

Ph. D. értekezés tézisei

Az OaPAC funkcionális dinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópia segítségével

Tempfliné Pirisi Katalin Erzsébet

2023



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs[†], Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Doktori program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

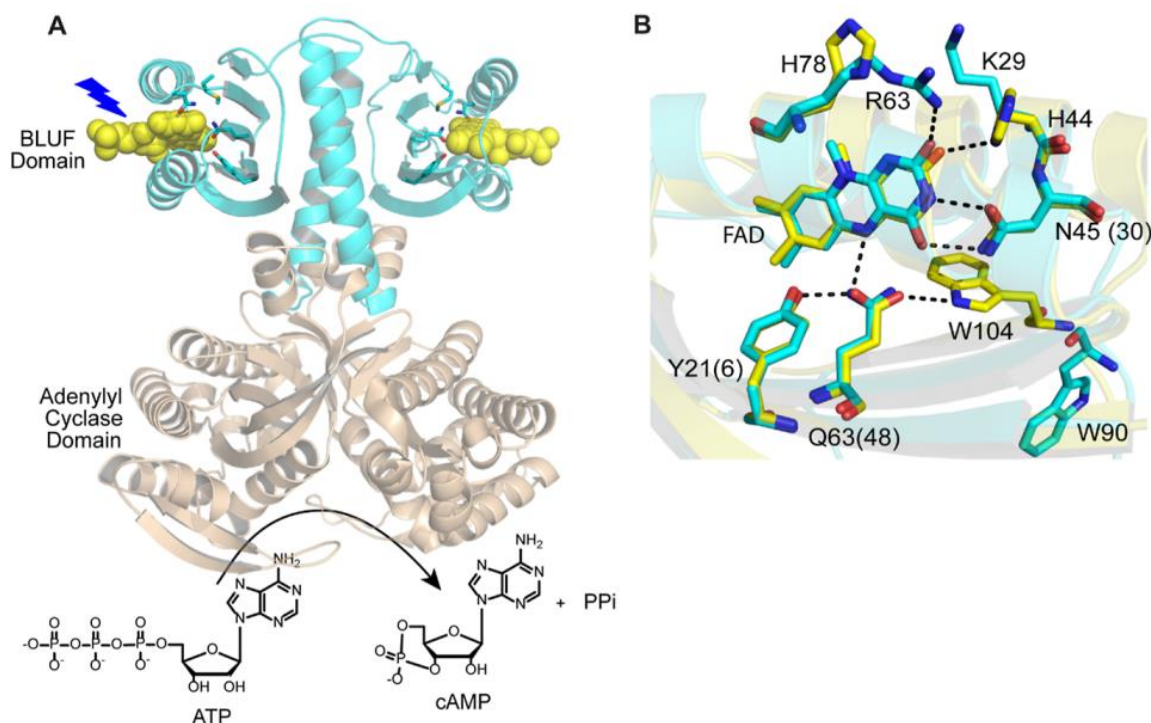
Témavezető: Dr. Lukács András

BEVEZETÉS

A természetben minden élő organizmus számára szükséges, hogy érzékelje környezetét és megfelelőképpen reagáljon a változó körülményekre. Még a nem fotoszintetizáló organizmusok esetében is különösen fontos, hogy képesek legyenek alkalmazkodni az őket érő különböző erősségű napfényhez; a magasabb rendű növényi fajok pedig többféle érzékelő fotoreceptorral rendelkeznek, amelyekkel egyrészt képesek optimalizálni a fotoszintézisből nyert energia hatásfokát, másrészt minimalizálják az UV fény károsító hatását. A számos ismert fotoreceptor típus egymástól eltérő kromofórokat tartalmaz, amelyek különböző funkcióval bírnak és különböző hullámhosszú fény érzékelésére képesek [1].

Munkánk során a fotoaktív flavoproteinek csoportjába tartozó BLUF (Blue Light Using Flavin) domén fehérjékkel foglalkoztunk, amelyekben az enzimatisz folyamatokban fontos szerepet játszó flavin kofaktor felelős a fény érzékeléséért [2]. A BLUF domén fehérjét a kétezres évek elején egymástól függetlenül fedezte fel két kutatócsoport az *Euglena gracilis* egysejtű ostorosban [3] és a *Rhodobacter sphaeroides* bíbor baktériumban [4]. Léteznek olyan BLUF fehérjék (pl. az AppA és a PAC (Photoactivated Adenylate Cyclases) félék), amelyek a BLUF doménen kívül egy extra domént is tartalmaznak. Ezekben a fehérjékben (a megfelelő hullámhosszú fényvel való) megvilágítás hatására a BLUF domén aktiválódik, ami beindítja az extra domén irányába való jeltovábbítást. Az extra doménhez érkező fényindukált jel a fehérje különféle (pl. enzimatisz) funkcióit indíthatja be [1]. A fehérjében a fényelnyelés hatására végbe menő változásokat az izoalloxazin gyűrű és a β -redőből kiemelkedő egyes konzervált aminosavak közötti interakció/interakciók határozzák meg [5]. A tirozin, glutamin és metionin hármaz a BLUF fehérjékben konzervált aminosavak a flavin közvetlen környezetében helyezkednek el, valamint egy kivétellel az összes fehérjében jelen van egy triptofán is. Ezek az aminosavak kulcsszerepet játszanak a BLUF domén fehérje fényérzékelő mechanizmusában, amelynek során (az aminosavak és a flavin közötti) fotoindukált töltésátrendeződés, a hidrogénkötések átrendeződése és konformáció változás mehet végbe [1], [5]. Számos BLUF domén esetében az S1 szinglett állapotból való kioltás 1-10 pikoszekundum alatt történik meg, a szomszédos aminosavakról való elektrontranszfer által [5]. Ez azért lehetséges, mert a flavin gerjesztett állapotában hajlamos elektront felvenni, majd kialakul a flavin semleges állapota. Az elsődleges elektron donor általában egy közeli tirozin, néhány esetben pedig triptofán. Ez az átmeneti, vagy tranziens töltés-szétválasztott állapot átrendezi az aktív központ hidrogénkötés rendszerét, ami elősegíti a jeltovábbításhoz szükséges hosszabb élettartamú metastabil konformáció létrejöttét [5]. BLUF domén

fehérjékben megvilágítás hatására a FAD abszorpciós spektruma egy gyors 10 nm-es vörös eltolódáson megy keresztül, a visszatérés pedig eltarthat a másodperctől akár a percekig is [6].



Az adenilát ciklázok (AC) egy csoportját alkotják a PAC fehérjék, amelyek a fény érzékelésére képesek, fotoaktív adenilát ciklázok (Photoactivated Adenylate Cyclases = PAC). A PAC fehérjék elsődleges funkciója, hogy az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő molekulát, ciklikus adenzin monofoszfátot (cAMP) állítanak elő kék fénnel való megvilágítás hatására, amellyel lehetőséget nyitnak a sejtműködés noninvazív szabályozására, precíz térbeli és hőmérsékleti kontrollal. A PAC fehérjék prokariótákban és eukariótákban egyaránt fellelhetők és optogenetikai eszközként használhatók a sejten belüli cAMP szint szabályozásában. Munkánk során az OaPAC az *Oscillatoria acuminata* fotoszintetikus cianobaktériumban található PAC fehérje fotoaktivációját vizsgáltuk femtoszekundumos tranziens látható- és infravörös spektroszkópia segítségével.

A másik számunkra érdekes BLUF domén fehérje az AppA, ami a *Rhodobacter Sphaeroides* bíorbaktériumban (és más baktériumokban, algákban) fordul elő és részt vesz a transzkripciós regulációban. Mark Gomelsky és Samuel Kaplan fedezték fel 1995-ben, az AppA elnevezés pedig az **A**ctivation of **P**hotopigment and **P**uc expression **A** angol kifejezésből származó mozaikszó [7], [8]. Fény- és oxigénszegény körülmények között az AppA hozzákapcsolódik a PpsR₂ transzkripciós represszorhoz, nagy intenzitású (kék) fény, vagy

magas oxigénszint hatására azonban a komplex disszociálódik. Ezáltal a PpsR₂ hozzá tud kötődni a DNS-hez, amivel megakadályozza a fotoszintetikus rendszer fehérjéinek bioszintézisét. Az AppA fotociklusa fény hatására egy proton kapcsolt elektron transzferrel (PCET) veszi kezdetét, amelynek forrása a BLUF doménben lévő flavinnal szomszédos tirozin (Tyr21) [9]. Ennek eredményeképpen megváltozik a flavin redox állapota és átrendeződik az őt körülvevő hidrogénkötés rendszer [9].

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során kitűzött célok az alábbi pontokban foglalhatók össze.

- A tirozin kation gyök vibrációs markerének meghatározása tranziens infravörös spektroszkópiával
- Az OaPAC fotoaktivációjának tanulmányozása nem kanonikus aminosavak mutagenesisével
- Az OaPAC fotoaktivációjának tanulmányozása ultragyors spektroszkópiával

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Különösen a flavoproteinek fotokémiája esetén, a rövid élettartamú, a reakciók során átmenetileg jelen lévő gyökök kiválóan tanulmányozhatók az egymást kiegészítő, ultragyors látható (TA)- és infravörös (TRIR) spektroszkópia segítségével, így jelen munkában ezeket a mérési módszereket alkalmaztuk.

Tranziens abszorpció (TA) spektroszkópia

A TA méréseket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán a Biofizikai Intézetben lévő lézerlaborban végeztük el. Méréseinkhez szükséges lézernyalábot egy többtagú lézerrendszer állítja elő, amely egy lézer oszcillátorból, egy pumpa lézerből és egy lézer erősítőből áll. Az oszcillátor egy Nd:YLF lézerrel pumpált Spectra-Physics Mai-Tai típusú Ti:Sa lézer, amely 100 fs-os impulzusokat állít elő (100 MHz, 1,5 W, 1 nJ). A Spitfire Ace regeneratív erősítőben lévő Ti:Sa kristályt egy Spectra Physics Empower típusú Q-kapcsolt Nd:YLF lézer (Intracavity-Doubled, Diode-Pumped, 1 – 5 kHz) pumpál, a lézeraktív kristály pedig az oszcillátorból érkező seed impulzusokat erősíti tovább. Az erősítő CPA (Chirped Pulse Amplification) elven működik, így különösen nagy energiájú impulzusokat állít elő a berendezés. Az erősítőt elhagyó elektromágneses sugárzás a Ti:Sa kristály előnyös tulajdonságainak köszönhetően 710 – 990 nm között hangolható, 100 fs impulzushosszú (@800 nm), 1 mJ energiájú lézerfény, amelynek az ismétlési frekvenciája 0,2 – 5 kHz tartományban állítható [10].

A pumpa és próba nyaláb kialakításához az 1 mJ energiájú, 100 fs impulzushosszú, 200 Hz frekvenciájú 800 nm hullámhosszú nyalábot 1:9 arányban osztottuk el. A pumpa impulzussorozat létrehozásához szükséges azt a hullámhosszt beállítani, amelyen a vizsgált molekuláris rendszerek jól abszorbeálnak. Flavint tartalmazó fehérjék esetében általában 400 nm hullámhosszú lézernyaláb szükséges a gerjesztéshez (pumpáláshoz), amelyet a 800 nm-es nyaláb útjában elhelyezett BBO-ban történő SHG-vel hozunk létre. A TA rendszerben fehér fény kontinuumot használunk próba nyalábként, ami a kisebb energiájú nyalábrész egy 2 mm vastag CaF_2 lemezre való fókuszálásával hozható létre. A folyamatos exponálás az infravörös közeli impulzusok használata közben optikai roncsolódást okozhat ezen kristályok felületén, ami instabil kontinuumhoz vezet [10]. Emiatt egy Thorlabs mozgatóval mozgatjuk a kristályt a lézernyaláb haladási irányára merőleges síkban, a mozgatást a cég által készített szoftver vezérli.

A pumpa-próba módszer lényege abban áll, hogy a pumpa impulzussal való gerjesztést követően több, különböző időpillanatban „megvilágítjuk” a mintát a próba impulzussal és vizsgáljuk az abszorpcióját. A különböző időpillanatok vizsgálata a pumpa és próba impulzusok egymáshoz viszonyított késleltetésével valósítható meg. A *Newport IMS Series High-Performance Long Travel Linear Stages 600 PP* típusú késleltető pad legkisebb beállítható lépésköze $1.5\ \mu\text{m}$, ami 10 femtoszekundumos időbeli felbontást tenne lehetővé, azonban esetünkben a lézerimpulzusok 100 fs-os időtartama a limitáló tényező.

Tranziens infravörös (TRIR = Time Resolved InfraRed) spektroszkópia

TRIR méréseink az Egyesült Királyságban lévő Rutherford Appleton Laboratories Central Laser Facility ULTRA nevet viselő lézerrendszerrel való mérések során készültek. Az ULTRA lézerrendszer a napjainkban alkalmazott időbeli felbontással rendelkező lineáris és nemlineáris spektroszkópai technikák teljes skáláját felvonultatja, keskeny sávú pikoszekundumos pumpaimpulzusokat és széles sávú femtoszekundumos próbaimpulzusokat alkalmazva [11].

Az ULTRA lézerrendszer különböző, pumpa-próba elven alapuló spektrométerekből álló komplexum számára biztosítja a szükséges nagyenergiájú és ultrarövid lézerimpulzusokat. A mi esetünkben az ULTRA TRIR méréseket végző egysége az érdekes.

A teljes komplexum szíve(i) a két különálló Ti:Sa regeneratív erősítő (Thales Laser), amelyek CPA elven működnek. A regeneratív erősítők egy 20 fs impulzushosszú, 50 nm sáv szélességű oszcillátor (Femtolaser) lézerimpulzusait erősítik fel. A femtoszekundumos erősítő kar 40 – 80 fs impulzushosszú, 0,8 mJ energiájú 800 nm hullámhosszú impulzusokat generál 10 kHz ismétlési frekvencián, amelyek a TRIR, 2DIR és T-2DIR mérési egységekben szükségesek. A lézerműködéshez szükséges populáció inverzió létrejöttéért és fenntartásáért mindkét erősítő lézerkristályában egy ~ 55 wattos Nd:YAG (Touaryx) pumpalézer a felelős [40]. A rendszerbe femtoszekundumos és pikoszekundumos optikai parametrikus erősítők (OPA = Optical Parametric Amplifier) és nemkollineáris optikai parametrikus erősítők (NOPA = Noncollinear Optical Parametric Amplifier, NOPA) vannak beépítve, valamint lehetőség van fehérfény kontinuum keltésre, másodharmonikus keltésre és különbségi frekvencia keltésre (DFG = Difference Frequency Generation). A rendszer magas kiolvasási sebességű lineáris detektorokat használ a spektrumok felvételére és tárolására, amelyek az ultraibolya hullámhosszaktól egészen a közép infravörös hullámhosszakig érzékenyek [11]. Három különböző detektor típus érhető el: egy 512 elemű szilikon detektor (Quantum Detectors,

QD), egy 256 elemű szilikon detektor (InGaAs, QD) és egy 128 és 64 elemű higany kadmium tellurid detektor (MCT = Mercury Cadmium Telluride, IR Associates). Az összes detektor egy közös adatgyűjtő rendszerhez (DAQ = Data AcQuisition, QD) kapcsolódik. A DAQ hardver, a számítógép összeköttetések és a szoftveres feldolgozás minden detektor esetében azonos, lehetővé téve ezzel a rendszer egyes részeinek összehangolt vezérlését és a szinkronizált adatgyűjtést, amely a LabView szoftverrel történik [11].

A TrmFO (folát- vagy FAD függő tRNS metiltranszferáz), GOX (glükóz oxidáz), AppA és OaPAC fehérjéken való mérésekhez az ULTRA TRIR egységét a legcélravezetőbb használni, amellyel felvehetők a vizsgált fehérjék tranziens infravörös spektrumai. A tranziens infravörös (TRIR = Time Resolved InfraRed) spektrométer esetében a femtoszekundumos erősítőt követően egy femtoszekundumos OPA állítja elő a 450 nm hullámhosszú, 100 fs impulzushosszú 5 kHz ismétlési frekvenciájú gerjesztő (pumpa) impulzusokat. Ugyancsak a femtoszekundumos kar szolgáltatja a mérésekhez a próba impulzussorozatot, amely az erősítőt követően egy másik OPA segítségével hozható létre. A széles spektrumú próba impulzusok $1400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ tartományon teszik lehetővé a TRIR spektrumok felvételét. A TRIR spektrométer, a látható hullámhossztartományban működő TA mérésekhez hasonlóan pumpa-próba elrendezés szerint került kialakításra. A mérések során a pumpa impulzussal való gerjesztést követően több, különböző időpontban világítjuk meg a mintát az IR próba impulzussal és az abszorpcióját vizsgáljuk. A TRIR rendszer időbeli felbontását a lézerimpulzusok (időbeli) hossza határozza meg, amely a TA rendszerhez hasonlóan a TRIR rendszerben is 100 fs. A TRIR módszer lehetővé teszi a kromofór, vagy a fehérje fénnel való gerjesztés hatására keletkező vibrációs módusainak megjelenítését az átmeneti infravörös spektrumokban.

EREDMÉNYEK

A tirozin kation gyök vibrációs markerének azonosítása

Méréseink során ultragyors TRIR spektroszkópia segítségével meghatároztuk a tirozin kation- és semleges gyökök vibrációs markereit a TrmFO fehérje C51A/Y343F és C51A mutánsaiban. További vizsgálatainkban ugyanezen gyökök kialakulását figyeltük meg vad típusú GOX fehérjében és az AppA BLUF W104Y variánsában, világos állapotban. A korábbi, TrmFO mutánsokon és GOX fehérjén végzett TA méréseink eredményeit a TRIR mérésekkel összevetve, sikerült azonosítanunk az 1483 cm^{-1} -es módust, mint a $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ vibrációs markerét, a $\text{TrpH}^{\bullet+}$ triptofán kation gyököt, amelynek vibrációs ujjlenyomata $1488 - 1490\text{ cm}^{-1}$ -nél található, valamint sikerült azonosítani a semleges tirozin gyök vibrációs markerét $\sim 1502\text{ cm}^{-1}$ -nél. A rezgési csúcsok spektrumban való pontos pozíciója mind a semleges-, mind a kationos tirozin gyök esetében erősen függ a hidrogén-kötés rendszertől, aminek köszönhetően a rezgési frekvenciák különbözőek lehetnek vizes pufferben (jelen munkában ugyanis nehézvízes puffert alkalmaztunk). A rezgési módus eltolódása víz alapú puffer esetén várhatóan kisebb lesz a semleges tirozin gyök csúcsát illetően és szignifikánsabb a tirozin kation gyökhöz tartozó csúcsnál.

A semleges tirozin gyökre vonatkozó eredmény összhangban van a korábbi vibrációs módusokra vonatkozó megfigyelésekkel, amelyeket a nyolcvanas években határoztak meg fenoxil- és tirozin gyökök esetében. Az említett munkában időbeli felbontású rezonancia Raman méréseket végeztek – vízben, impulzus radiolízissel létrehozott – fenoxil gyökökön, 400 nm hullámhosszú gerjesztéssel. Ezen mérések eredményeképpen egy erős 1505 cm^{-1} -es Raman csúcsot regisztráltak, amelyet a fenol csoport $\text{C} = \text{O}$ rezgésének lehetett tulajdonítani [12]. A tirozin gyök erőteljes rezgésének csúcsát UV rezonancia Raman spektroszkópiával karakterizálták 1505 cm^{-1} hullámszámnál [13].

A tirozin, mint elektron donor feladatát a fotorendszer II-ben elsőként Gerken, Brettel és munkatársai vizsgálták meg egy nanoszekundumos UV flash fotolízis rendszerrel. Méréseikkel bizonyították, hogy az elektron transzfer során semleges tirozin gyök keletkezik [14]. A semleges tirozin gyök kialakulását a *Synechocystis sp.*-ből (PCC 6803) származó fotorendszer II-ben különbségi FTIR mérésekkel vizsgálták meg, amelynek során a spektrum 1503 és 1512 cm^{-1} -es csúcsait a $\text{Tyr}_D^{\bullet}$ és a $\text{Tyr}_Z^{\bullet}$ gyököknek lehetett tulajdonítani.

A tirozin semleges- és kation gyökök vibrációs tulajdonságaira vonatkozó új megállapításokat felhasználva, sikerült jellemzést adnunk – a tirozin gyökök azonosítására készült – AppA

W104Y mutáns fotokémiájáról. A mutáció jelentősen módosította a fehérje fotokémiáját, viszont ahogy az egy korábbi munka [15], [16] alapján várható volt, nem gátolta a világos állapot kialakulását, csak a sötét állapot visszatérését gyorsította fel nagyjából a százszorosára (a vad típushoz viszonyítva). A BLUF-domén fehérjék kék fénnel való megvilágítása a flavin 447 nm hullámhossznál elhelyezkedő abszorpciós csúcsának 10 nm-rel való vörös eltolódását eredményezi a flavinban lévő izoalloxazin gyűrű hidrogén-kötés rendszerének átrendeződése miatt. A megvilágítást megszakítva az abszorpciós csúcs visszatolódik az eredeti sötét állapotbeli értékhez. A sötét állapotba való visszatérés AppA esetében ~30 perc alatt, míg PixD és OaPAC esetén sokkal gyorsabban, néhány másodperc alatt történik meg. A W104 triptofán cseréje elnyomja a vörös eltolódást a teljes hosszúságú fehérjében [16] és gyorsabb sötét állapotba való visszatérést eredményez a BLUF doménben: a W104A variánsban a visszatérés 80-szor gyorsabb, mint a vad típusú fehérjében [17].

További TRIR méréseket végeztünk a világos állapotú W104Y variánsban és azt figyeltük meg, hogy a semleges tirozin gyök képződése és a semleges flavin gyök kialakulása egyetlen lépésben mennek végbe ~2 ps-mal a gerjesztést követően. Ez arra utal, hogy ebben a variánsban PCET történik és mind az elektron-, mind a proton donor egy tirozin. A PCET nem egy váratlan jelenség a fotoaktív flavoproteinek fotoaktivációja során, különösen, ha az elsődleges elektron donor szerepét egy tirozin tölti be. PCET figyelhető meg például két BLUF domén fehérjében, a PixD [44]- és a PapB fehérjékben is [18]. A PixD esetében egy szekvenciális gyök-keletkezést látunk: elsőként az Y8 tirozin ad elektront a flavinnak, így kialakul a $FAD^{\bullet-}$ gyök, majd kísérő jelenségként, ~100 ps-on belül alakul ki a semleges flavin gyök [19]. Elméleti számítások alapján a PixD esetében a flavin protonálódása szekvenciálisan történik: a gerjesztést követően a tirozin protont ad egy szomszédos glutaminnak, ami ezt követően protonálja a flavint, stabilizálva a semleges gyökállapotot [20], [21]. A *Rhodopseudomonas palustris* bíbor baktériumban található BLUF fehérje, a PapB esetében a $FADH^{\bullet}$ közvetlenül, PCET folyamat következtében alakul ki – mint ahogy azt az AppA W104Y mutáns esetében is láttuk [22].

Mérési eredményeinkből az is jól látható, hogy a TrmFO C51A variánsában a flavin gerjesztése szintén szekvenciális PCET folyamathoz vezet (nagyon kis mennyiségben (< 10%)). A folyamat a TrmFO C51A variánsában néhány BLUF domén fehérjéhez hasonlóan játszódik le: a 343-as tirozin ad egy elektront a flavinnak, így anionos flavin gyök keletkezik, a tirozin ezt követő gyors deprotonálódása pedig a semleges flavin gyök kialakulásához vezet. A GOX fehérjében ugyancsak látható volt a PCET folyamat, ugyanis a gerjesztés hatására történő

közeli tirozintól induló elektron transzfert ugyanattól a tirozintól egy proton transzfer követte, stabilizálva a flavin $\text{FADH}^\bullet$ állapotát. Méréseink azt mutatják, hogy a GOX fotokémiája heterogénnek és komplexnek tekinthető, mivel a fehérjében a tirozinon kívül egy közeli triptofán is képes elektront adni a gerjesztett flavinnak. Összességében jelen munka jól szemlélteti, hogy a tranziens infravörös spektroszkópia milyen érzékenyen képes nyomon követni az aromás gyökök részvételével történő elektrontranszfer folyamatokat is. Méréseinkből az is látszik, hogy az infravörös spektroszkópia megfelelően érzékeny a reakció során átmenetileg megjelenő gyökállapotok megfigyelésére, akkor is, ha azok alacsony koncentrációban vannak jelen.

Az OaPAC fotoaktivációjának vizsgálata

A BLUF domén fotoreceptorok fotokémiáját már számos különböző időfelbontáson alapuló spektroszkópiai módszerrel tanulmányozták, azonban ezek a vizsgálatok nagymértékben azokra a rövid BLUF domén fehérjékre koncentrálnak, amelyekben nincsen biológiailag releváns output partner [19], [20], [23]–[25]. Jelen munkában kiterjesztettük a BLUF domén fotociklus tanulmányozását a teljes OaPAC fehérjére, amelyben mind a BLUF- mind az adenilát cikláz domén jelen van. TRIR és TRMPS technikák alkalmazásával hasonlítottuk össze az OaPAC és más, output doménnel nem rendelkező BLUF fehérjék fotociklusát, valamint azt is vizsgáltuk, hogy a konzervált Y6 tirozin savasságának változása milyen hatással van a fény által szabályozott adenilát cikláz reakciójára. A BLUF fotoreceptorok fotoaktivációja általában megkülönböztethető az alapján, hogy a világos állapot kialakulása során milyen átmeneti gyökállapotok vannak (vagy nincsenek) jelen a fehérjében. Míg az AppA, a BlrB és BlsA fehérjék esetében a világos állapot kialakulása során nem jönnek létre átmeneti gyökállapotok, a PixD (Slr1694) fehérje fotoaktivációja proton kapcsolt elektron transzfert (PCET) tartalmaz, ami az anionos- és neutrális flavin gyökök ($\text{FAD}^{\bullet-}$ és $\text{FADH}^\bullet$) szekvenciális kialakulásával valósul meg a világos állapothoz vezető reakcióútvonalon [24], [26], [27].

Méréseink során karakterizáltuk az Y6F és a W90F OaPAC mutánsok fotofizikáját, amelyekben a döntő fontosságú aminosav – ami a potenciális elektron donor – redox semleges fenilalaninnal lett helyettesítve. Az Y6 tirozin fenilalaninra való cseréje drámaian megváltoztatta az Y6F mutáns fotociklusát. Más BLUF domén fehérjékben (mint az AppA, vagy a PixD) a kulcsfontosságú tirozin (Y21, vagy Y8) fenilalaninra való cseréje blokkolta a világos állapot létrejöttét, amely állapotot a flavin $S_0 \rightarrow S_1$ átmenetének megfelelő csúcs 10 nm-es vörös eltolódása jellemez. Az Y6F OaPAC mutáns kék fénnel való megvilágítása a flavin

teljesen redukált állapotának kialakulását, valamint a fehérje enzimaktivitásának megszűnését eredményezte.

A proton transzfer szerepét az OaPAC működésében egy nemrégiben megjelent cikkben a Zhong csoport vizsgálta (Kang et. al, Angewandte Chemie, 2021), amelyben a szerzők a tirozint triptofánra cserélték. Kang és munkatársai szekvenciális elektron transzfert figyeltek meg, amely során a flavin anionos gyök kialakulását a semleges szemikinin kialakulása követi. A szerzők azt írják, hogy proton „hintát” figyeltek meg: kezdetben a triptofán átmenetileg ad egy protont a flavinnak (51 ps alatt) létrehozva ezzel a semleges szemikint, amelyet egy fordított irányú proton transzfer követ (52 ps alatt). Megfigyeléseink során az elektron transzfer folyamatok hasonló erősödését tapasztaltuk más BLUF domén fehérjéknél (AppA, PixD), azonban a megfigyelt elektron és proton transzfer ellenére a legnagyobb valószínűség szerint ez a mutáns funkcionálisan nem aktív. (A kulcsfontosságú tirozin cseréje minden esetben fotoinaktív fehérjét eredményez.)

Ahhoz, hogy el tudjuk különíteni egymástól a lehetséges elektron transzfer folyamatokat, méréseket végeztünk a W90F mutánsban, amelyben az egyedüli elektron donor a tirozin. Mind a TRIR, mind a TA mérések esetében egyedül a $\text{FADH}^\bullet$ semleges flavin gyök kialakulása volt megfigyelhető, az anionos gyök kialakulását nem jelezték a spektrumok. A TRIR spektrumokban még a semleges tirozin gyök kialakulása is megfigyelhető volt. Ezek a tapasztalatok igazolják az előfeltevésünket, miszerint gerjesztés hatására PCET folyamat játszódik le, amelyben az Y6 tirozin mind az elektron-, mind a proton donor.

A BLUF domén fehérjékben konzervált tirozin esszenciális szerepet játszik a fotoaktivációban, az aminosav fenilalaninra való cseréje minden esetben, mint például az OaPAC fehérje esetében is, fotoinaktív fehérjét eredményez. A konzervált tirozin pontos működése azonban a fotoaktiváció mechanizmusában attól függ, hogy vannak-e jelen átmeneti gyökállapotok a fotociklusban. A PixD-ben az Y8 savasságának 3000-szeresére való emelkedése az Y8 2,3,5 – $\text{F}_3\text{Y6}$ -ra való cseréje okozza, ami megállítja a fotociklust a $\text{FAD}^{\bullet-}$ anionos flavin kialakulásánál, valószínűleg azért, mert az Tyr ionizálódott és így nem képes proton donorként működni, ami a $\text{FADH}^\bullet$ kialakulásához kellene. Ezzel ellentétben az Y21 cseréje például az AppA fehérjében csak enyhe hatással van a világos állapot kialakulásának kinetikájára és minden n – FY6 mutáns fotoaktív. A legnagyobb eltérés az AppA BLUF esetében a sötét állapotba való visszatérésben figyelhető meg: az Y21 pK értékének változása 4000-szer gyorsabb visszatérést eredményez (vízben), míg ez a változás PixD esetében csak 15-szörös. Az itt látható tanulmányok tehát ismét rávilágítanak az OaPAC és a PixD

hasonlóságára. A két legsavasabb (pK 7,2 és 6,4) fenol csoporttal rendelkező mutáns, a 3,5 – F₂Y6 és a 2,3,5 – F₃Y6 esetében sem az UV – látható tartománybeli, sem az infravörös tartománybeli tranziens abszorpció nem mutatott a világos állapot kialakulására utaló jelet. A 3-FY6-ban azonban, aminek a pK értéke csak 1,5 pH egységgel savasabb a tirozinnál, a 10 nm-es eltolódás volt megfigyelhető a flavin abszorpciós spektrumában, a TRIR és TRMPS eredményei pedig közel azonosak a vad típuséval. Végül, jóllehet a 2,3 – F₂Y6 OaPAC esetében a megvilágítás hatására végbemegy az 5 nm-es vörös eltolódás, viszont a világos állapot (amit az 1694 cm⁻¹-es csúcs jelezne) nem figyelhető meg a TRIR spektrumban, a fotociklus láthatóan megszakad a FAD^{•-} kialakulásánál (tranziens 1515 cm⁻¹-nél). Ennek valószínűleg az az oka, hogy az infravörös mérés során nagyon kevés volt a világos állapotot felvevő molekulák száma, ezért nem sikerült megfigyelni a mérés során.

A kovalensen kötött adenilát cikláz OaPAC-ben való jelenléte egyedülálló lehetőséget kínál a BLUF domén fotokémiájának és az output domén aktivációjának közvetlen összekapcsolására. Párosított esszét alkalmazva a fény hatására végbe menő (ATP-ből való) cAMP előállítás $k_{cat} = 205 \pm 11 \frac{1}{\text{perc}}$, $K_m = 0,12 \pm 0,01 \text{ mM}$ és $\frac{k_{cat}}{K_m} = 1888 \frac{1}{\text{perc} \cdot \text{mM}}$ értékek mellett történt. Ezek az értékek az OaPAC esetében ezidáig nem kerültek publikálásra, habár Ohki és munkatársai beszámoltak arról, hogy a sötét állapothoz viszonyítva a világos állapotban nagyjából húszszoros enzimaktivitás figyelhető meg [6]. Mi a vad típusú OaPAC-ben a flavin fénnnyel való gerjesztésének hatására százszoros aktivitásbeli növekedést figyeltünk meg. Az enzim-aktivitásbeli különbség az esszé érzékenységevel magyarázható, Ohkiék a cAMP előállítást femtomólos érzékenységgel rendelkező immunesszéval vizsgálták. Ohki és munkatársai ATP turnover-t figyeltek meg sötét állapotban, azidő alatt, amíg a pirofoszfát spektrofotometrikus esszé érzékelési érzékenysége 1 μM volt, ennél fogva nem figyeltünk meg sötét állapotbeli aktivitást a vad típus esetében az esszé ablakon belül. Az időfelbontott spektroszkópiával összhangban, a 3 – FY OaPAC-nek a vad típusú fehérjéhez hasonló mértékű adenilát cikláz aktivitása van, míg a 3,5 – FY6 és a 2,3,5 – FY6 mutánsok esetében nincsen fényfüggő katalitikus aktivitás. Érdekes módon a 2,3 – F₂Y azonos $\frac{k_{cat}}{K_m}$ értékkel rendelkezik, mint a vad típus és a 3 – FY6, annak ellenére, hogy a TRIR adatokban nem figyelhető meg világos állapotra utaló jel. Ahogy fentebb említettük egy enyhe vörös eltolódás figyelhető meg a flavin abszorpciós spektrumában 450 nm hullámhossznál, ami azt jelzi, hogy a világos állapot kialakul a fehérje folyamatos megvilágítása során.

KONKLÚZIÓK

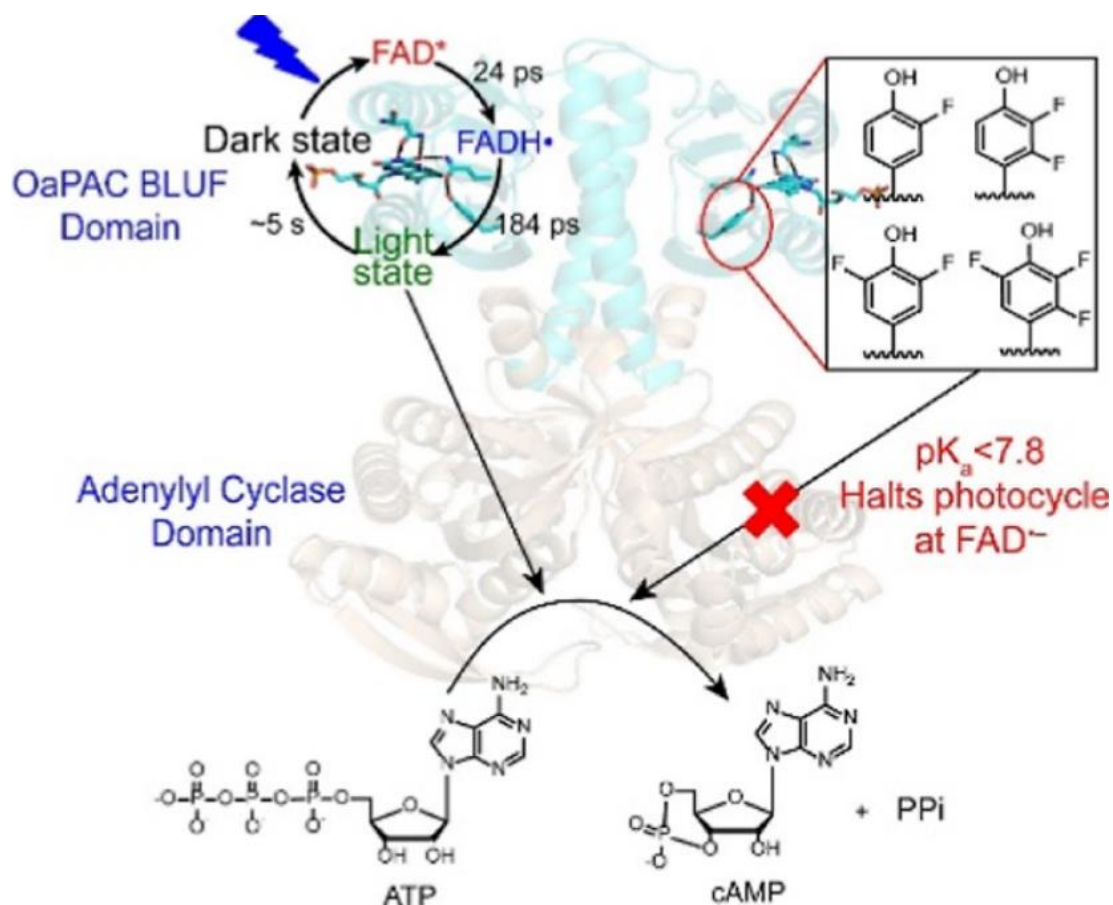
A tirozin kation gyök vibrációs markerének azonosítása

Tranziens infravörös méréseink során sikerült azonosítanunk a tirozin kation- és semleges gyökök vibrációs markerét egy erre a célra kiváló modell fehérjében, a TrmFO-ban. Ugyanezen gyökök kialakulását megfigyeltük GOX fehérjében, valamint méréseket végeztünk egy BLUF domén fehérjén, az AppA BLUF W104Y mutánsán is, világos állapotban. Méréseink alapján a tirozin kation gyököt a TRIR spektrumban az 1483 cm^{-1} -es csúcs reprezentálja, míg a tirozin semleges gyök vibrációs markerét $\sim 1502\text{ cm}^{-1}$ -nél sikerült azonosítanunk. Megtaláltuk továbbá a triptofán kation gyök ujjenyomatát is, $1488\text{--}1490\text{ cm}^{-1}$ -es régióban. Azt találtuk, hogy a TrmFO C51A mutánsában a PCET szekvenciálisan ment végbe, így ebben a mutánsban azonosítható volt a tirozin kation gyök, a C51A/Y343F mutáns TRIR spektruma azonban elektron donor híján a FAD* vibrációs spektrumához hasonló és időben szinte változatlan maradt. Egy másik modell rendszerben, a GOX-ban szintén szekvenciális PCET volt megfigyelhető, amelyet a globális analízis EAS spektrumai is alátámasztottak. Méréseket végeztünk továbbá egy BLUF domén fehérje, az AppA BLUF W104Y mutánsán is világos állapotban, amely tovább árnyalja az AppA fehérje fotokémiájáról való ismereteinket. A kapott TRIR spektrumok és a globális analízis arra enged következtetni, hogy az AppA BLUF W104Y mutánsban egyidejűleg megy végbe a PCET, a gerjesztés után $\sim 2\text{ ps}$ -mal, valamint mind a proton, mind az elektron forrása a flavinhoz közeli tirozin. Méréseinkkel a vibrációs gyökök azonosításán kívül arra is sikerült rávilágítanunk, milyen bravúrosan érzékeny (kis arányban kialakuló gyököket is kimutatni képes) módszer a tranziens infravörös spektroszkópia.

Az OaPAC fotoaktivációjának vizsgálata

Munkánk során a teljes hosszúságú – nem csak a BLUF domént, hanem az AC domént is tartalmazó – OaPAC fehérjén végeztünk ultragyors spektroszkópiai méréseket. Az OaPAC, amellet, hogy jó modell rendszer a fotokémia tanulmányozására, kiváló lehetőséget nyújt a BLUF és az AC domén közötti jelátvitel vizsgálatára is, ami a fény hatására végbemenő ATP-cAMP (+PPi) konverzió vizsgálatával figyelhető meg. Méréseink láthatóvá teszik a BLUF doménben végbemenő fotokémiai folyamatok közvetlen hatását az output doménre, amely hiánypótló a BLUF domén fehérjék irodalmában. Ultragyors infravörös és tranziens abszorpciós mérésekkel sikerült megmutatnunk, hogy az OaPAC-ben a fotoaktiváció egyidejű proton kapcsolt elektron transzfer (PCET) nyomán valósul meg a konzervált Y6 tirozintól a

gerjesztett állapotú flavinhoz (FAD^{*}). Ettől eltérően a PixD-ben a fotoaktiváció során szekvenciális PCET-t figyeltünk meg az Y8 tirozintól a FAD^{*}-hoz.



Az Y6 szerepét az OaPAC fotociklusában UAA mutagenézis (nem kanonikus aminosavak mutagenézise) segítségével vizsgáltuk. Az Y6 tirozin n-FY analógokkal való cseréje növeli a fenol hidroxil csoport savasságát és csökkenti az elektron transzfer valószínűségét. A flavin pK értékének és/vagy redukciós potenciáljának változtatása nagyban befolyásolta a világos állapot kialakulását a 2,3 - F₂Y6, a 3,5 - F₂Y6 és a 2,3,5 - F₃Y6 mutánsok esetében. Ezekben a mutánsokban a fotociklus FAD⁻ állapotnál való elakadását tapasztaltuk. Enzimatiskus esszé alkalmazásával – amely megmutatja a P_i termelődés és a NADH emésztés kapcsolatát – sikerült számszerűsíteni a vad típusú OaPAC és az n-FY6 mutánsok adenilát cikláz aktivitását, az Y6 pK értékének ATP-cAMP (és P_i) konverzióra való hatásának vizsgálatával. Az enzim esszé eredmények azt mutatták, hogy egyedül a 7,8-as, vagy annál magasabb pK értékkel rendelkező n-FY6 mutánsok voltak képesek katalizálni az ATP - cAMP (+ P_i) konverziót, míg az alacsonyabb pK értékkel rendelkező mutánsok inaktívak maradtak, hiszen a fotociklus megszakadt a FAD⁻-nál. A 2,3-F₂Y6 OaPAC (pK=7,8) esetében látható volt a fényaktivált adenilát cikláz aktivitás, azonban a mutáns TRIR spektrumában nem volt detektálható a világos állapot. A TRMPS spektrumban sem láttunk a világos állapot

kialakulására utaló módust ennél a mutánsnál, mert feltehetően az „egy-lövéses” jelleg miatt nem alakult ki detektálható mennyiségű világos állapot. Összességében, eredményeink új fényt vetnek a BLUF domén fehérjék fotoaktivációjára.

PUBLIKÁCIÓK

1.

„Unraveling the Photoactivation Mechanism of a Light-Activated Adenylyl Cyclase Using Ultrafast Spectroscopy Coupled with Unnatural Amino Acid Mutagenesis”

Jinnette Tolentino Collado, James N. Iuliano, Katalin Pirisi, Samruddhi Jewlikar, Katrin Adamczyk, Gregory M. Greetham, Michael Towrie, Jeremy R. H. Tame, Stephen R. Meech, Peter J. Tonge, and Andras Lukacs

ACS Chemical Biology, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00575> **IF: 4.634** 2022

2.

“Identification of the vibrational marker of tyrosine cation radical using ultrafast transient infrared spectroscopy of flavoprotein systems,”

Katalin Pirisi, Lipla Nag, Zsuzsanna Fekete, James N. Iuliano, Jinnette Tolentino Collado, Ian P. Clark, Ildikó Pécsi, Pierre Sourina, Ursula Liebl, Gregory M. Greetham, Peter J. Tonge, Stephen R. Meech, Marten H. Vos, András Lukács

Photochemical and Photobiological Sciences, vol. 20, no. 3, 2021 **IF: 4.328**

doi: 10.1007/s43630-021-00024-y.

REFERENCIÁK

- [1] S. Y. Park and J. R. H. Tame, "Seeing the light with BLUF proteins," *Biophysical Reviews*, vol. 9, no. 2, 2017. doi: 10.1007/s12551-017-0258-6.
- [2] Y. T. Kao *et al.*, "Ultrafast dynamics of flavins in five redox states," *J Am Chem Soc*, vol. 130, no. 39, 2008, doi: 10.1021/ja8045469.
- [3] M. Iseki *et al.*, "A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*," *Nature*, vol. 415, no. 6875, 2002, doi: 10.1038/4151047a.
- [4] S. Masuda and C. E. Bauer, "AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*," *Cell*, vol. 110, no. 5, 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00876-0.
- [5] K. S. Conrad, C. C. Manahan, and B. R. Crane, "Photochemistry of flavoprotein light sensors," *Nature Chemical Biology*, vol. 10, no. 10, 2014. doi: 10.1038/nchembio.1633.
- [6] M. Ohki *et al.*, "Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 24, 2016, doi: 10.1073/pnas.1517520113.
- [7] M. Gomelsky and S. Kaplan, "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*, vol. 177, no. 16, 1995, doi: 10.1128/jb.177.16.4609-4618.1995.
- [8] S. Masuda, "Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors," *Plant and Cell Physiology*, vol. 54, no. 2, 2013. doi: 10.1093/pcp/pcs173.
- [9] S. Masuda, K. Hasegawa, H. Ohta, and T. A. Ono, "Crucial role in light signal transduction for the conserved Met93 of the BLUF protein PixD/Slr1694," *Plant Cell Physiol*, vol. 49, no. 10, 2008, doi: 10.1093/pcp/pcn132.
- [10] Pirisi Katalin, "Femtosekundumos tranziens abszorpciós rendszer vezérlése," PTE-TTK , Pécs, 2013.
- [11] G. M. Greetham *et al.*, "ULTRA: A unique instrument for time-resolved spectroscopy," in *Applied Spectroscopy*, 2010, vol. 64, no. 12. doi: 10.1366/000370210793561673.
- [12] G. N. R. Tripathi and R. H. Schuler, "The resonance Raman spectrum of phenoxyl radical," *J Chem Phys*, vol. 81, no. 1, 1984, doi: 10.1063/1.447373.
- [13] C. R. Johnson, M. Ludwig, and S. A. Ashen, "Ultraviolet Resonance Raman Characterization of Photochemical Transients of Phenol, Tyrosine, and Tryptophan," *J Am Chem Soc*, vol. 108, no. 5, 1986, doi: 10.1021/ja00265a010.
- [14] S. Gerken, K. Brettel, E. Schlodder, and H. T. Witt, "Optical characterization of the immediate electron donor to chlorophyll a+II in O₂-evolving photosystem II complexes Tyrosine as possible electron carrier between chlorophyll all and the water-oxidizing manganese complex," *FEBS Lett*, vol. 237, no. 1–2, 1988, doi: 10.1016/0014-5793(88)80174-1.
- [15] K. Karadi *et al.*, "Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-59073-5.

- [16] V. Dragnea, A. I. Arunkumar, Y. Hua, D. P. Giedroc, and C. E. Bauer, "Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: Addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state," *Biochemistry*, vol. 48, no. 42, 2009, doi: 10.1021/bi9009067.
- [17] S. Masuda, Y. Tomida, H. Ohta, and K. ichiro Takamiya, "The Critical Role of a Hydrogen Bond between Gln63 and Trp104 in the Blue-Light Sensing BLUF Domain That Controls AppA Activity," *J Mol Biol*, vol. 368, no. 5, 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.087.
- [18] T. Fujisawa, S. Takeuchi, S. Masuda, and T. Tahara, "Signaling-state formation mechanism of a BLUF protein PapB from the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris* studied by femtosecond time-resolved absorption spectroscopy," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 51, 2014, doi: 10.1021/jp5076252.
- [19] A. A. Gil *et al.*, "Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues," *J Am Chem Soc*, vol. 139, no. 41, 2017, doi: 10.1021/jacs.7b07849.
- [20] J. J. Goings, C. R. Reinhardt, and S. Hammes-Schiffer, "Propensity for Proton Relay and Electrostatic Impact of Protein Reorganization in Slr1694 BLUF Photoreceptor," *J Am Chem Soc*, vol. 140, no. 45, 2018, doi: 10.1021/jacs.8b07456.
- [21] J. J. Goings and S. Hammes-Schiffer, "Early Photocycle of Slr1694 Blue-Light Using Flavin Photoreceptor Unraveled through Adiabatic Excited-State Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Dynamics," *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 51, 2019, doi: 10.1021/jacs.9b11196.
- [22] S. Masuda, K. Hasegawa, and T. A. Ono, "Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using FAD (BLUF) domain of AppA for a signaling state," *Biochemistry*, vol. 44, no. 4, 2005, doi: 10.1021/bi047876t.
- [23] A. A. Gil *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*, vol. 138, no. 3, 2016, doi: 10.1021/jacs.5b11115.
- [24] R. Brust *et al.*, "Ultrafast structural dynamics of BlsA, a photoreceptor from the pathogenic bacterium *Acinetobacter baumannii*," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 5, no. 1, 2014, doi: 10.1021/jz4023738.
- [25] P. Goyal and S. Hammes-Schiffer, "Role of active site conformational changes in photocycle activation of the AppA BLUF photoreceptor," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 7, 2017, doi: 10.1073/pnas.1621393114.
- [26] A. Lukacs *et al.*, "BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state," *J Am Chem Soc*, vol. 136, no. 12, 2014, doi: 10.1021/ja4121082.
- [27] P. Zirak, A. Penzkofer, T. Schiereis, P. Hegemann, A. Jung, and I. Schlichting, "Photodynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*," *J Photochem Photobiol B*, vol. 83, no. 3, 2006, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.12.015.