. H. Electron hopping through the 15 A triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J Am Chem Soc* **130**, 14394-14395 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja805261m>
- 44 Eisenberg, A. S. & Schelvis, J. P. Contributions of the 8-methyl group to the vibrational normal modes of flavin mononucleotide and its 5-methyl semiquinone radical. *J Phys Chem A* **112**, 6179-6189 (2008). <https://doi.org/10.1021/jp711832g>
- 45 Kao, Y. *et al.* Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 13132-13139 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja8045469>
- 46 Pan, J. *et al.* Excited-state properties of flavin radicals in flavoproteins: Femtosecond spectroscopy of DNA photolyase, glucose oxidase, and flavodoxin. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 10160-10167 (2004). <https://doi.org/10.1021/jp037837b>
- 47 Zhao, R. K. *et al.* Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully reduced flavins. *Phys Chem Chem Phys* **13**, 17642-17648 (2011). <https://doi.org/10.1039/c1cp22097g>
- 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 Schroeder, L., Oldemeyer, S. & Kottke, T. Time-Resolved Infrared Spectroscopy on Plant Cryptochrome-Relevance of Proton Transfer and ATP Binding for Signaling. *Journal of Physical Chemistry a* **122**, 140-147 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b10249>
- 50 Iwata, T., Zhang, Y., Hitomi, K., Getzoff, E. D. & Kandori, H. Key dynamics of conserved asparagine in a cryptochrome/photolyase family protein by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **49**, 8882-8891 (2010). <https://doi.org/10.1021/bi1009979>
- 51 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>
- 52 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>
- 53 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>

- 54 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>
- 55 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>
- 56 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>
- 57 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>
- 58 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>
- 59 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>
- 60 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>
- 61 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>
- 62 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>
- 63 RUPERT, C. S., GOODGAL, S. H. & HERRIOTT, R. M. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated Hemophilus influenzae transforming factor. *J Gen Physiol* **41**, 451-471 (1958). <https://doi.org/10.1085/jgp.41.3.451>
- 64 Byrdin, M. *et al.* Quantum Yield Measurements of Short-Lived Photoactivation Intermediates in DNA Photolyase: Toward a Detailed Understanding of the Triple Tryptophan Electron Transfer Chain. *Journal of Physical Chemistry a* **114**, 3207-3214 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp9093589>
- 65 Müller, P., Brettel, K., Grama, L., Nyitrai, M. & Lukacs, A. Photochemistry of Wild-Type and N378D Mutant E. coli DNA Photolyase with Oxidized FAD Cofactor Studied by Transient Absorption Spectroscopy. *Chemphyschem* **17**, 1329-1340 (2016). <https://doi.org/10.1002/cphc.201501077>
- 66 Heelis, P. F., Payne, G. & Sancar, A. Photochemical Properties of Escherichia-Coli DNA Photolyase - Selective Photodecomposition of the 2Nd Chromophore. *Biochemistry* **26**, 4634-4640 (1987).
- 67 Jorns, M. S., Wang, B. & Jordan, S. P. DNA-Repair Catalyzed by Escherichia-Coli DNA Photolyase Containing Only Reduced Flavin - Elimination of the Enzymes 2Nd Chromophore by Reduction with Sodium-Borohydride. *Biochemistry* **26**, 6810-6816 (1987).
- 68 Payne, G. & Sancar, A. Absolute Action Spectrum of E-Fadh2 and E-Fadh2-Mthf Forms of Escherichia-Coli DNA Photolyase. *Biochemistry* **29**, 7715-7727 (1990).
- 69 Jorns, M. S., Wang, B. Y., Jordan, S. P. & Chanderkar, L. P. Chromophore Function and Interaction in Escherichia-Coli DNA Photolyase - Reconstitution of the Apoenzyme with Pterin and or Flavin Derivatives. *Biochemistry* **29**, 552-561 (1990).



- 70 Lipman, R. S. A. & Jorns, M. S. Direct Evidence for Singlet Singlet Energy-Transfer in Escherichia-Coli DNA Photolyase. *Biochemistry* **31**, 786-791 (1992).
- 71 Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L. J., Sancar, A. & Zhong, D. P. Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16128-16132 (2005).
- 72 Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5423-5427 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5423>
- 73 Byrdin, M., Eker, A. P. M., Vos, M. H. & Brettel, K. Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *PNAS* **100**, 8676-8681 (2003).
- 74 Liu, Z. *et al.* Dynamic Determination of Active-Site Reactivity in Semiquinone Photolyase by the Cofactor Photoreduction. *J Phys Chem Lett* **5**, 820-825 (2014). <https://doi.org/10.1021/jz500077s>
- 75 Zeugner, A. *et al.* Light-induced electron transfer in *Arabidopsis* cryptochrome-1 correlates with *in vivo* function. *J Biol Chem* **280**, 19437-19440 (2005). <https://doi.org/10.1074/jbc.C500077200>
- 76 Berndt, A. *et al.* A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 13011-13021 (2007). <https://doi.org/10.1074/jbc.M608872200>
- 77 Müller, P. & Bouly, J. P. Searching for the mechanism of signalling by plant photoreceptor cryptochrome. *FEBS Lett* **589**, 189-192 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.008>
- 78 Solov'yov, I. A., Domratcheva, T., Moughal Shahi, A. R. & Schulten, K. Decrypting cryptochrome: revealing the molecular identity of the photoactivation reaction. *J Am Chem Soc* **134**, 18046-18052 (2012). <https://doi.org/10.1021/ja3074819>
- 79 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>
- 80 Langenbacher, T., Immeln, D., Dick, B. & Kottke, T. Microsecond Light-induced Proton Transfer to Flavin in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 14274-14280 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja901628y>
- 81 Müller, P., Yamamoto, J., Martin, R., Iwai, S. & Brettel, K. Discovery and functional analysis of a 4th electron-transferring tryptophan conserved exclusively in animal cryptochromes and (6-4) photolyases. *Chem Commun (Camb)* **51**, 15502-15505 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5cc06276d>
- 82 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>
- 83 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>
- 84 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>
- 85 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>

- 86 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>
- 87 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>
- 88 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>
- 89 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>
- 90 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>
- 91 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>
- 92 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>
- 93 Sorigué, D. *et al.* An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons. *Science* **357**, 903-907 (2017). <https://doi.org/10.1126/science.aan6349>
- 94 Iuliano, J. N. *et al.* Unraveling the Mechanism of a LOV Domain Optogenetic Sensor: A Glutamine Lever Induces Unfolding of the J $\alpha$  Helix. *ACS Chem Biol* **15**, 2752-2765 (2020). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00543>
- 95 Iuliano, J. *et al.* Unraveling the Mechanism of a LOV Domain Optogenetic Sensor: A Glutamine Lever Induces Unfolding of the J alpha Helix. *Acs Chemical Biology* **15**, 2752-2765 (2020). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00543>
- 96 Thoing, C., Oldemeyer, S. & Kottke, T. Microsecond Deprotonation of Aspartic Acid and Response of the alpha/beta Subdomain Precede C-Terminal Signaling in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 5990-5999 (2015). <https://doi.org/10.1021/jacs.5b01404>
- 97 Iseki, M. *et al.* A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**, 1047-1051 (2002). <https://doi.org/10.1038/4151047a>
- 98 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>
- 99 Okajima, K. *et al.* Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J Biochem* **137**, 741-750 (2005). <https://doi.org/10.1093/jb/mvi089>
- 100 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>
- 101 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>



- 102 Stelling, A. L., Ronayne, K. L., Nappa, J., Tonge, P. J. & Meech, S. R. Ultrafast Structural Dynamics in BLUF Domains: Transient Infrared Spectroscopy of AppA and Its Mutants. *JACS* **129**, 15556-15564 (2007). <https://doi.org/10.1021/ja074074n>
- 103 Haigney, A. *et al.* Ultrafast infrared spectroscopy of an isotope-labeled photoactivatable flavoprotein. *Biochemistry* **50**, 1321-1328 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi101589a>
- 104 Haigney, A. *et al.* Vibrational assignment of the ultrafast infrared spectrum of the photoactivatable flavoprotein AppA. *J Phys Chem B* **116**, 10722-10729 (2012). <https://doi.org/10.1021/jp305220m>
- 105 Iuliano, J. N. *et al.* Excited State Vibrations of Isotopically Labeled FMN Free and Bound to a Light-Oxygen-Voltage (LOV) Protein. *J Phys Chem B* **124**, 7152-7165 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04943>
- 106 Green, D. *et al.* Excited State Resonance Raman of Flavin Mononucleotide: Comparison of Theory and Experiment. *J Phys Chem A* **125**, 6171-6179 (2021). <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.1c04063>
- 107 Dragnea, V., Arunkumar, A., Lee, C., Giedroc, D. & Bauer, C. A Q63E Rhodobacter sphaeroides AppA BLUF Domain Mutant Is Locked in a Pseudo-Light-Excited Signaling State. *Biochemistry* **49**, 10682-10690 (2010). <https://doi.org/10.1021/bi1002162>
- 108 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>
- 109 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>
- 110 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>
- 111 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>
- 112 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>
- 113 Greetham, G. *et al.* Time-resolved multiple probe spectroscopy. *Review of Scientific Instruments* **83** (2012). <https://doi.org/10.1063/1.4758999>
- 114 Masuda, S., Hasegawa, K., Ishii, A. & Ono, T. A. Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of synechocystis sp. PCC6803. *Biochemistry* **43**, 5304-5313 (2004). <https://doi.org/10.1021/bi049836v>
- 115 Jung, A., Reinstein, J., Domratcheva, T., Shoeman, R. L. & Schlichting, I. Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction. *J Mol Biol* **362**, 717-732 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.024>
- 116 Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2006).
- 117 Szabo, A. G., Lynn, K. R., Krajcarski, D. T. & Rayner, D. M. Tyrosinate fluorescence maxima at 345 nm in proteins lacking tryptophan at pH 7. *FEBS Lett* **94**, 249-252 (1978). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80948-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80948-x)
- 118 Petrović, D. M., Leenhouts, K., van Roosmalen, M. L. & Broos, J. An expression system for the efficient incorporation of an expanded set of tryptophan analogues. *Amino Acids* **44**, 1329-1336 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1467-3>
- 119 Broos, J. Biosynthetic incorporation of tryptophan analogs in proteins. *Methods Mol Biol* **1076**, 359-370 (2014). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_15)

- 120 Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. & Dutton, P. L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52 (1999).  
<https://doi.org/10.1038/46972>
- 121 Moskvina, O. V., Kaplan, S., Gilles-Gonzalez, M. A. & Gomelsky, M. Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history. *J Biol Chem* **282**, 28740-28748 (2007).  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M703261200>
- 122 Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G. & Gomelsky, M. Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *J Bacteriol* **186**, 7726-7735 (2004).  
<https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7726-7735.2004>
- 123 Gomelsky, M. & Kaplan, S. appA, a novel gene encoding a trans-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **177**, 4609-4618 (1995). <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4609-4618.1995>
- 124 Gomelsky, M. & Kaplan, S. Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of puc and bchF expression. *J Bacteriol* **177**, 1634-1637 (1995).  
<https://doi.org/10.1128/jb.177.6.1634-1637.1995>
- 125 Gomelsky, M. & Kaplan, S. The *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 rho gene: expression and genetic analysis of structure and function. *J Bacteriol* **178**, 1946-1954 (1996).  
<https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1946-1954.1996>
- 126 Kapetanaki, S. M. *et al.* Molecular insights into the role of heme in the transcriptional regulatory system AppA/PpsR. *Biophys J* **121**, 2135-2151 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.031>
- 127 Yin, L. *et al.* Redox and Light Control the Heme-Sensing Activity of AppA. *Mbio* **4** (2013).  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00563-13>
- 128 Yin, L., Dragnea, V. & Bauer, C. PpsR, a Regulator of Heme and Bacteriochlorophyll Biosynthesis, Is a Heme-sensing Protein. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 13850-13858 (2012).  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346494>
- 129 Winkler, A. *et al.* A ternary AppA-PpsR-DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 859-867 (2013).  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2597>
- 130 Salman, M., Villamil Franco, C., Ramodiharilafy, R., Liebl, U. & Vos, M. H. Interaction of the Full-Length Heme-Based CO Sensor Protein RcoM-2 with Ligands. *Biochemistry* **58**, 4028-4034 (2019).  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00623>
- 131 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>
- 132 Jansen, V. *et al.* Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *Elife* **4** (2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05161>
- 133 Ohki, M. *et al.* Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*. *Acta Crystallographica A-Foundation and Advances* **72**, S251-S251 (2016). <https://doi.org/10.1107/S2053273316096194>
- 134 Ohki, M. *et al.* Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate 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>
- 135 Chitrakar, I. *et al.* Structural Basis for the Regulation of Biofilm Formation and Iron Uptake in *A. baumannii* by the Blue-Light-Using Photoreceptor, BlsA. *ACS Infect Dis* **6**, 2592-2603 (2020).  
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00156>
- 136 Hall, C. R. *et al.* Site-Specific Protein Dynamics Probed by Ultrafast Infrared Spectroscopy of a Noncanonical Amino Acid. *J Phys Chem B* **123**, 9592-9597 (2019).  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09425>

- 137 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>
- 138 Hirano, M., Takebe, M., Ishido, T., Ide, T. & Matsunaga, S. The C-terminal region affects the activity of photoactivated adenylyl cyclase from *Oscillatoria acuminata*. *Scientific Reports* **9** (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56721-3>
- 139 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>
- 140 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>
- 141 Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *PNAS* **113**, 6659-6664 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1517520113>
- 142 Stierl, M., Penzkofer, A., Kennis, J. T., Hegemann, P. & Mathes, T. Key residues for the light regulation of the blue light-activated adenylyl cyclase from *Beggiatoa* sp. *Biochemistry* **53**, 5121-5130 (2014). <https://doi.org/10.1021/bi500479v>
- 143 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)
- 144 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>
- 145 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>
- 146 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>
- 147 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>
- 148 Goings, J. & Hammes-Schiffer, S. Early Photocycle of Slr1694 Blue-Light Using Flavin Photoreceptor Unraveled through Adiabatic Excited-State Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 20470-20479 (2019). <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11196>
- 149 Gil, A. A. *et al.* Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues. *JACS* **139**, 14638-14648 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07849>
- 150 Collado, J. *et al.* Unraveling the Photoactivation Mechanism of a Light-Activated Adenylyl Cyclase Using Ultrafast Spectroscopy Coupled with Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *Acs Chemical Biology* **17**, 2643-2654 (2022). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00575>
- 151 Stierl, M., Penzkofer, A., Kennis, J., Hegemann, P. & Mathes, T. Key Residues for the Light Regulation of the Blue Light-Activated Adenylyl Cyclase from *Beggiatoa* sp. *Biochemistry* **53**, 5121-5130 (2014). <https://doi.org/10.1021/bi500479v>

- 152 Okajima, K. *et al.* Fate determination of the flavin photoreceptions in the cyanobacterial blue light receptor TePixD (Tll0078). *J Mol Biol* **363**, 10-18 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.005>
- 153 Fukushima, Y., Murai, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M. & Itoh, S. Photoreactions of Tyr8- and Gln50-mutated BLUF domains of the PixD protein of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: photoconversion at low temperature without Tyr8. *Biochemistry* **47**, 660-669 (2008). <https://doi.org/10.1021/bi700674w>
- 154 Yuan, H. *et al.* Crystal structures of the *Synechocystis* photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry* **45**, 12687-12694 (2006). <https://doi.org/10.1021/bi061435n>
- 155 Udvarhelyi, A. & Domratcheva, T. Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: a mechanistic reappraisal. *J Phys Chem B* **117**, 2888-2897 (2013). <https://doi.org/10.1021/jp400437x>
- 156 Domratcheva, T., Hartmann, E., Schlichting, I. & Kottke, T. Evidence for Tautomerisation of Glutamine in BLUF Blue Light Receptors by Vibrational Spectroscopy and Computational Chemistry. *Sci Rep* **6**, 22669 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22669>
- 157 Hontani, Y. *et al.* Spectroscopic and Computational Observation of Glutamine Tautomerization in the Blue Light Sensing Using Flavin Domain Photoreaction. *J Am Chem Soc* **145**, 1040-1052 (2023). <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10621>
- 158 Konold, P. E. *et al.* Confinement in crystal lattice alters entire photocycle pathway of the Photoactive Yellow Protein. *Nat Commun* **11**, 4248 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18065-9>
- 159 TONGE, P., MOORE, G. & WHARTON, C. FOURIER-TRANSFORM INFRARED STUDIES OF THE ALKALINE ISOMERIZATION OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME-C AND THE IONIZATION OF CARBOXYLIC-ACIDS. *Biochemical Journal* **258**, 599-605 (1989). <https://doi.org/10.1042/bj2580599>
- 160 FAHMY, K. *et al.* PROTONATION STATES OF MEMBRANE-EMBEDDED CARBOXYLIC-ACID GROUPS IN RHODOPSIN AND METARHODOPSIN-II - A FOURIER-TRANSFORM INFRARED-SPECTROSCOPY STUDY OF SITE-DIRECTED MUTANTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10206-10210 (1993). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10206>
- 161 Lubben, M. & Gerwert, K. Redox FTIR difference spectroscopy using caged electrons reveals contributions of carboxyl groups to the catalytic mechanism of haem-copper oxidases. *Febs Letters* **397**, 303-307 (1996). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01174-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01174-X)
- 162 Dioumaev, A. Infrared methods for monitoring the protonation state of carboxylic amino acids in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry-Moscow* **66**, 1269-1276 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1013135419529>
- 163 Chen, Z. *et al.* Dissecting the Ultrafast Stepwise Bidirectional Proton Relay in a Blue-Light Photoreceptor. *J Am Chem Soc* **145**, 3394-3400 (2023). <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10206>
- 164 Zhou, Z. *et al.* The nature of proton-coupled electron transfer in a blue light using flavin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2203996119 (2022). <https://doi.org/10.1073/pnas.2203996119>
- 165 DIXON, W. & MURPHY, D. DETERMINATION OF ACIDITY CONSTANTS OF SOME PHENOL RADICAL CATIONS BY MEANS OF ELECTRON-SPIN RESONANCE. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **72**, 1221-1230 (1976). <https://doi.org/10.1039/f29767201221>
- 166 Solar, S., Gtoff, N., Surdhar, P. S., Armstrong, D. A. & Singh, A. Vol. 95 3639-3643 (Journal of Physical Chemistry, 1991).
- 167 Pearson, A. R. & Mehrabi, P. Serial synchrotron crystallography for time-resolved structural biology. *Curr Opin Struct Biol* **65**, 168-174 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.019>

- 168 Schulz, E. C., Yorke, B. A., Pearson, A. R. & Mehrabi, P. Best practices for time-resolved serial synchrotron crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **78**, 14-29 (2022). <https://doi.org/10.1107/S2059798321011621>
- 169 Mehrabi, P. *et al.* The HARE chip for efficient time-resolved serial synchrotron crystallography. *J Synchrotron Radiat* **27**, 360-370 (2020). <https://doi.org/10.1107/S1600577520000685>

## 9. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

**Lukacs A**, Eker AP, Byrdin M , Brettel K , Vos MH Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J. Am. Chem. Soc.* 130:(44) pp. 14394-14395. (2008) IF: 8,091

Haigney Allison, **Lukacs Andras** , Zhao Rui-Kun , Stelling Allison L , Brust Richard , Kim Ryu-Ryun , Kondo Minako , Clark Ian , Towrie Michael , Greetham Gregory M , Illarionov Boris , Adelbert Bacher , Werner Romisch-Margl , Markus Fischer , Stephen R Meech , Peter J Tonge Ultrafast Infrared Spectroscopy of an Isotope-Labeled Photoactivatable Flavoprotein *Biochemistry* 50:(8) pp. 1321-1328. (2011) IF: 3,422

**Lukacs Andras**, Haigney Allison, Brust Richard , Zhao Rui-Kun , Stelling Allison L , Clark Ian P , Towrie Michael , Greetham Gregory M , Meech Stephen R , Tonge Peter J Photoexcitation of the Blue Light Using FAD Photoreceptor AppA Results in Ultrafast Changes to the Protein Matrix *J. Am. Chem. Soc.* 133:(42) pp. 16893-16900. (2011) IF:9,907

**Lukacs A**, Zhao RK , Haigney A , Brust R , Greetham GM , Towrie M , Tonge PJ , Meech SR 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:(20) pp. 5810-5818. (2012) IF:3,607

Brust Richard , **Lukacs Andras**, Haigney Allison , Addison Kiri , Gil Agnieszka , Towrie Michael, Clark Ian P , Greetham Gregory M , Tonge Peter J , Meech Stephen R Proteins in Action: femtosecond to Millisecond Structural Dynamics of a Photoactive Flavoprotein *J. Am. Chem. Soc.* 135:(43) pp. 16168-16174. (2013) IF:11,444

**Lukacs Andras**, Brust Richard James , Haigney Allison Laura , Laptinok Sergey P , Addison Kiri, Gil Agnieszka , Towrie Michael , Greetham Gregory M , Tonge Peter J , Meech Stephen Roy BLUF Domain Function Does Not Require a Metastable Radical Intermediate State *J. Am. Chem. Soc.* 136:(12) pp. 4605-4615. (2014) IF:12,113

Klaus Brettel , Pavel Müller , Laszlo Grama , Miklos Nyitrai , **Andras Lukacs** Photochemistry of Wild Type and N378D Mutant E. coli DNA Photolyase with Oxidized FAD Cofactor Studied by Transient Absorption Spectroscopy *ChemphysChem:* 17:(9) pp. 1329-1340. (2016) IF:3,075

Nag, Lipsa; **Lukacs, Andras**; Vos, Marten Short-lived radical intermediates in the photochemistry of glucose oxidase *ChemphysChem:* (2019) IF: 3.077

Karadi, Kristof ; M. Kapetanaki, Sofia ; Raics, Katalin ; Pecs, Ildiko ; Kapronczai, Robert ; Fekete, Zsuzsanna; Iuliano, James ; Tolentino Collado, Jinnette ; Gil, Agnieszka ; Orban, Jozsef, Nyitrai Miklos, M. Greetham Greg, H. Vos Marten, J. Tonge Peter, R. Meech Stephen, **Lukacs Andras**: Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy, *Sci. Rep.* 10 Paper: 2061 , 15 p. (2020) IF:4.122

Pirisi, Katalin ; Nag, Lipsa ; Fekete, Zsuzsanna ; Iuliano, James N. ; Tolentino Collado, Jinnette ; Clark, Ian P. ; Pécsi, Ildikó ; Sournia, Pierre ; Liebl, Ursula ; Greetham, Gregory M., Peter J. Tonge, Stephen R. Meech, Marten H. Vos, **Andras Lukacs** Identification of the vibrational marker of tyrosine cation radical using ultrafast transient infrared spectroscopy of flavoprotein systems *Photochem Photobiol Sci* 20 : 3 pp. 369-378. , 10 p. (2021) IF: 3.982

**Lukacs, Andras**; Tonge, Peter J ; Meech, Stephen R: Photophysics of the Blue Light Using Flavin Domain. *Acc Chem Res* 55 : 3 pp. 402-414. , 13 p. (2022) IF: 24.466

Kapetanaki Sofia M., Fekete Zsuzsanna, Dorlet Pierre, Vos Marten H., Liebl Ursula, **Lukacs Andras** Molecular insights into the role of heme in the transcriptional regulatory system AppA/PpsR. *Biophys J* 121 : 11 pp. 2135-2151. , 17 p. (2022) IF: 3.699

Tolentino Collado Jinnette, Iuliano James N., Pirisi Katalin, Jewlikar Samruddhi, Adamczyk Katrin, Greetham Gregory M., Towrie Michael, Tame Jeremy R. H., Meech Stephen R., Tonge Peter J., **Lukacs Andras**, Unraveling the Photoactivation Mechanism of a Light-Activated Adenylyl Cyclase Using Ultrafast Spectroscopy Coupled with Unnatural Amino Acid Mutagenesis *Acs Chemical Biology* 17, 2643-2654, (2022) IF: 4.634

Katalin Raics; Katalin Pirisi; Bo Zhuang; Zsuzsanna Fekete; Nikolett Kis-Bicskei; Ildiko Pecs; Kinga Pozsonyi Ujfalusi; Elek Telek; Yin Li; Jinnette Tolentino Collado; Peter J. Tonge; Stephen R. Meech; Marten H. Vos; Eموke Bodis; **Andras Lukacs**; Photocycle alteration and increased enzymatic activity in genetically modified photoactivable adenylyl cyclase OaPAC; *J. Biol. Chem.* 299, 105056 , 11 p (2023) IF: 5.5

Jinnette Tolentino Collado<sup>#</sup> , Eموke Bodis<sup>#</sup>, Jonatan Pasitka, Mihaly Szucs, Zsuzsanna Fekete, Nikolett Kis-Bicskei, Elek Telek, Kinga Pozsonyi, Sofia M. Kapetanaki, Greg Greetham, Peter J. Tonge, Stephen R. Meech, and **Andras Lukacs**; Single amino acid mutation decouples photochemistry of the BLUF domain from the enzymatic function of OaPAC and drives the enzyme to a switched-on state, *J. Mol. Biol.* (2023), *accepted* IF: 5.6



## 10. A témához tartozó egyéb közlemények

Telek, Elek ; Ujfalusi, Zoltán ; Kemenesi, Gábor ; Zana, Brigitta ; Jakab, Ferenc ; Hild, Gabriella ; Lukács, András; Hild, Gábor A Possible Way to Relate the Effects of SARS-CoV-2-Induced Changes in Transferrin to Severe COVID-19-Associated Diseases INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 23 : 11 Paper: 6189 , 11 p. (2022), **IF: 5.923**

Uriarte, Lucas M. ; Vitale, Raffaele ; Niziński, Stanisław ; Hadjidemetriou, Kyprianos ; Zala, Ninon ; Lukacs, Andras ; Greetham, Gregory M. ; Sazanovich, Igor V. ; Weik, Martin ; Ruckebusch, Cyril et al. Structural Information about the trans-to-cis Isomerization Mechanism of the Photoswitchable Fluorescent Protein rsEGFP2 Revealed by Multiscale Infrared Transient Absorption JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS 13 : 5 pp. 1194-1202. , 9 p. (2022), **IF: 6.475**

Green, Dale ; Roy, Palas ; Hall, Christopher R ; Iuliano, James N ; Jones, Garth A ; Lukacs, Andras ; Tonge, Peter J ; Meech, Stephen R  
Excited State Resonance Raman of Flavin Mononucleotide: Comparison of Theory and Experiment JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A 125 : 28 pp. 6171-6179. , 9 p. (2021) **IF: 2.781**

Telek, Elek ; Karádi, Kristóf ; Kardos, József ; Kengyel, András ; Fekete, Zsuzsanna ; Halász, Henriett ; Nyitrai, Miklós ; Bugyi, Beáta ; Lukács, András  
The C-terminal tail extension of myosin 16 acts as a molten globule, including intrinsically disordered regions, and interacts with the N-terminal ankyrin JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 297 : 1 Paper: 100716 (2021) **IF: 5.157**

Iuliano, James N. ; Tolentino Collado, Jinnette ; Gil, Agnieszka A. ; Ravindran, Pavithran T ; Lukacs, Andras ; Shin, SeungYoun ; Woroniecka, Helena A ; Adamczyk, Katrin ; Aramini, James M. ; Edupuganti, Uthama R et al. Unraveling the Mechanism of a LOV Domain Optogenetic Sensor: A Glutamine Lever Induces Unfolding of the  $\alpha$  Helix ACS CHEMICAL BIOLOGY 15 pp. 2752-2765 , 14 p. (2020)  
**IF: 5.1**

Iuliano, James N. ; Hall, Christopher R.\* ; Green, Dale\* ; Jones, Garth A. ; Lukacs, Andras ; Illarionov, Boris Bacher, Adelbert ; Fischer, Markus ; French, Jarrod B. ; Tonge, Peter J et al. Excited State Vibrations of Isotopically Labelled FMN Free and Bound to a LOV Protein JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B 124 : 33 pp. 7152-7165. , 14 p. (2020) **IF:2.991**

Hall, Christopher R. ; Tolentino Collado, Jinnette ; Iuliano, James N. ; Adamczyk, Katrin ; Lukacs, Andras ; Greetham, Gregory M. ; Sazanovich, Igor V. ; Tonge, Peter J ; Meech, Stephen R. Site Specific Protein Dynamics Probed by Ultrafast Infrared Spectroscopy of a Noncanonical Amino Acid JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B 123 : 45 pp. 9592-9597. , 6 p. (2019) **IF: 2.857**

Nag, Lipsa ; Lukacs, Andras ; Vos, Marten Short-lived radical intermediates in the photochemistry of glucose oxidase CHEMPHYSICHEM: (2019) **IF: 3.144**

Iuliano, JN ; Gil, AA ; Laptanok, SP ; Hall, CR ; Tolentino, Collado J ; Lukacs, A ; Hag, Ahmed SA ; Abyad, J ; Daryae, T ; Greetham, GM et al. Variation in LOV Photoreceptor Activation Dynamics



Probed by Time Resolved Infrared Spectroscopy *BIOCHEMISTRY* 57 : 5 pp. 620-630. , 11 p. (2018) **IF: 2.952**

Li, Y ; Lukacs, A ; Bordacs, S ; Moczar, J ; Nyitrai, M ; Hebling, J The effect of the flexibility of hydrogen bonding network on low-frequency motions of amino acids. Evidence from Terahertz spectroscopy and DFT calculations *SPECTROCHIMICA ACTA PART A-MOLECULAR AND BIOMOLECULAR SPECTROSCOPY* 191 pp. 8-15. , 8 p. (2018) **IF: 2.931**

Sergey, P Laptanok ; Agnieszka, A Gil ; Christopher, R Hall ; Andras, Lukacs ; James, N Iuliano ; Garth, A Jones ; Gregory, M Greetham ; Paul, Donaldson ; Atsushi, Miyawaki ; Peter, J Tonge et al. Infrared spectroscopy reveals multi-step multi-timescale photoactivation in the photoconvertible protein archetype dronpa *NATURE CHEMISTRY* 10 : 8 pp. 845-852. , 8 p. (2018) **IF:23.193**

Agnieszka A Gil , Sergey P Laptanok , Jarrod B French , James N Iuliano , Andras Lukacs , Christopher R Hall , Igor V Sazanovich , Gregory M Greetham , Adelbert Bacher , Boris Illarionov , Markus Fischer , Peter J Tonge , Stephen R Meech  
Femtosecond To Millisecond Dynamics Of Light Induced Allostery In The Avena Sativa Lov Domain *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B* 121:(5) pp. 1010-1019. (2017) **IF:3,146**

Agnieszka A Gil, Sergey P Laptanok, James N Iuliano, Andras Lukacs, Anil Verma, Christopher R Hall, Grace E Yoon, Richard Brust, Gregory M Greetham, Michael Towrie, Jarrod B French, Stephen R Meech, Peter J Tonge  
Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues  
*JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 139: p. &. (2017) **IF:14.357**

Agnieszka Anna Gil , Allison Laura Haigney , Sergey P Laptanok , Richard James Brust , Andras Lukacs , James Iuliano , Jessica Jeng , Eduard Melief , Rui-Kun Zhao , EunBin Yoon , Ian P Clark , Michael Towrie , Gregory M Greetham , Annabelle Ng , James J Truglio , Jarrod B French , Stephen R Meech , Peter J Tonge  
Mechanism of the App<sub>BLUF</sub> Photocycle Probed by Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues: Effect of the Y21 pK<sub>a</sub> on the Forward and Reverse Ground-State Reactions  
*JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 138:(3) pp. 926-935. (2016) **IF:13,858**

Laptanok SP , Lukacs A , Gil A , Brust R , Sazanovich IV , Greetham GM , Tonge PJ , Meech SR  
Complete Proton Transfer Cycle in GFP and Its T203V and S205V Mutants.  
*ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION* 54:(32) pp. 9303-9307. (2015) **IF: 11,709**

Laptanok, Sergey P ; Nürnbergger, Patrick ; Lukacs, Andras ; Vos, Marten H  
Subpicosecond Kerr-Gate Spectrofluorometry In: Engelborghs, Yves; Visser, Antonie JWG (szerk.)  
**Fluorescence Spectroscopy and Microscopy : Methods and Protocols**  
Totowa (NJ), Amerikai Egyesült Államok : Humana Press (2014) 816 p. pp. 321-336. , 16 p.

Brust Richard , Haigney Allison , Lukacs Andras , Gil Agnieszka , Hossain Shahrier , Addison Kiri , Lai Cheng-Tsung , Towrie Michael , Greetham Gregory M , Clark Ian P , Illarionov Boris , Bacher Adelbert , Kim Ryu-Ryun , Fischer Markus , Simmerling Carlos , Meech Stephen R , Tonge Peter J  
Ultrafast Structural Dynamics of BlsA, a Photoreceptor from the Pathogenic Bacterium *Acinetobacter baumannii*  
*JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS* 5:(1) pp. 220-224. (2014) **IF:7,458**

Bódis Emőke , Raics Katalin , Nyitrai Miklós , Majer Zsuzsa , **Lukács András**  
 FLUORESCENCE LIFETIME DISTRIBUTIONS REPORT ON PROTEIN DESTABILISATION IN  
 QUENCHING EXPERIMENTS: The effect of acrylamide on the protein stability  
**JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY** 129: pp. 108-  
 114. (2013) **IF:2,803**

**Lukacs Andras** , Haigney Allison , Brust Richard , Addison Kiri , Towrie Michael , Greetham  
 Gregory M , Jones Garth A , Miyawaki Atsushi , Tonge Peter J , Meech Stephen R  
 Protein Photochromism Observed by Ultrafast Vibrational Spectroscopy  
**JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B** 117:(40) pp. 11954-11959. (2013) ) **IF:3,377**

Haigney, A ; Lukacs, A ; Brust, R ; Zhao, RK ; Towrie, M ; Greetham, GM ; Clark, I ; Illarionov, B ;  
 Bacher, A ; Kim, RR et al. Vibrational Assignment of the Ultrafast Infrared Spectrum of the  
 Photoactivatable Flavoprotein AppA **JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B** 116 : 35 pp.  
 10722-10729. , 8 p. (2012)

Ujfalusi Z , Kovacs M , Nagy NT , Barko Sz , Hild G , Lukacs A , Nyitrai M , Bugyi B  
 Myosin and tropomyosin stabilize the conformation of formin-nucleated actin filaments  
**JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** 287:(38) pp. 31894-31904. (2012) **IF: 4,651**

Zhao, Rui-Kun ; Lukacs, Andras ; Haigney, Allison ; Brust, Richard ; Greetham, Gregory M ; Towrie,  
 Michael ; Tonge, Peter J; Meech, Stephen R Ultrafast transient mid IR to visible spectroscopy of fully  
 reduced flavins  
**PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS** 13 : 39 pp. 17642-17648. , 7 p. (2011)

Byrdin, M ; Lukacs, A ; Thiagarajan, V ; Eker, AP ; Brettel, K ; Vos, MH  
 Quantum yield measurements of short-lived photoactivation intermediates in DNA photolyase: toward  
 a detailed understanding of the triple tryptophan electron transfer chain. **JOURNAL OF PHYSICAL  
 CHEMISTRY A** 114 : 9 pp. 3207-3214. , 8 p. (2010)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Munkám során nagyon sok emberrel kerültem szorosabb vagy lazább munkatársi kapcsolatba akiknek hálával és köszönettel tartozom. Elsőként Somogyi Béla professzornak, akitől nem csak szakmát, hanem emberi dolgokat is tanulhattam. Nagyon nagy hálával emlékezem rá, hiszen a műszerek, az új mérési módszerek iránti érdeklődése rám ragadt és azóta el sem múlt. Nagyon hálás vagyok és sok köszönettel tartozom Nyitrai Miklósnak, akitől Bélához hasonlóan folyamatosan rengeteg támogatást és segítséget kaptam az elmúlt évtizedekben. Tőle tanultam meg a kísérletezés iránt lelkesedni és azt, hogy mit jelent a szisztematikus munka. Az ő segítségével nélkül nem tudtam volna megépíteni a tranziens abszorpciók rendszerét Pécsen, nem lennének modern műszereink és sok minden más.

Nagyon hálás vagyok Marten Vosnak, aki az Ecole Polytechnique-n volt a témavezetőm és főnököm, és akitől rengeteg dolgot tanultam a szakmáról, biofizikáról, és nem utolsósorban a holland munkamódszert. Hasonlóan hálás vagyok Steve Meech professzornak, aki Norwichban a University of East Anglia egyetemén volt a főnököm és mentorom és akitől – Martenhez hasonlóan – a mai napig tanulok. Hálás vagyok Pete Tonge professzornak a New York-i Stony Brook egyetem a Kémia intézetének az igazgatójának. Vele és Steve-vel hosszú napokat és éjszakákat töltöttünk mérésekkel – és nagy ritkán focimeccs nézéssel – a Rutherford Appleton laborban.

Szintén köszönettel tartozom Greg Greethamnek, akivel a találkozásunk napján összebarátkoztunk a Rutherford Appleton laborban és aki rám bízta az infravörös lézerrendszerét, valamint óriási támogatást nyújtott minden projektünknek az elmúlt 10-15 évben.

Köszönettel tartozom az összes Stony Brook-os egykori PhD hallgatónak, Allison Haigneynek, Richard Brustnak, Agnieszka Gilnek, James Iulianonak és Jinnette Tollentino Colladonak akikkel éjszakákba és hajnalokba nyúló méréseket végeztünk a Rutherford Appleton laborban és akik minden mutánst megcsináltak amit csak el tudtam képzelni.

Hálás vagyok a Biofizikai Intézetben dolgozó kollégáimnak Grama Lászlónak, Fekete Zsuzsannának, Telek Eleknek, Bódis Emőkének, Kis-Bicskei Nikolettnek, Pasitka Jonatánnak, Pécsi Ildikónak, akik hatalmas mennyiségű munkát végeztek a BLUF, fotoliáz, kriptokróm projektekben. Köszönettel tartozom Sofia Kapetanakinak, akivel az Ecole Polytechnique után újra együtt dolgozhatunk és aki a strukturális projekt motorja.

Rendkívüli módon hálás vagyok feleségemnek Ibolyának, akinek a támogatása nélkül sem a posztdok évek sem az azt követő időszak nem lett volna eredményes.

