

**Ph.D. ÉRTEKEZÉS**

**AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia és  
ultragyors spektroszkópai eszközökkel**

Karádi Kristóf Kálmán



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2020

Témavezető: Dr. Lukács András

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs <sup>†</sup>, Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130/1993)

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Támogatás

EFOP-3.6.1-16-2016-00004

EFOP-3.6.2-16-2017-00005

## Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás .....	5
Előszó .....	6
Rövidítések jegyzéke .....	7
1. Bevezetés .....	9
1.1. Fotoreceptorok .....	9
1.2. Flavint használó fotoreceptorok .....	9
1.3. A fotoliáz és kriptokróm család .....	9
1.4. LOV fehérjék .....	10
1.5. Flavin adenint használó kék-fény szenzorok (BLUF domain) .....	11
1.6. AppA .....	12
1.7. A BLUF-domén szerkezete .....	13
1.8. BLUF-domén W104 .....	15
2. Célkitűzések .....	17
3. Anyagok és módszerek .....	18
3.1. Elméleti háttér .....	18
3.1.1. Fluoreszcencia .....	18
3.1.2. Abszorpció mérése .....	19
3.1.3. Steady state fluoreszcencia emissziós spektroszkópia .....	21
3.1.4. Time correlated single photon counting (TCSPC, időkorrelált egy -foton számlálás) .....	21
3.1.5. Anizotrópia mérése .....	25
3.1.6. FRET (fluoreszcencia vagy Förster-féle rezonancia energia transzfer) .....	29
3.1.7. Kioltás mérése (quenching) .....	32
3.1.8. Tranziens infravörös spektroszkópia (transient infrared spectroscopy, TRIR) .....	36
3.1.9. Kerr-kapus idő-felbontásos spektroszkópia .....	39
3.2. Felhasznált anyagok és eszközök .....	42
3.2.1. Anyagok .....	42
3.2.2. Steady State optikai és fluoreszcens mérések .....	43
3.2.3. Kioltási mérések .....	43
3.2.4. Nanoszekundomos idő-felbontásos fluoreszcencia lecsengés mérések .....	43
3.2.5. Pikoszekundumos idő-felbontásos fluoreszcencia mérések .....	44
3.2.6. Tranziens infravörös spektroszkópia .....	45
4. Eredmények .....	46

4.1.	FRET mérések.....	46
4.2.	A 7-aza-Trp analóg (7AW) használatának előnyei .....	46
4.3.	FRET: 7-aza-W104/W64F AppA <sub>BLUF</sub> fluoreszcencia élettartam mérései .....	53
4.4.	FRET: akceptor érzékenyítés módszere .....	57
4.5.	FRET-tel meghatározott távolságok összehasonlítása kristály struktúrákból származó távolságokkal .....	61
4.6.	7-azaTrp-W64F akrilamid kioltási mérései.....	63
4.7.	Anizotropia mérések.....	64
4.8.	Flavin fluoreszcencia élettartama sötét és világos állapot esetén .....	65
4.9.	Tranziens infravörös mérések.....	70
5.	Diszkuszió .....	74
6.	Konklúziók.....	77
7.	Referenciák .....	79
8.	Publikációk .....	92

## Köszönetnyilvánítás

*Legelőször szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Lukács Andrásnak szakmai vezetéséért, türelméért, és amiért a nehezebb helyzetekben megosztotta velem élettapasztalatát, látásmódját.*

*Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak, amiért biztosította a lehetőséget, hogy a Biofizikai Intézetben kutathassak.*

*Köszönettel tartozom Dr. Fekete Zsuzsannának, Hoffmanné Simon Évának és Kapronczai Róbertnek a fehérje preparálás terén nyújtott segítségükért. Ugyanitt köszönet illeti Dr. Pécsi Ildikót az analóg minta készítése kapcsán nyújtott segítségéért, valamint Kiliánné Raics Katalint a pH-függő mérések kapcsán. Továbbá Dr. Orbán József témabeli munkásságát is köszönet illeti.*

*Köszönettel tartozom külföldi kollégáinknak, kiváltképpen Dr. Yin Linek és Dr. Sofia Kapetanakinak, akikkel lehetőségem nyílt személyesen is együtt dolgozni.*

*Köszönettel tartozom Brunner Jánosnénak a laborban nyújtott rengeteg segítségért.*

*Szeretnék köszönetet mondani Kapronczai Róbertnek, Tempfliné Pirisi Katalinnak, és Telek Eleknek a mindennapi munkám során nyújtott támogatásukért.*

*Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai Intézet minden dolgozójának a munkámban nyújtott segítségükért, útmutatásukért.*

*Szeretnék köszönetet mondani Szüleimnek, amiért kezdetektől fogva gondoskodóan egyengetik Testvéreim és jómagam útjait.*

*Végül szeretnék köszönetet mondani Jegyesemnek a mindennapokban nyújtott lelki támogatásért, temérdek szeretetéért.*

## Előszó

A fizika tudományának célja a természet törvényszerűségeinek feltárása, melyek megismerésével közelebb kerülhetünk az univerzumunk megértéséhez. Azonban az univerzum objektumai, a legapróbb szubatomi részecskéktől az óriási csillagokig, mind olyannyira összetettek, hogy csak lépcsőről lépésre tárhatjuk fel a titkaikat. Ezért kezdetben bizonytalan, de fokozatosan javuló, a valósághoz mindinkább közelítő modelleket alkotunk. Előfordulhat, hogy függetlenül megalkotott, témájukban egymástól távol álló modellek segítik elő egymás kölcsönös előrehaladását. Gondoljunk csak Rutherfordra, aki az atomi szerkezetet a Naprendszer modelljével kötötte össze. Az alább ismertetett munkám az élethez elengedhetetlen makromolekulákról, a fehérjékről szerzett tudásunk tárházának bővítéséhez kíván hozzájárulni. Bár a fehérjékről meglévő ismereteink jelentősen gyarapodtak az utóbbi időben, továbbra is sok a megoldatlan enigma. Egy ilyen magyarázatra szoruló rejtély az általunk vizsgált fotoaktív protein kék fény hatására bekövetkező változása is. Ennek a folyamatnak a leírására készített modellt kívánjuk pontosítani fluoreszcenciai spektroszkópiai eszközök felhasználásával. A modell korrekciója, illetve egy belső ellentmondásának feloldása érdekében végzett kutatásunk konklúziója a jövőben hasznos tanulságokkal szolgálhat más hasonló rendszerek megértéséhez.

## Rövidítések jegyzéke

7AW: 7-aza-Trp analóg

7-aza-W: 7-aza-Trp analóg

A: akceptor

AD: akceptor donor jelenlétében

AEM: akceptor érzékenyítés módszere - acceptor enhancement method

AppA: activation of photopigment and puc expression A

BBO:  $\beta$ -bárium borát

BlrB: blue-light receptor of the BLUF-family

BLUF: sensors of blue light using flavin

CPS: beütés per másodperc - counts per second

D: donor

DA: donor az akceptor jelenlétében

DNS: dezoxiribonukleinsav

em: emissziós

ET: elektron transzfer

FAD: flavin adenin dinukleotid

FAD\*: gerjesztett állapotú FAD

FL: fluoreszcencia

FMN: flavin mononukleotid

FRET: fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer

gerj: gerjesztési

GTP: guanozin-trifoszfát

IRF: impulzusválasz függvény - instrument response function

LED: fényt kibocsátó dióda - light-emitting diode

LOV: light oxygen voltage

MC: monokromátor - monochromator

OaPAC: oscillatoria acuminata photoactivated adenylate cyclase

OD: optikai denzitás

OPA: optikai parametrikus erősítő - optical parametric amplifier

DFG: különbségfrekvencia keltés - difference frequency generation

PBS: foszfát-pufferolt sóoldat - phosphate-buffered saline

PCR: polimeráz-lánreakció - polymerase chain reaction

pdb: protein data bank

PET: fotoindukált elektrontranszfer - photoinduced electron transfer

PpsR: phosphoenolpyruvate synthase regulatory protein

PYP: fotoaktív sárga protein - photoactive yellow protein

TAC: idő-amplitúdó konverter - time amplitude converter

TCSPC: időkorrelált egyfoton számlálás - time correlated single photon counting

ThyX: timidilát szintáz

TRIR: tranziens infravörös spektroszkópia - transient infrared spectroscopy

vis: látható - visible

WT: vad típus - wild type



# 1. Bevezetés

## 1.1. Fotoreceptorok

Az ember számára talán a legfontosabb információforrást jelentő látás folyamatához hasonló módon, a fény érzékelése más egyszerűbb létformák esetén is nagy jelentőséggel bír. A fény percepciójának eredményeképpen a szervezet szabályozhatja egyes sejtfolymatait, mint például a növényeknél a fotoszintézist. Mindehhez természetesen szükség van olyan fehérjékre, melyek valamilyen módon reagálnak a fényre, azaz érzékelni képesek azt. Ezeket a fehérjéket fotoreceptoroknak nevezzük. Az elmúlt évtizedekben számos fotoreceptor családot sikerült azonosítani, például a rodopszineket, xanthopszineket, fitokrómokat, UV-rezisztencia locus 8 család fehérjéket <sup>1,2</sup>, valamint három flavint használó fehérje családot. Ezekben a makromolekulákban a fény energiájának abszorpciója strukturális változásokat eredményezhet. Minden receptor esetében egyedi, hogy milyen energiájú, azaz milyen hullámhosszú fény elnyelésére képesek <sup>3</sup>.

## 1.2. Flavint használó fotoreceptorok

Eddigi ismereteink alapján több száz enzim <sup>4</sup> tartalmaz flavint valamely formájában, azonban ezek közül az enzimek közül csak néhány fotoaktív <sup>5,6</sup>. A fotoaktív flavoproteinek funkciója szorosan kapcsolódik az őket gerjesztő fény hatására végbemenő változásokhoz, melyeknek köszönhetően képesek betölteni a szerepüket a szervezetben. Ezeket a fehérjéket a fényre adott reakciójuk alapján három nagy családra oszthatjuk: az egy nagy családba tartozó fotoliázokra és kriptokrómokra, az LOV (Light Oxygen Voltage) fehérjékre, valamint a BLUF (Blue light sensing using FAD) domén fehérjékre. A következőekben ezeket tárgyalom <sup>7</sup>.

## 1.3. A fotoliáz és kriptokróm család

A fotoliázok és a kriptokrómok nagyfokú szerkezeti homológiával rendelkező fehérjék <sup>8</sup>, ezért sorolják őket egy családba, funkciójuk azonban különböző. A fotoliázok elsődleges feladata az UV-indukált DNS hibák javítása <sup>9</sup>. A kriptokrómok a növények kék fény érzékeléséért és az általa kiváltott hatások inicializálásáért felelnek. A kripto szótag, mely görögül rejtettet jelent, eredete az, hogy sokáig nem sikerült a fehérjét azonosítani, létezésére a növények kék fény kiváltotta

viselkedése ultalt csupán <sup>10</sup>. Elsőként *A. thaliana*-ban <sup>11</sup> és *Sinapsis alba*-ban <sup>12</sup> azonosították, majd később humán sejtekben is kimutatták <sup>13-16</sup>. Ugyan a fotoliázokkal jelentős szekvenciális homológiát mutatnak <sup>11,17</sup>, azonban DNS javításra nem képesek <sup>13</sup>. Pontos definíció szerint a kriptokrómok fotoliáz szekvencia homológok, melyek kék fény aktiválta enzim funkcióval rendelkeznek, míg DNS javító képességgel nem <sup>9,18-21</sup>.

A felfedezésük óta nyilvánvalóvá vált, hogy a kriptokrómok funkciója nagyon széles spektrumon mozog. A korábban már említett, növényekben fontos kék fény érzékelésen túl a rovarokban, akárcsak az emberben a cirkadián ritmus befolyásolásában van szerepük, de szintén jelentős feladatuk a vándorló madarak tájékozódásának elősegítése magnetorecepció révén <sup>22,23</sup>. Érdekesség, hogy a növényi kriptokrómok filogenetikailag ősbibek, mint az állati eredetűek. Ez utóbbiak teljesen független evolúciós úton alakultak ki, amit a megismételt evolúció elmélete igyekszik megmagyarázni <sup>24</sup>.

A fotoliázok és kriptokrómok a feladatukat a fotoindukált elektron transzfernek köszönhetően képesek ellátni: a kék fény által gerjesztett flavin egy elektront szerez egy közeli aminosavról, amely leggyakrabban egy triptofán. Az elektron transzfer folyamata során az elektron szekvenciálisan „ugrál” három konzervált triptofánból álló „nano-dróton” <sup>22,25,26</sup>.

#### 1.4. LOV fehérjék

Az LOV fehérjék megtalálhatóak növényekben, baktériumokban, gombákban és archeákban is <sup>27</sup>. A szekvenált prokarióta genomok több mint tíz százalékában előfordulnak <sup>28</sup>. LOV domén alap állapotban egy nem-kovalensen kötött oxidált flavin mononukleotidot (FMN) tartalmaz <sup>29</sup>.

Az FMN a kék fénnel történő gerjesztés hatására triplet állapotba kerül. Ezt követően kovalens kötés alakul ki egy közeli cisztein és a flavin között, ami például a phototropin kináz aktiválását segíti elő <sup>6</sup>.

Az említett triplet állapot néhány nanoszekundum alatt alakul ki, majd néhány milliszekundum múlva relaxálódik az alapállapotba. A fotoaktivált állapot a legtöbb esetben a kialakult kovalens kötés felbomlásával legfeljebb néhány óra alatt szobahőmérsékleten relaxálódik <sup>28,29</sup>.

A fotociklust legegyszerűbben olyan mutációkkal lehet befolyásolni, melyek az FMN-t stabilizáló hidrogén-híd kötésrendszer megváltozását eredményezik<sup>29,30</sup>.

A LOV az adott fehérjén belül számos különböző vele interakcióba kerülő doménre képes fotoaktivációja révén hatni. Ezek közt a kináz aktivitású alegységeken kívül szerepelnek foszfatázok, second-messenger regulátorok, vagy DNS-kötő részek<sup>28-31</sup>.

Az LOV domén érdekes tulajdonsága, hogy világos állapotban nem fluoreszkál. A vizsgált minta fluoreszcenciájának megszűnése jelzi a domén világos állapotba kerülését, azaz azt, hogy megtörtént a fényérzékelés. Az LOV domén másik előnye, hogy a sötét állapotú fluoreszcenciája nem igényli oxigén jelenlétét, így anaerob rendszerekben is alkalmazható. Többek között ezek a jellemzők teszik a LOV domén fehérjék használatát optimálissá az optogenetikai kutatások számára, megfelelőek lehetnek sejtek nem-destruktív hullámhosszon történő optikai szabályozásában. Yi I. Wu és munkatársai egy kísérletükben például sejtmozgás szabályzásához vették igénybe az iménti tulajdonságai miatt, melynek során elérték, hogy egy aktin citoskeletális dinamikáért felelős GTPase-hoz kössön, amit mindaddig gátolt, amíg meg nem világították 458 vagy 473 nm-es fényvel<sup>32</sup>.

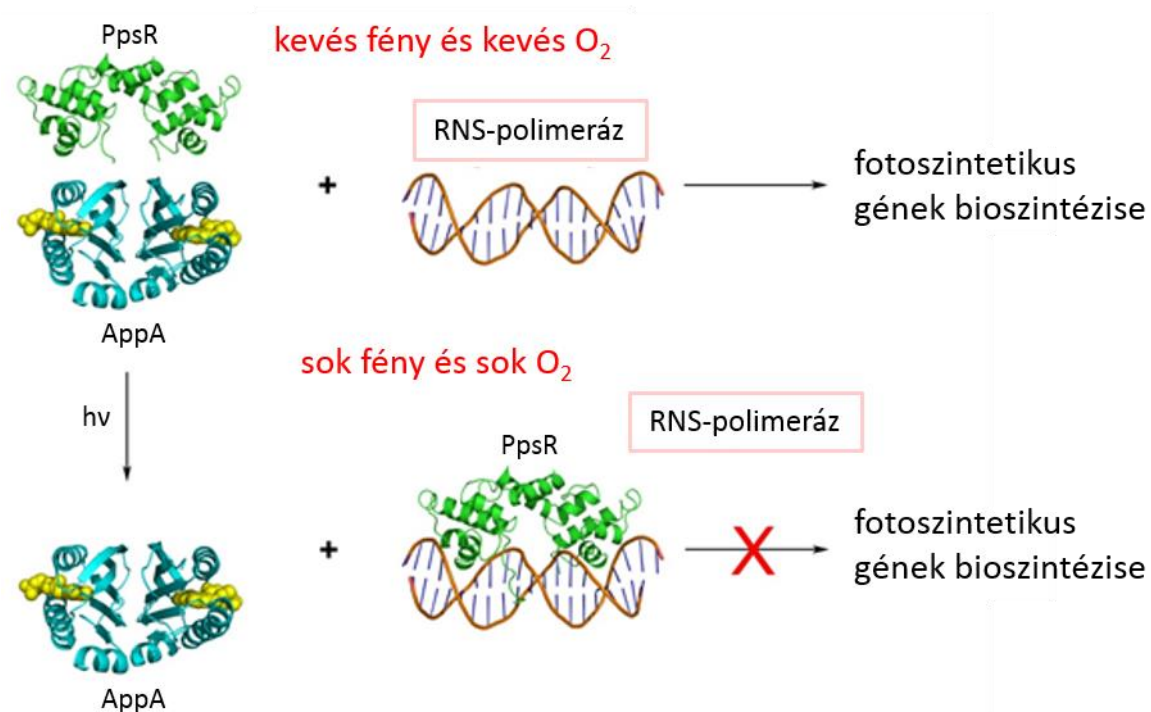
### 1.5. Flavin adenint használó kék-fény szenzorok (BLUF domain)

A BLUF-domén fehérjék számos algában és a szekvenált baktériumok mintegy tíz százalékában megtalálhatók<sup>3,33</sup>. A BLUF-domén proteinek számos biológiai funkciót töltenek be: szerepet kapnak a fotoszintetikus gének bioszintézisében, biofilm képződésben és fényelkerülési válasz kialakulásában is<sup>34,35</sup>. Ez a család azért is különleges, mert míg más fotoreceptorok fényérzékelése esetén jelentős strukturális változások zajlanak le a fehérje szerkezetében (pl. kovalens kötés kialakulása), addig a BLUF domén fehérjék esetében csak finomabb módosulások történnek<sup>3</sup>. 2002-ben két egymástól teljesen független kutatócsoport egy időben fedezte fel őket. Az egyik csoport fotoszintetikus gének expressziójának szabályozását vizsgálta *Rhodobacter sphaeroideben*<sup>34,36</sup>, míg a másik csoport *Euglena gracilis* alga fényelkerülési válaszát kutatta<sup>37</sup>. A *Rhodobacter sphaeroides*hez hasonló egyéb fotoszintetikus bíbor baktériumokban nagy intenzitású fény hatására a fotoszintetikus rendszer szabályozása megváltozik, melynek során az addig gátolt transzkripciós represszor PpsR működésbe lép, elősegítve a fotoindukált

károsodások elkerülését <sup>38,39</sup>. Például az *R. sphaeroides* esetén kék fény hatására nagy mértékben lecsökken a fotoszintézis, ami alapján arra következtettek, hogy a baktérium szükségszerűen rendelkezik egy kék fény érzékelésre alkalmas fehérjével, amely, mint később kiderült, a következő bekezdésben taglalt AppA <sup>3,40</sup>.

## 1.6. AppA

Az AppA-t 1995-ben fedezték fel <sup>41</sup> egy olyan *R. sphaeroides* mutánsban, melyben a módosult fehérje miatt a *puc* operon nem aktiválódott. Ez alapján kapta a fehérje az AppA nevet: activation of photopigment and *puc* expression A <sup>3</sup>. A fehérje vizsgálata során kiderült, hogy a protein az N-terminálisnál egy flavint köt, amely alapján feltételezték, hogy redox-folyamatokban játszik szerepet <sup>42</sup>. 2002-ben fedezték fel <sup>34,36</sup>, hogy kék fény elnyelését követően jelentős konformációs változások történnek az AppA-ban, aminek következtében az AppA-PpsR komplex disszociál, majd leáll a fotoszintetikus gének bioszintézise, mivel a PpsR gátolja azok transzkripcióját <sup>3</sup>.

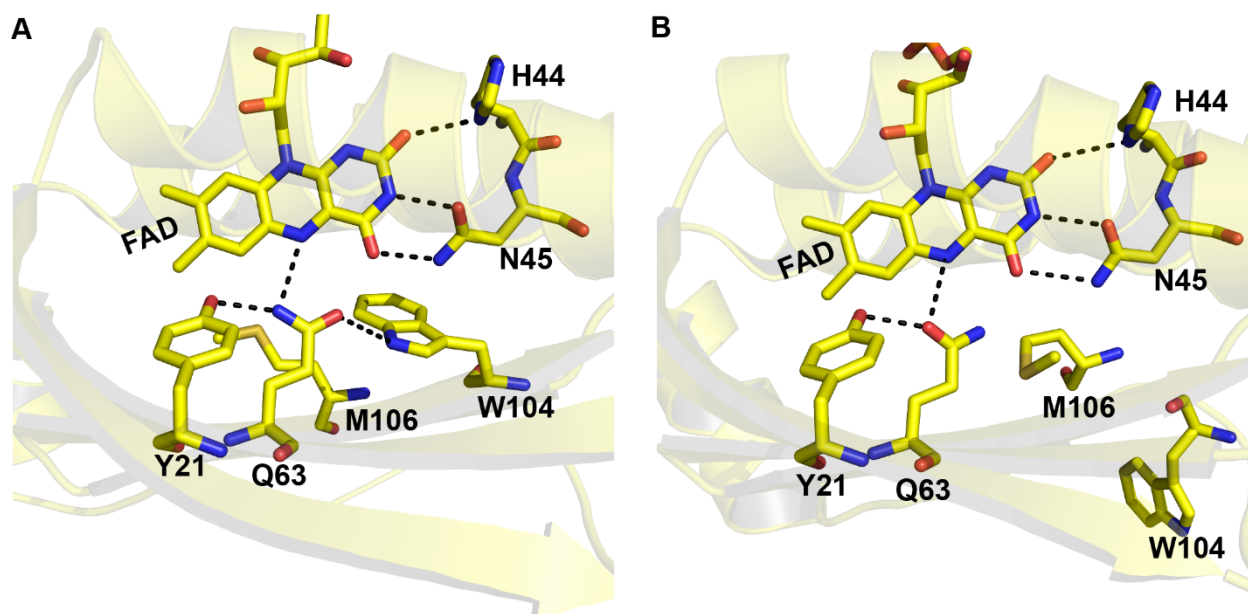


**1. ábra** Az AppA működésének lépései <sup>34</sup>

Természetesen a baktériumokban más BLUF-domén proteinek is szerepet kapnak, mint például a PixD/Slr1694, melyet a *Synechocystis* cianobaktériumban írtak le először és ami pozitív

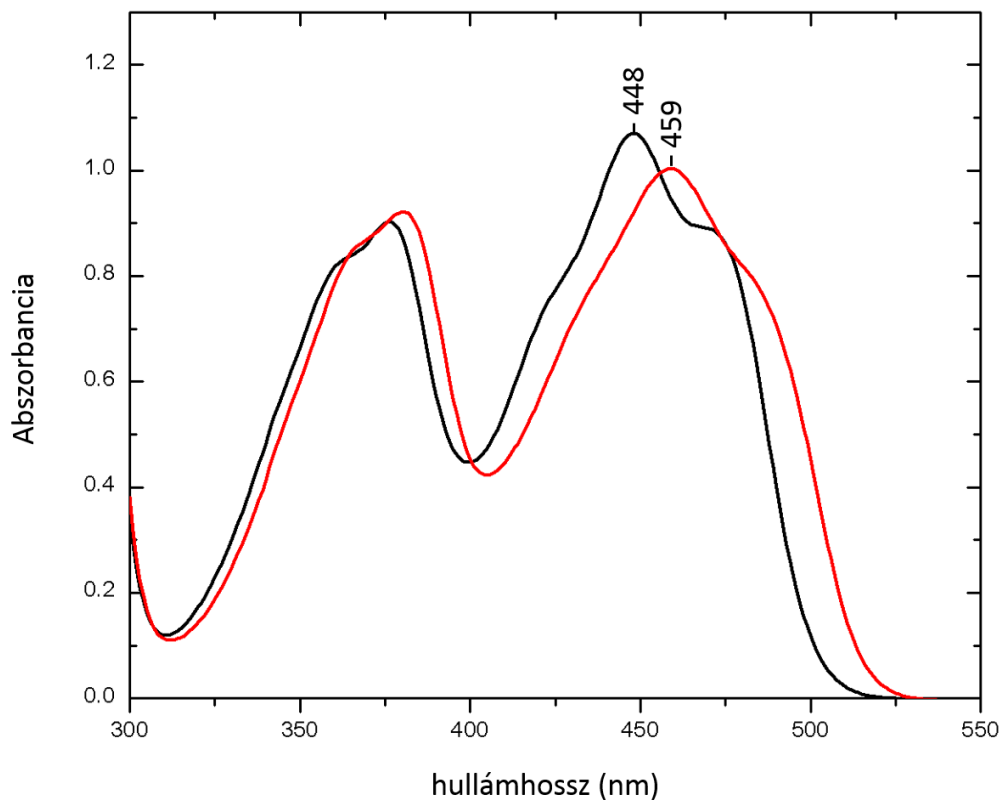
fototaxist eredményez fehér, kék és vörös fényű megvilátítás esetén <sup>43,44</sup>. A PixD mutáns baktériumok ezzel szemben a fény forrástól intenzíven távolodnak. Ennek magyarázata, hogy a PixD a PixE-vel pozitív fototaxisért felelős komplexet alkot, ez viszont intenzív fény hatására ez esetben gyengül <sup>3,45-50</sup>.

## 1.7. A BLUF-domén szerkezete



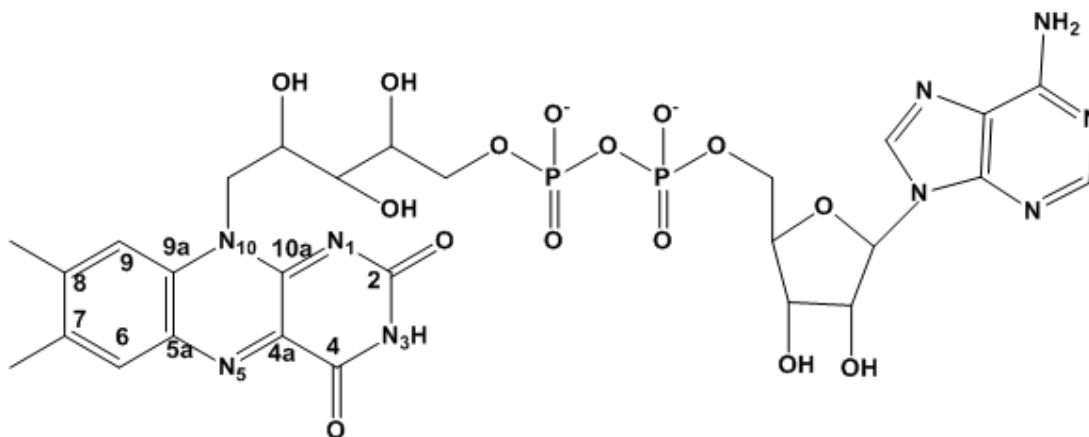
**2. ábra** Az AppA-BLUF-domén röntgenkristallográfiás szerkezetének szalag diagramjai. A ábra: WT AppA (pdb:1yrx). B ábra: C20S AppA (pdb:2iyg). A szaggatott vonallal jelölt hidrogén kötések kapcsán fontos alkotóelemek: Y21,H44,N45,Q63. A két ábra célja a W104 két lehetséges pozíciójának bemutatása.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

A BLUF doménben a FAD, a közelében elhelyezkedő tirozin, glutamin és triptofán aminosavakkal, egy tetrádot alkot <sup>7</sup>. A kék-fény abszorpciója a tetrád hidrogén-kötés hálózatát rendezi át és ez hozzá létre a BLUF-domén világos állapotát, aminek következtében a sötét-világos fotoaktiváció során a FAD S0-S1 átmenetéhez tartozó abszorpció maximum 10-15 nm-rel eltolódik.



**3. ábra** WT AppA<sub>BLUF</sub> abszorpciós spektruma sötét (fekete) és világos (piros) állapotban.

A tetrád hidrogén-kötés rendszerében bekövetkezett változás jól megfigyelhető a fehérje IR spektrumában: az FAD  $C_4 = O_4$  karbonil rezgéséhez (4. ábra) rendelt hullámszám érték <sup>51</sup>  $20\text{ cm}^{-1}$ -rel csökken <sup>52,53</sup>. A tetrád részét képező Y21-nek, valamint Q63-nak a folyamatban betöltött kulcsszerepét bizonyítja, hogy ezek mutációval való eltávolítása esetén az említett vörös eltolódás nem észlelhető <sup>7,52-56</sup>.



4. ábra FAD szerkezeti képlete.

### 1.8. BLUF-domén W104

Az általunk vizsgált W104 szintén fontos tényező, mivel mutációja a fotoaktiváció folyamatának jelentős megváltozását eredményezi <sup>7,57</sup>. Azokban a mutánsokban, ahol ezt a triptofánt alaninra cserélték App<sub>BLUF</sub> esetében, idő-felbontásos infravörös kísérletek kimutatták, hogy a fotoaktiváció hatására csak enyhébb strukturális változások történtek a vad-típusú fehérjéhez képest. Ezen felül megfigyelték, hogy a fotoaktivált állapot relaxációja nyolcvanszor gyorsabban megy végbe a 104-es pozícióban alanint tartalmazó App<sub>BLUF</sub> mutáns esetében <sup>35, 58</sup>. Egy másik vizsgálat során, ahol az említett triptofánt fenilalaninra cserélték App<sub>BLUF</sub>-ben, 1.5-szeresére nőtt a fotoaktiváció kvantumhatásfoka, míg a világos állapotból sötét állapotba való visszatéréshez szükséges relaxációs sebesség enyhe növekedést mutatott <sup>59</sup>. A W104A mutáció a teljes hosszúságú fehérje esetén gátolja a vörös eltolódást <sup>60</sup>, lényegében érzéketlenné téve a fehérjét a kék-fényre, ezzel gátolva annak megfelelő működését <sup>58</sup>.

Izgalmas kérdés, hogy a 104-es triptofán pontosan hogyan is helyezkedik el az AppA-ban és más BLUF domén fehérjékben a fotoaktiváció során, főként mivel az utóbbi években egymásnak ellentmondó eredmények születtek. Az AppA első kristályszerkezete alapján a W104 sötét állapotban a flavin közelében helyezkedik el <sup>61</sup>. Ezzel szemben Ilme Schlichting csoportja úgy találta <sup>62</sup>, hogy a W104 a flavintól elfelé mutat mind sötét, mind világos állapotban. Más BLUF domén fehérjék kristályszerkezet alapján, úgymint a PixD <sup>63,64</sup>, a BlrB <sup>65</sup> és az OaPAC <sup>66</sup> esetén ugyanez a triptofán szintén elfelé mutatott. Sőt az Slr1694 protein szerkezeti modellje alapján

csak tízből egy kristallográfiai alegység triptofánja állt a flavin irányába, míg a többi kifelé mutatott <sup>64</sup>.

Udvarhelyi és társai <sup>67</sup>, valamint Collette és társai <sup>68</sup> egymástól függetlenül úgy vélték, hogy a triptofán a sötét állapotban a flavintól elfelé mutat, míg Goyal és Hammes-Schiffer <sup>69</sup> előzőektől független energetikai számításuk alapján azt állították, hogy mindkét elhelyezkedés lehetséges, sőt a befelé mutató a stabilabb. NMR szerkezeti kísérletek <sup>70</sup>, valamint UV rezonancia Raman kísérletek is a befelé mutató állapotot erősítették meg a sötét állapot vizsgálata során <sup>71</sup>. Fluoreszcencia kísérletek szerint a triptofán nincs teljesen kitéve az oldószernek, ettől függetlenül a pozíciója továbbra is vitatott maradt <sup>7,60,72</sup>.



## 2. Célkitűzések

Az optogenetika fejlődésével egyre sürgetőbb a fehérjék fény indukálta folyamatainak pontos megismerése. Az adekvát információk hozzásegíthetnek bennünket bizonyos élettani események fényel történő szabályozásához. Ilyen folyamat az AppA fotoaktivációja is, melynek eddigi leírásai ugyan ellentmondásokkal tarkítottak, azonban ezek tisztázása segítheti más jelenségek megértését is.

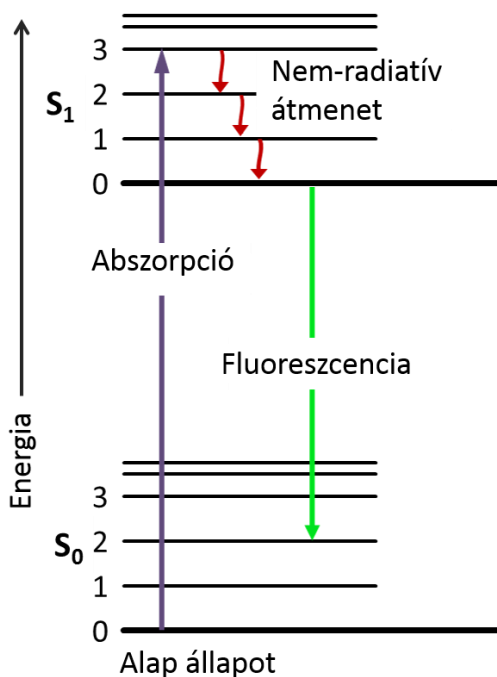
Munkánk célja feltérképezni az AppA 104-es triptofánjának fotoaktiváció során tanúsított viselkedését, valamint feloldani a szakirodalomban található látszólagos ellentmondásokat. A munka további célja a W104 pozíciójának vizsgálata a FAD-dal történő kölcsönhatásának fényében. Ezeket a folyamatokat igyekeztünk minél több módszerrel megvizsgálni, hogy elegendő bizonyítékot szerezzünk a W104 dinamikájának hiteles leírásához, ezért fluoreszcencia élettartam-lecsengés, anizotrópia-lecsengés, kioltási, tranziens infravörös és FRET méréseket végeztünk. A mérések során elengedhetetlen biztosítani, hogy a kinyert adatok valóban a W104-re vonatkozzanak, ennek érdekében törekedtünk a potenciálisan zavaró tényezőket a lehető legteljesebb mértékben kizárni.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Elméleti háttér

#### 3.1.1. Fluoreszcencia

Munkánk során a legtöbb vizsgálati eljárás a fluoreszcencia jelenségéhez kötődik. A mérések alkalmával a vizsgálni kívánt molekulával elektromágneses sugárzás formájában energiát közlünk. A kapott energia egy részét a gerjesztett állapotú elektronok nem-sugárzásos átmenetekkel leadják és ennek hatására az első gerjesztett állapot legalsó vibrációs energiaszintjére jutnak. Ezután fluoreszcens foton kibocsátásának kíséretében az alapállapotba relaxálódnak. A gerjesztő és a fluoreszcens fény között létrejövő Stokes-féle hullámhossz eltolódás mérés technikai szempontból előnyt jelent, mivel egy monokromátor segítségével könnyen elkülöníthetőek. A minta fluoreszcenciájának változásaiból következtethetünk az azt ért hatások jellegére.



5. ábra Fluoreszcencia folyamatának Jablonski diagramja <sup>73</sup>

### 3.1.2. Abszorpció mérése

Az abszorpció mérése során azt detektáljuk, hogy a vizsgált molekula mennyit nyelt el a gerjesztéshez használt fényből. Mivel a mintán áthaladó gerjesztő fény intenzitását kívánjuk detektálni, ezért lineáris mérési elrendezést használunk, ami azt jelenti, hogy a detektorunk a fényforrással szemben helyezkedik el. A transzmittancia megadja, hogy a beeső fény mekkora arányban haladt át a mintán:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Itt  $I_0$  a kezdeti fény intenzitás,  $I$  pedig a mintán való áthaladás után mért intenzitás.

A gyakorlatban valójában az abszorbancia fogalma használatos, melynek megértéséhez először érdemes megtekintenünk a Lambert-Beer törvényt:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cx} \quad (2)$$

Az egyenlet megmutatja, hogy a küvettában található mintán áthaladó fény intenzitása exponenciális csökkenést mutat, ahogy egyre mélyebbre hatol a mintában.  $I_0$  és  $I$  jelentése megegyezik a transzmittanciánál leírtakkal,  $x$  a mintában megtett úthossz,  $\varepsilon(\lambda)$  az úgynevezett extinkciós koefficiens, mely jelzi, hogy az adott anyag adott hullámhosszon egységnyi  $x$  úthossz és egységnyi  $c$  koncentráció esetén mekkora abszorpcióval rendelkezik, végezetül  $c$  a minta koncentrációja.

Az abszorpciót a következő egyenlet fejezi ki:

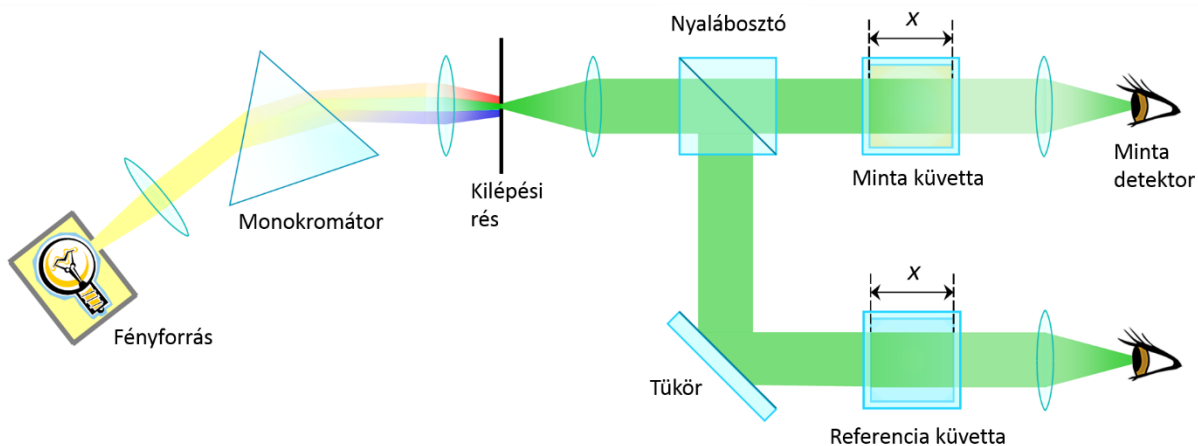
$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Ahol a tízes alapú logaritmus kiemelt jelentőségű, hiszen ha az egyenletet a Lambert-Beer törvénnyel kombináljuk és követjük a matematika szabályait, akkor az alábbi összefüggéshez jutunk:

$$A = \varepsilon(\lambda)cx \quad (4)$$

A fenti egyenlet azért hasznos, mivel megmutatja, hogy az abszorpció egyenesen arányos a minta koncentrációjával. Ennek köszönhetően a mérési elrendezés alkalmas koncentráció meghatározásra.

Mivel pufferben (fix pH-jú oldószer) oldott molekulákat vizsgálunk, a puffer abszorpciós jellemzőinek kiszűrése végett a mérések alapvonal felvételével kezdődnek. Ez azt jelenti, hogy először a tiszta puffer abszorpciós karakterisztikáját rögzítjük, majd a további mérések során az így kapott értékeket levonjuk a mintánkból. Technológiai szempontból egy fokkal bonyolultabb a kétutas abszorpciós fotométer, mely rendelkezik egy puffert tartalmazó referencia ággal is, ahol a mintával párhuzamosan folyamatosan vizsgáljuk a puffer abszorpcióját is.



**6. ábra** Kétutas abszorpciós fotométer sematikus felépítése <sup>74</sup>

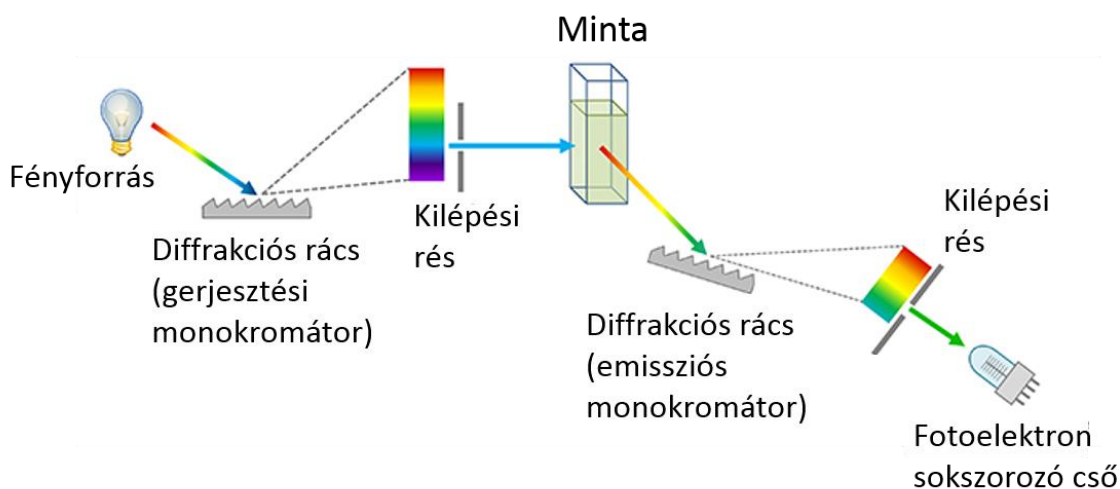
Az abszorpciós mérések jelentősége túlmutat a koncentráció meghatározásán. A vizsgált molekulák egyes alkotórészei más-más hullámhosszakon rendelkeznek abszorpciós maximummal. Éppen ezért a mérések során általában spektrumot veszünk fel. Ekkor az abszorpciót a hullámhossz függvényében vizsgáljuk, miközben folyamatosan változtatjuk a gerjesztő fény hullámhosszát. A mintában végbemenő változások során az abszorpciós csúcsok elmozdulhatnak, csökkenhetnek-növekedhetnek, ezek alapján pedig következtethetünk a változások természetére.

Fontos megemlíteni, hogy az abszorpció mértéke függhet a pH-tól, ezért érdemes különböző pH-jú pufferekben található fehérje mintákkal megismételni a méréseket.

Az abszorpciós spektroszkópai módszer egyik előnye, hogy segítségével korrigálható az inner filter effektus okozta torzulás. Ez utóbbi jelentőségét az általa befolyásolt kioltási vizsgálatoknál részletezem.

### 3.1.3. Steady state fluoreszcencia emissziós spektroszkópia

A steady state fluoreszcencia emissziós spektroszkópia során L alakú elrendezést használunk, amikor a minta fluoreszcenciáját érzékelő detektor a beeső gerjesztő fénysugár útjára merőlegesen helyezkedik el, így minimalizálható a gerjesztéshez használt fény detektálása.



7. ábra Spektrofluorométer sematikus felépítése <sup>75</sup>

A steady state szó arra utal, hogy csak a rendszer pillanatnyi fluoreszcenciáját vesszük fel, de nem vizsgáljuk a fluoreszcencia változását az idő függvényében. A mérésekhez általában olyan lámpát használunk, melynek fénye széles spektrumot fed le (pl.: Xenon), amiből monokromátor segítségével választjuk ki a kívánt hullámhosszat. Amikor a gerjesztés hullámhosszát változtatjuk, miközben a megfigyelt emisszió hullámhossza fix, akkor gerjesztési spektrumot, amennyiben az emissziós hullámhosszat variáljuk, de a gerjesztési hullámhosszat nem módosítjuk, akkor emissziós spektrumot veszünk fel. Számos technika épül steady state emissziós mérésekre, melyekre később kitérek.

### 3.1.4. Time correlated single photon counting (TCSPC, időkorrelált egy-foton számlálás)

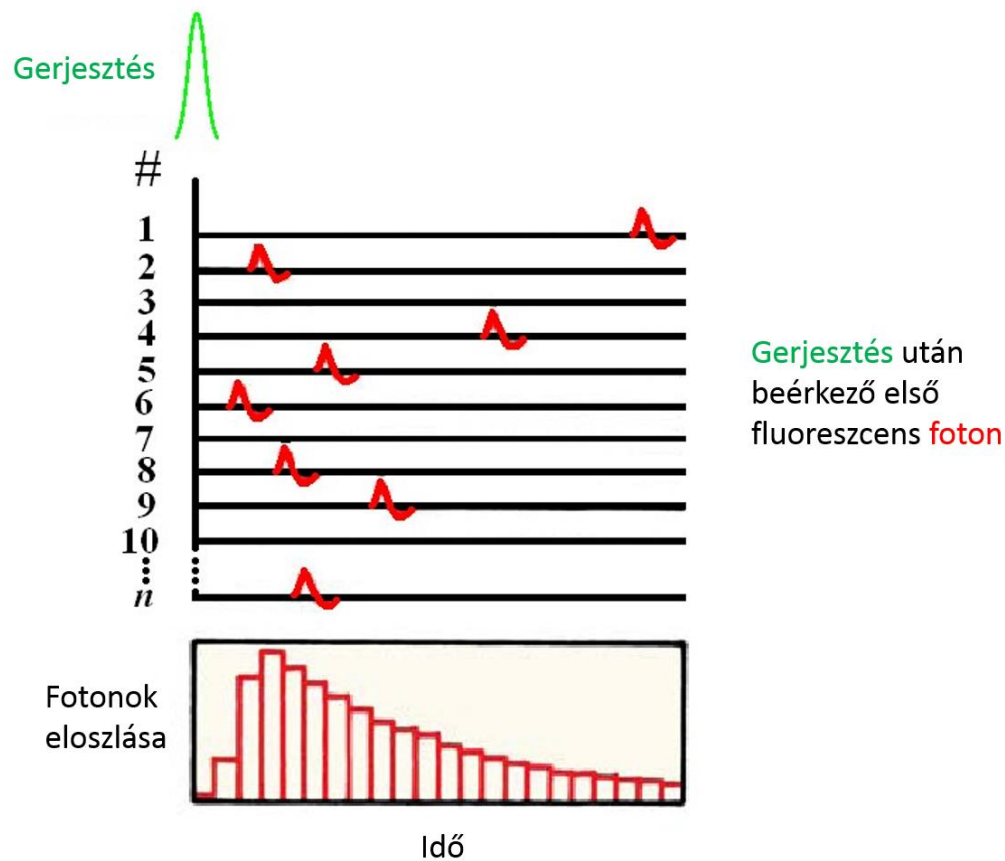
A fluoreszcencia emisszió mérését végezhetjük az idő függvényében is. Ennek segítségével detektálhatjuk, hogy a gerjesztett állapotú minta milyen gyorsan relaxálódik fluoreszcens foton kibocsátása révén. A nanoszekundumos időintervallumban zajló folyamat rögzítésére több eljárás áll a rendelkezésünkre, úgymint a Gregorio Weber által kidolgozott fázisfluorimetriás

technika <sup>76</sup>, a strobószkopos módszer és az időkorrelált egy-foton számlálásos metódus. Munkánk során az időkorrelált egy-foton számlálásra (TCSPC) épülő technológiát alkalmaztuk, ami a fluoreszcencia lecsengés sztochasztikus jellegét használja ki. Ennek könnyebb megértését elősegítheti, ha a közismertebb radioaktivitás jelenségével állítjuk párhuzamba. Egy radioaktív minta vizsgálata során nem lehet előre megjósolni, hogy egy adott mag pontosan mikor fog elbomlani, azt azonban nagyon pontos közelítéssel megadhatjuk, hogy egy bizonyos idő elteltével mennyi mag fog átalakulni. Hasonló a helyzet fluoreszcenciával is: a gerjesztett minta esetében sem tudjuk előre megmondani, hogy a benne levő molekulák egyesével pontosan mikor relaxálódnak, ellenben azt elég pontosan megbecsülhetjük, hogy hányad részük fog relaxálni egy adott idő alatt. Erre bevezetett fogalom az úgynevezett fluoreszcencia élettartam, mely megmutatja, hogy a kezdeti fluoreszcencia intenzitás mikor csökken 1/e-ed részére, tekintve, hogy exponenciális összefüggés áll fent. Ezt a következő összefüggés írja le:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (5)$$

Ahol  $I(t)$  az adott időpontban mért intenzitás,  $I_0$  a null-időpontban detektált kezdeti intenzitás,  $\tau$  pedig az említett fluoreszcencia élettartam.

A fluoreszcencia élettartam mérése az időkorrelált egy-foton számlálás segítségével a következőképpen történik <sup>77</sup>: a gerjesztő impulzslámpa elindítja az idő mérését, amelyet a detektorra érkező első foton leállít. A folyamatot számos alkalommal megismételve egy hisztogramot kapunk. A csoportosítás úgynevezett csatornáknak történik, melyek különböző időbeli szélességgel rendelkeznek, amit csatornaszélességnek nevezünk. Minél kisebb a csatornaszélesség, annál jobb az idő-felbontásunk. Nyilvánvalóan rögtön a gerjesztést követően nagyobb valószínűséggel fognak fotonok eljutni detektorra, mivel a molekulák többsége még gerjesztett állapotban van. Azonban az idő előrehaladtával a fotonok beérkezésének valószínűsége a gerjesztett molekulák számának csökkenésével arányosan csökken. A csatornák elemszámát ábrázolva időbeli lecsengést kapunk, melyre exponenciális görbét illesztve meghatározható a fluoreszcencia élettartam.



8. ábra TCSPC adatgyűjtési sémája <sup>78</sup>

A spektroszkópai rendszer az idő mérését egy úgynevezett TAC (TAC=time amplitude converter) segítségével hajtja végre <sup>77</sup>. Ennek során a gerjesztés, start-jelként elindít egy feszültség rámpát, melyet a beérkező foton mintegy stop jelként állít meg. A számítógép a rámpa magasságából visszaszámítja a gerjesztés után eltelt időt. A valóságban ez annyival bonyolultabb, hogy általában megcserélik az itt említett start és stop jelet. Ennek számítási teher csökkentő jelentősége van, mivel így nem minden egyes gerjesztés indítja el a rámpát, hanem csak a jelenségnek érzékelt fotonok.

További fontos technikai részlet, hogy a gerjesztésünk lehetőség szerint minél inkább pillanatszerű legyen. Épp ezért kis félértékszélességgel rendelkező LED-eket, vagy ennél is rövidebb impulzushosszal rendelkező impulzuslézereket szokás használni. Természetesen ilyen eszközök mellett sem lesz tökéletesen pillanatszerű (Dirac-deltához hasonló) a gerjesztés. Ez azt

eredményezi, hogy az időben „elkenődött” gerjesztési csúcs minden egyes pontja egy-egy pillanatszerű gerjesztésnek felel meg. Ennek alapján valójában mind egy-egy fluoreszcens lecsengési görbét generálnak, így a mérés során igazából ezek összegét detektáljuk <sup>76</sup>. Amennyiben szórás detektálásával felvesszük a gerjesztő fényünk időbeli mintázatát, ami az instrument response function (IRF, impulzusválasz függvény) vagy a prompt nevet viseli, akkor megfelelő illesztő programok segítségével egy ún. dekonvolúciós illesztés során kiszámíthatjuk azt a lecsengést, melyet a pillanatszerű gerjesztés esetén kaptunk volna.

Összességében tehát elmondható, hogy a módszer időbeli felbontását két tényező limitálja: a gerjesztő impulzus időbeli kiszélesedése, valamint a detektor által biztosított legkisebb csatornaszélesség.

Érdeemes megjegyezni, hogy egyes minták egyszerre több, párhuzamosan jelenlevő élettartammal rendelkezhetnek. Ezt a görbe illesztésnél figyelembe kell venni, amennyiben az nem csak matematikai, de fizikai szempontból is indokolt, például amikor ténylegesen többféle populációban van jelen a vizsgált fluorofór.

Így az illesztett görbét az exponenciálisan lecsengő függvények lineáris kombinációja adja meg <sup>7</sup>:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (6)$$

Ahol  $\tau_i$  az élettartamokat jelöli, az  $\alpha_i$  értékek pedig az úgynevezett preexponenciális faktorok, melyek lényegében megadják, hogy az egyes élettartamok mennyire „hangsúlyosak”.

Ezekből az élettartamokból a következőképpen számíthatunk átlag élettartamot <sup>76</sup>:

$$\bar{\tau} = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2 + \dots + \alpha_i \tau_i^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2 + \dots + \alpha_i \tau_i} \quad (7)$$

Ha nem a preexponenciálisakat, hanem az egyes járulékok arányát ( $f$ ) ismerjük, akkor az átlagélettartam <sup>76</sup>:

$$\bar{\tau} = f_1 \tau_1 + f_2 \tau_2 + \dots + f_i \tau_i \quad (8)$$



Az élettartam mérések segítségével a fluoreszcens folyamatok gyorsaságáról kapunk információt, melyet befolyásolhatnak a fluorofór közelében levő egyéb molekulák, így azok viszonyáról is információt nyerhetünk.

### 3.1.5. Anizotrópia mérése

A fluoreszcencia anizotrópia mérések során síkban polarizált gerjesztő fényt használunk annak érdekében, hogy információt szerezzünk a molekulák rendezettségéről és így forgási tulajdonságaikról. Minél erőteljesebb a mozgás annál gyorsabban megszűnik a rendezettség, természetesen a Brown mozgás mellett a depolarizáció történhet más orientációjú molekulának történő energia transzferrel is <sup>7</sup>.

A fény elektromágneses transzverzális hullám, mely azt jelenti, hogy a terjedési irányára merőlegesen rezgő elektromos teret is tartalmaz. Amennyiben ennek rezgése egy síkban történik, lineárisan polarizált fényről beszélünk. Ha ilyen fényel gerjesztjük a molekulákat, akkor az általuk kibocsátott fluoreszcencia is polarizált lesz. Anizotrópia mérések esetén épp ez történik. Ehhez polárszűrőket helyezünk a fény útba, mind a gerjesztés, mind a detektálás oldalára. A szűrők állíthatóak aszerint, hogy csak horizontális vagy csak vertikális síkban polarizált fényt engedjenek át. A gerjesztés esetén a szűrőt a fény polarizálására helyezzük be, a detektálás esetén pedig annak érdekében, hogy a már polarizált fényből csak a bizonyos irányban állókat detektáljuk, azaz ekkor a szűrő analizátorként működik. A mérés célja a lehető legpontosabban detektálni a vertikális gerjesztést követően vertikálisan polarizált jelet adó és egy helyben maradó molekulák mennyiségét, illetve azon molekulák számát, melyek az elmozdulásuk miatt már inkább horizontális jelet bocsájtanak ki. A polarizátorok állásának leírásakor a V betű a vertikális állást jelöli, a H betű pedig a horizontálisat. Az első betű mindig a gerjesztési oldalt jelöli, a második pedig az emissziós oldalt. Egy másik lehetséges jelölési mód során egymáshoz viszonyított helyzetük alapján párhuzamos és merőleges pozíciókat különböztetünk meg. Az első jelölési rendszert használva az anizotrópia a következőképpen adható meg <sup>76</sup>:

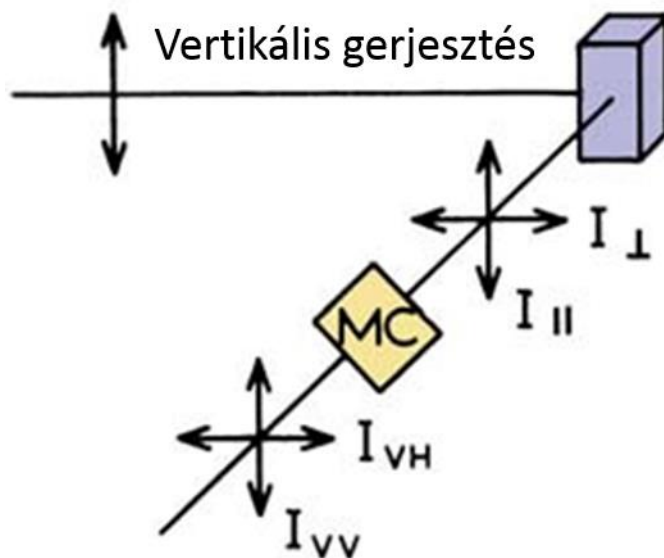
$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}} \quad (9)$$

Ahol  $r$  az anizotrópia,  $I_{VV}$  a mért emissziós intenzitás (vertikálisan polarizált gerjesztés esetén, vertikális analizátorral),  $I_{VH}$  a mért emisszió intenzitás (vertikálisan polarizált gerjesztés esetén, horizontális analizátorral).

Ugyanez a másik terminológiával felírva:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (10)$$

Ahol  $I_{\parallel}$  a gerjesztési polarizátor és az emissziós analizátor párhuzamos állását, míg  $I_{\perp}$  az ortogonális elhelyezkedést jelöli.



9. ábra Anizotrópia mérés sémája <sup>76</sup>

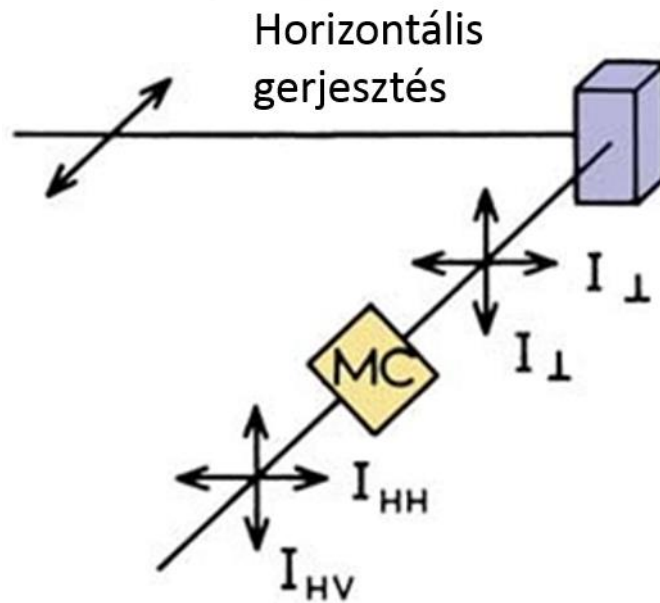
Az anizotrópia értéke lényegében a két polarizációs véglet közötti különbség mértékét adja meg, amit a teljes emisszióhoz viszonyít. Egyszerűsített modell esetében a molekulák abszorpciós és emissziós dipóljai megegyező irányban állnak, valamint a molekulák mozgása nem korlátozott. Ekkor elmondható, hogy minél közelebb kerül a két polarizációs véglet közötti különbség a nullához, annál rendezetlenebbül helyezkednek el a kezdetben fotoszelektált molekulák, hiszen a teljes rendezetlenség esetén közel ugyanolyan arányban sugároznak mindkét polarizációs irányba <sup>76</sup>.

Az egyenlet nevezőjének megértéséhez érdemes szemügyre venni a mérési elrendezést. A 9. ábrán látható, hogy a kezdeti vertikális gerjesztés szemszögéből kétféle esetben is beszélhetünk merőleges állásról. Az irányok közül egyik sem megkülönböztetett, közöttük csupán mérés technikai szempontból van eltérés, aszerint, hogy melyikre állítjuk az analizátort, ezért szerepel a nevezőben a kettes szorzó merőleges elrendezés esetén.

Az anizotrópia mérések során érdemes még úgynevezett G-faktor mérést is végezni. Ennek lényege, hogy a detektor csak ideális esetben érzékeny egyenlő mértékben mindkét polarizációs irányra, emiatt a valóságban keletkező különbséget korrigálni kell. A detektor érzékenység polarizáció függése könnyen kimérhető, ha a horizontális gerjesztési polarizátort használunk, mivel ekkor az analizátor mindkét állapota merőleges a gerjesztési polarizátorra, tehát ideális esetben ugyanazt a beütést kellene lássuk mindkét analizátor esetén. Ezek arányát felírva a következő G-faktort kapjuk <sup>76</sup>:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (11)$$

Ahol  $I_{HV}$  a mért emissziós intenzitás (horizontálisan polarizált gerjesztés esetén, vertikális analizátorral),  $I_{HH}$  a mért emisszió intenzitás (horizontálisan polarizált gerjesztés esetén, horizontális analizátorral).



10. ábra G-faktor mérés sémája <sup>76</sup>

Ezzel az aránnyal korrigálva az anizotrópia esetén használt kifejezést a következő összefüggést kapjuk <sup>76</sup>:

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad (12)$$

Szabad mozgás esetén az anizotrópia nullára csökkenne, míg korlátozott forgás esetén egy időfüggetlen értékhez tart, melyet maradék anizotrópiának nevezünk, aminek jele  $r_\infty$ . Az anizotrópia időbeli lecsengésének vizsgálata közvetlen információval szolgál a részecskék forgási dinamikájáról, mely azok méretétől és alakjától is függ a mikrokörnyezet fluiditása mellett <sup>7</sup>. Az anizotrópiás technikát érdemes kombinálnunk a TCSPC technikával. Ekkor polarizátorok alkalmazásával élettartam méréseken keresztül közvetve az anizotrópia időbeli lecsengését kaphatjuk meg.

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} \quad (13)$$

Ahol  $r(t)$  az adott időpontban mért anizotrópia,  $r_0$  a null-időpontban mért kezdeti anizotrópia,  $\theta$  pedig az élettartamhoz hasonló kifejezés, úgynevezett rotációs korrelációs idő, mely megadja, hogy a kezdeti anizotrópia mennyi idő alatt csökken 1/e részére.

Az élettartamhoz hasonlóan amennyiben több anizotrópia lecsengés együttese van jelen például a a fluorofór és az általa kötött molekula mozgása miatt, akkor az együttes anizotrópiát, vagyis az  $r(t)$  értékét exponenciálisan lecsengő függvények lineáris kombinációja adja meg:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \exp\left(-\frac{t}{\theta_i}\right) \quad (14)$$

Ahol  $\theta_i$  a rotációs korrelációs időket jelöli. Természetesen a  $\beta_i$  preexponenciális faktorok összege a kezdeti  $r_0$  emissziós anizotrópiát adja vissza <sup>7</sup>. Rotációs diffúzió jelenléte nélkül a  $\beta_i$  értékek az anizotrópia limitek. Elméletben a gyors rotációs korrelációs idők ( $\sim 1$  ns) a fluorofór gyors mozgására utalnak, míg hosszabb rotációs korrelációs idők (10 ns vagy több) azt jelzik, hogy a fluorofór vagy az egész fehérje komplex lassabban forog. Azt, hogy a hosszabb rotációs korrelációs idő az egész fehérje és nem az önálló fluorofór mozgását jellemzi alátámaszthatja Visser empirikus képlete <sup>79</sup>, mellyel a fehérje rotációs korrelációs ideje becsülhető:

$$\phi = 3.84 \cdot 10^{-4} M_r \quad (15)$$

ahol  $\phi$  a rotációs korrelációs időt jelöli ns-ban, valamint  $M_r$  a fehérje molekula súlya Da-ban kifejezve.

A  $\theta$  és  $\beta$  értékek ismeretében az átlagos rotációs korrelációs idő az átlag élettartam számolás analógiájára a következőképpen kalkulálható <sup>76</sup>:

$$\bar{\theta} = \frac{\beta_1 \theta_1^2 + \beta_2 \theta_2^2 + \dots + \beta_i \theta_i^2}{\beta_1 \theta_1 + \beta_2 \theta_2 + \dots + \beta_i \theta_i} \quad (16)$$

Anizotrópia mérések segítségével információt szerezhetünk a molekulák forgási tulajdonságairól, hiszen minél rövidebb a rotációs korrelációs idő értéke, annál gyorsabban mozog az adott molekula. A mozgást számos környezeti tényező befolyásolhatja, úgymint egyéb molekulák közelsége vagy az, hogy mennyire van szabadon az adott molekula, így ezekről is információt nyerhetünk.

### 3.1.6. FRET (fluoreszcencia vagy Förster-féle rezonancia energia transzfer)

FRET során két relatíve közeli molekula közti energia átadás történik. Az energiát átadó molekulát donornak, az azt felvevőt pedig akceptornak nevezzük. Az energia átadást a donor emissziós

spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma közötti átfedés teszi lehetővé. Fontos megjegyezni azonban, hogy az energia átadás nem-sugárzási átmenettel történik, azaz a donor nem emittál fotont. A jelenség mégis köthető az emisszióhoz, ugyanis az akceptor jelenlétében a donor a gerjesztést követően kisebb emissziót mutat, mint az akceptor hiányában. Ennek az oka, hogy a gerjesztéskor nyert energiáját részben az akceptornak adja tovább, amelynek emissziója ennek hatására megnő. FRET során az energia transzfer hatásfoka függ a donor-akceptor távolságtól. Ez a korreláció teszi alkalmassá a távolság mérésére. A FRET hatásfokát leíró képlet a következő <sup>80,81</sup>:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (17)$$

Másképpen kifejezve <sup>7</sup>:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (18)$$

Ahol E a FRET hatásfoka,  $R_0$  az úgynevezett Förster sugár, mely a donor-akceptor távolsága ötven százalékos hatásfok esetén, R pedig az aktuálisan vizsgált donor akceptor távolság, melyhez az E hatásfok rendelhető. A FRET erős távolság függése lehetővé teszi 10-100 Å-ös molekula-távolságok mérését. Éppen ezért a módszer a „spektroszkópai vonalzó” nevet kapta <sup>82</sup>.

Általában az egyenlet R-t kifejező alakját használjuk, hiszen ennek az értékét keressük:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1 - E}{E}} \quad (19)$$

Ahol  $R_0$  az alábbi egyenlet segítségével határozható meg <sup>7</sup>:

$$R_0 = 9.78 \cdot 10^3 [J(\lambda) \kappa^2 n^{-4} \phi_D]^{1/6} \text{ \AA} \quad (20)$$

Ahol  $J(\lambda)$  a donor emissziójának és az akceptor abszorpciójának spektrális átfedéséhez tartozó integrál  $\lambda$  hullámhosszon, n a törés mutató, amely a mérések többségében 1.4 <sup>76</sup>,  $\phi_D$  pedig a donor kvantum hatásfoka <sup>83</sup>. A  $\kappa^2$  az orientációs faktor, melyet a következő egyenlettel lehet meghatározni <sup>7</sup>:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (21)$$

Ahol  $\theta_T$  a donor és az akceptor tranzíciós dipól momentumai által bezárt szög. A  $\theta_D$  és a  $\theta_A$  pedig a dipól momentumok és a szeparációs vektor közötti szögek. Véletlenszerű elrendeződés esetén  $\kappa^2 = \frac{2}{3} = 0.66$ , merőleges elrendeződés esetén pedig  $\kappa^2 = 0$ .

Az úgynevezett akceptor érzékenyítés módszerét <sup>76,84</sup> használva a FRET határfok a következőképpen számítható steady state emissziós mérés elvégzése után:

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] \quad (22)$$

Ahol  $\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})$  és  $\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})$  az akceptor és a donor extinkciós koefficiensei a donor gerjesztési hullámhosszán ( $\lambda_D^{gerj}$ ). A további  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  és  $I_A(\lambda_A^{em})$  pedig az akceptor emissziós intenzitások a donor jelenlétében, valamint anélkül az akceptor emissziós hullámhosszán nézve ( $\lambda_A^{em}$ ), amennyiben a donor gerjesztő hullámhosszán gerjesztünk <sup>7</sup>.

Adott esetben a képletben szereplő paraméterek meghatározásához közelítő számításokat kell végeznünk.

Ha például a kívánt hullámhosszon az extinkciós koefficiens nem ismert, akkor egy ismert koefficienshez tartozó hullámhosszon, valamint a kérdéses hullámhosszon megmérve az abszorpciókat a kérdéses koefficiens a következőképpen becsülhető <sup>7</sup>:

$$\varepsilon_{kérdéses} = \varepsilon_{ismert} \cdot \left( \frac{OD(kérdéseshez\ tartozó\ nm - en)}{OD(ismerthez\ tartozó\ nm - en)} \right) \quad (23)$$

Problémát jelenthet az  $I_A(\lambda_A^{em})$  értékének meghatározása. Ha a donor nem eltávolítható egy vagy több mutáció segítségével, vagy annak alkalmazása nem megfelelő változást idézne elő, akkor az akceptor *önálló* intenzitása nem állapítható meg a donor gerjesztési frekvenciáján. Ekkor megoldást jelenthet, ha rendelkezésre áll analóg donort tartalmazó minta. Az analóg előnye, hogy más hullámhosszon gerjeszhető, mint a vad típusú fehérjében megtalálható donor. Ekkor a méréseink középpontjába az analóg minta kerül, tehát  $I_A(\lambda_A^{em})$  értéke az analóg mintára vonatkozóan kerül meghatározásra. Mindez az alábbi lépésekkel valósítható meg:

Kanonikus triptofánt tartalmazó mintára meghatározzuk a következő arányt:

$$k = \frac{I_{\lambda_{gerj1}}(\lambda_A^{em})}{I_{\lambda_{gerj2}}(\lambda_A^{em})} \quad (24)$$

Itt a gerjesztési hullámhosszak a következőképpen kerülnek kiválasztásra:

$\lambda_{gerj1}$ : olyan hullámhossz, mely mind az analóg, mind a kanonikus triptofánt tartalmazó mintában csak az akceptort gerjeszti, a donort nem.

$\lambda_{gerj2}$ : olyan hullámhossz, mely a kanonikus triptofánt tartalmazó mintában csak az akceptort gerjeszti, a donort nem, míg az analóg minta tekintetében pontosan megegyezik a donor gerjesztési hullámhosszával.

A  $k$  arány kanonikus triptofánt tartalmazó mintára való meghatározása után az érdeklődés középpontjában álló analóg mintára felírható a következő egyenlet, melynek kapcsán érdemes megjegyezni, hogy a  $k$ -t leszámítva a képletben szereplő kifejezések már mind az analóg mintára vonatkoznak:

$$I_A(\lambda_A^{em}) = I_{A \lambda_{gerj2}}(\lambda_A^{em}) = \frac{I_{\lambda_{gerj1}}(\lambda_A^{em})}{k} \quad (25)$$

Azaz az analóg mintára keresett  $I_A(\lambda_A^{em})$  érték (mely az akceptor intenzitás a donor jelenléte nélkül, amennyiben a donort gerjesztő  $\lambda_{gerj2}$  hullámhosszal gerjesztünk) meghatározható a  $k$  arányossági érték felhasználásával, abban az esetben, ha megmérjük az akceptor intenzitást olyan hullámhosszon ( $\lambda_{gerj1}$ ) gerjesztve, amelyen a donor nem gerjesztődik.

A FRET mérést élettartam méréssel is elvégezhetjük. Ez esetben a FRET hatásfok az alábbi képlet segítségével határozható meg <sup>76</sup>:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (26)$$

Ahol  $\tau_{DA}$  a donor fluoreszcencia élettartama az akceptor jelenlétében,  $\tau_D$  pedig a donor önálló fluoreszcencia élettartama.

### 3.1.7. Kioltás mérése (quenching)

Ennek a mérési eljárásnak a lényege, hogy olyan molekulákat, például akrilamidot adunk az általunk vizsgált rendszerhez, melyek képesek csökkenteni a mintánk fluoreszcenciáját. A kioltás általában kétféleképpen valósulhat meg. Az egyik lehetőség, hogy a kioltó adalék a vizsgált



komponensekkel olyan komplexet formál, ami úgynevezett statikus módon akadályozza meg az utóbbiak fluoreszcens foton emisszióját. A másik esetben a fluoreszcenciára képes molekula a gerjesztett állapot és a fluoreszcens relaxáció közötti szűk időintervallumon belül ütközik egy kioltó molekulával, aminek következtében a gerjesztett állapotú molekula fénykibocsátás nélkül tér vissza az alapállapotba. Utóbbi típust dinamikus kioltásnak nevezzük. Amint az látható, a kioltás létrejöttéhez elengedhetetlen, hogy a kioltó molekula közel tudjon férkőzni a kioltandó molekulához. Ennek jelentősége, hogy információval szolgál a számunkra a vizsgált molekulák hozzáférhetőségéről. A kioltás folyamatát számszerűsíti a Stern-Volmer egyenlet <sup>76</sup>:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad (27)$$

Itt  $F_0$  a vizsgált minta fluoreszcenciája a kioltó molekulák jelenléte nélkül,  $F$  a minta fluoreszcenciája, amennyiben  $[Q]$  koncentrációjú kioltó anyag van jelen,  $K$  pedig a Stern-Volmer konstans, mely leírja, hogy mennyire erős az adott kioltó molekula hatása a kioltandóra.

Értelemszerűen a függvény y tengelymetszete 1, hiszen, amennyiben  $[Q] = 0$ , akkor  $\frac{F_0}{F} = 1$  (azaz  $F_0 = F$ )

Minél nagyobb a kioltó hatás, annál kisebb  $\frac{F_0}{F}$  nevezője és így annál nagyobb lesz a hányados számértéke.

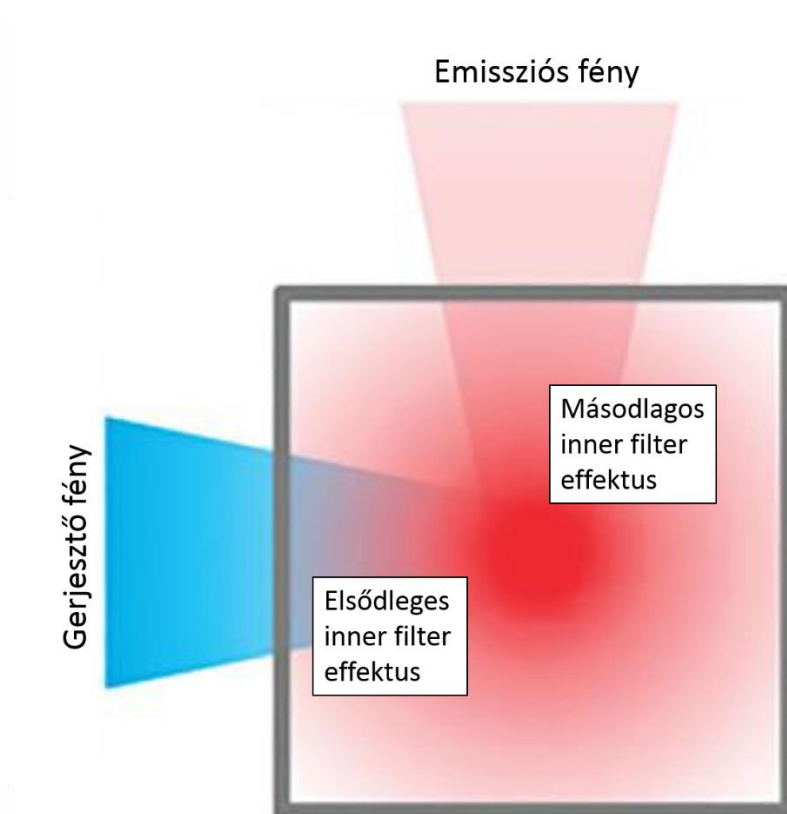
A mérések során általában fokozatosan növeljük a kioltó molekula koncentrációját, és annak függvényében vesszük fel az emisszió változását.

Kioltási mérések során érdemes a steady state emissziós kísérletek során kapott fluoreszcencia intenzitásokat bizonyos korrekcióknak alávetni. Az első ilyen korrekcióra azért van szükség, mivel a kioltó anyag hozzáadásával tulajdonképpen hígítjuk a mintánkat, ami az emisszió csökkenésén keresztül a kioltási eredmények helytelen értelmezéséhez vezethet. A korrekcióhoz a következő arányszámmal kell megszorozni a mért intenzitás értékeket:

$$\frac{V_{új}}{V_{eredeti}} \quad (28)$$

Ahol  $V_{új}$  a minta térfogata a kioltóanyag hozzáadása után,  $V_{eredeti}$  pedig a hozzáadás előtti térfogat. A hányadosuk megadja, hogy hányszor lett hígabb a minta, azaz hányszor kisebb a fluoreszcenciája a hígításnak köszönhetően, melyel visszaszorozva elkerülhető a hígítás kioltásként való értelmezése.

A másik tényező, amivel korrekciós szempontból érdemes számolnunk az úgynevezett belső szűrő hatás (inner filter effect) <sup>76</sup>. Lényegében véve a minta önelnyeléséről van szó, mely csökkenti mind a célzott helyen történő gerjesztést, mind a detektálható fluoreszcens emissziót. Tegyük fel, hogy például a korábban taglalt merőleges elrendezés során a kivetta térfogati középpontjában levő mintát szeretnénk gerjeszteni. Ebben az esetben a centrumba érkezés előtt a gerjesztő nyaláb át kell haladjon bizonyos mennyiségű mintán, mely eleve csökkenti az  $I_0$  intenzitást, aminek következtében kevesebb molekula fog gerjesztett állapotba kerülni a célterületen (ezt nevezzük elsődleges inner filter hatásnak), majd a gerjesztés után létrejövő fluoreszcens sugárzás is keresztül kell hatoljon adott mennyiségű mintán, mielőtt elérheti a detektorunkat, ami szintén intenzitáscsökkentő hatású (ezt nevezzük másodlagos inner-filter hatásnak).



**11. ábra** Inner filter effektus <sup>85</sup>

Ezek egyenlettel szemléltetve:

$$F_{korrigált} \cdot \frac{1}{10^{0.5 \cdot OD_{gerj}}} \cdot \frac{1}{10^{0.5 \cdot OD_{emi}}} = F_{megfigyelt} \quad (29)$$

Itt  $F_{korrigált}$  az inner filter effektus nélküli emissziós intenzitás lenne. Ez az elsődleges inner filter effektus miatt  $10^{0.5 \cdot OD_{gerj}}$ -ed részére csökken. Lásd a Lambert-Beer-törvényt leíró képletet az abszorpciót leíró bekezdésből:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cx} = I_0 10^{-A} \quad (30)$$

Az abszorpciós módszer segítségével meghatározhatjuk az  $OD_{gerj}$ -t, ami az emissziós méréskor alkalmazott gerjesztési hullámhossz esetében mért abszorpció a teljes kuvetta úthosszával számolva. A  $10^{0.5 \cdot OD_{gerj}}$  kifejezésben a 0.5-ös tag azért szerepel, mivel merőleges elrendezésben csak a kuvetta úthosszának felét kell néznünk az abszorpciós méréssel ellentétben.

$F_{korrigált}$  értéke tovább csökken még  $10^{0.5 \cdot OD_{emi}}$ -ad részére a másodlagos inner filter hatás miatt. Itt  $OD_{emi}$  az abszorpció az emissziós mérés emissziós hullámhosszán. Az előbbihez hasonlóan a 0.5-ös szorzó itt is szükséges a kifejezésben.

Végül ha az egyenletet átrendezzük, olyan összefüggést kapunk, amely alkalmas az inner filter effektus korrigálására <sup>76</sup>:

$$F_{korrigált} = F_{megfigyelt} \cdot 10^{\left(\frac{OD_{gerj} + OD_{emi}}{2}\right)} \quad (31)$$

Tehát a mért intenzitást a következő komponenssel kell megszorozni:

$$10^{\left(\frac{OD_{gerj} + OD_{emi}}{2}\right)} \quad (32)$$

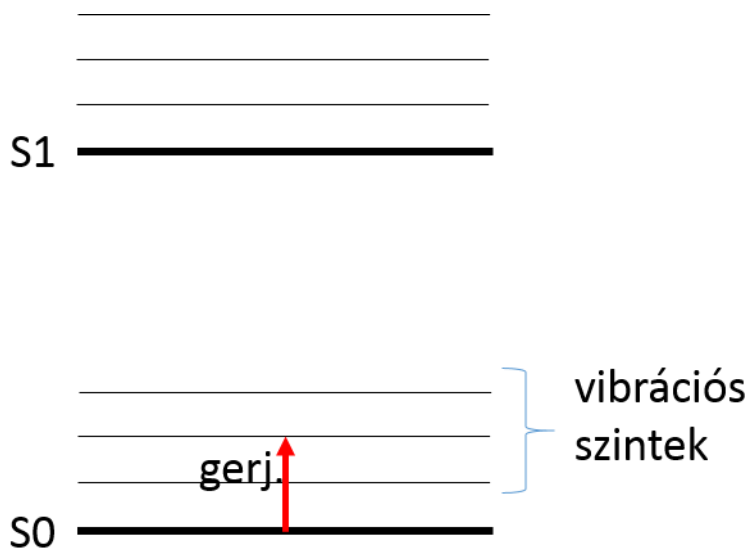
Ehhez abszorpciós mérés segítségével meg kell határozni a minta elnyelését mind a gerjesztési, mind az emissziós hullámhosszakon.

Végezetül a fenti két korrekciót összekapcsolva a következő kifejezéssel számolható a kioltó mérések során a kioltás utáni intenzitás:

$$F_{korrigált} = F_{megfigyelt} \cdot \frac{V_{új}}{V_{eredeti}} \cdot 10^{\left(\frac{OD_{gerj} + OD_{emi}}{2}\right)} \quad (33)$$

### 3.1.8. Tranziens infravörös spektroszkópia (transient infrared spectroscopy, TRIR)

Infravörös gerjesztést általában akkor alkalmazunk, ha a kötésekhöz kapcsolódó vibrációs átmeneteket szeretnénk gerjeszteni. Az ilyen átmenetek kisebb energiát igényelnek, mint mondjuk egy fluoreszcens átmenet, ezért használunk nagyobb hullámhosszú infravörös fényt, azaz kisebb energiájú gerjesztést.

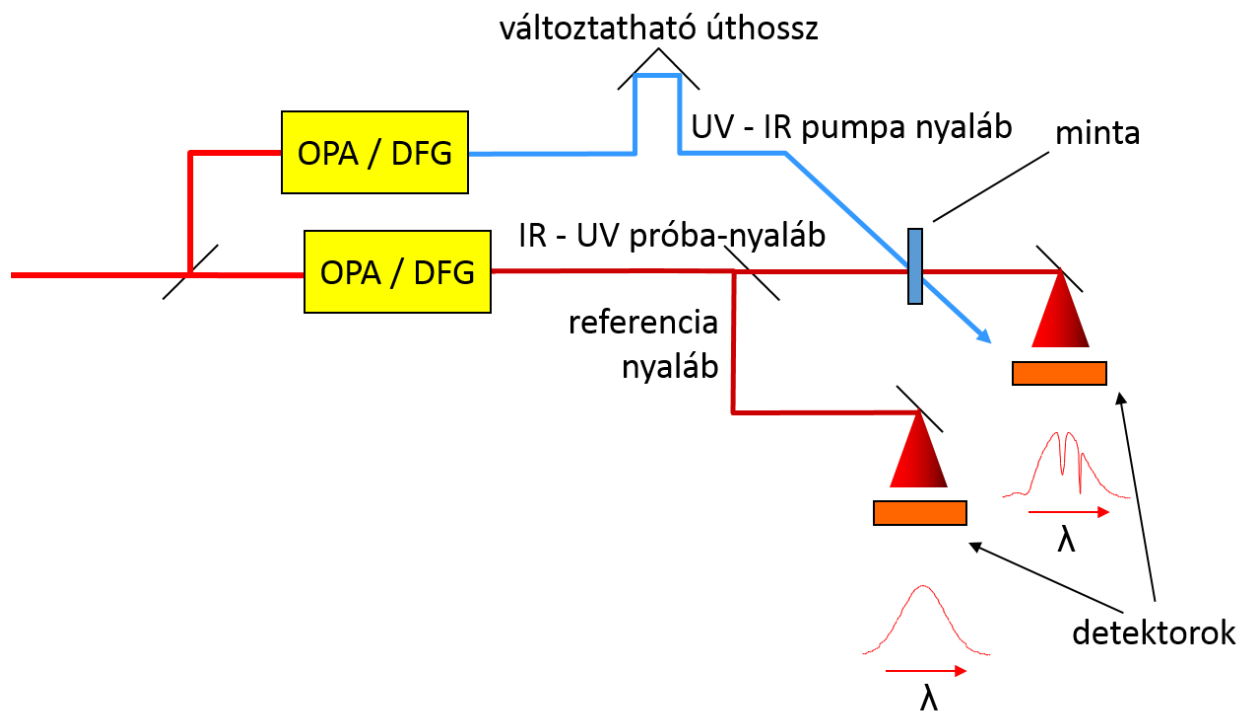


**12. ábra** Vibrációs szinteket bemutató Jablonski diagram

Az így nyerhető abszorpciós spektrumban található csúcsok a különböző típusú kötéseket jellemzik, ami megmutatja, hogy adott molekulákat hányzoros kötés tart össze. Az infravörös tartományban zajló mérések esetén a spektrumok abszcisszáján hullámhossz helyett hullámszámot szokás ábrázolni.

Az általunk vizsgált fotokémiai reakciók nagyon gyorsak. Amennyiben kötésátrendeződés történik, az a pillanat törtrésze alatt zajlik le, sokszor átmeneti, úgynevezett tranziens kötéseken keresztül. Ezek vizsgálatához az infravörös technikát tranziens abszorpciós technológiával kell kombinálni <sup>86</sup>.

Ez a technológia a pumpa próba módszer segítségével képes rövid időintervallumok felvételére. Lényege, hogy a pumpával gerjesztjük a mintát, majd arra késleltetve egy próba nyalábot bocsátunk, melynek abszorpcióját figyeljük. Az úgynevezett késleltető egység segítségével a gerjesztő- és a próbanyaláb mintára való érkezése között eltelt idő növelésével a jelenség időbeli lefolyását rögzíthetjük. Amennyiben a próbanyaláb infravörös tartományba esik, tranziens infravörös spektroszkópiáról beszélhetünk <sup>86</sup>.



13. ábra TRIR mérési elrendezés sémája

Tranziens technológiák esetén általában a felvett abszorpció egy keverék abszorpció: annyira gyors a tranziens átmenet, hogy a minta populációjának csak kis része van a vizsgálni kívánt állapotban. Ezért a felvett abszorpció két részből tevődik össze, ahogy ezt a következő egyenlet is szemlélteti <sup>86</sup>:

$$A_{mért} = x \cdot A_{gerj} + (1 - x) \cdot A_{nem\ gerj} \quad (34)$$

Ahol  $A_{mért}$  a mért abszorpció,  $A_{gerj}$  a pumpa által gerjesztett tranziens állapotban levő molekulák abszorpciója,  $A_{nem\ gerj}$  pedig a jelenleg nem gerjesztett állapotban levő molekulák abszorpciója. Az  $x$  súlytényezőnek jelentős szerepe van az egyenletben.

A gyakorlatban egy úgynevezett differencia spektrumot szokás használni, amit ábrázolnak (mivel mind  $A_{mért}$ , mind  $A_{nem\ gerj}$  könnyen meghatározható):

$$\Delta_{abs} = A_{mért} - A_{nem\ gerj} \quad (35)$$

A fenti két egyenletet kombinálva az alábbiakat kapjuk:

$$x \cdot A_{nem\ gerj} + \Delta_{abs} = x \cdot A_{gerj} \quad (36)$$

Ha negatív csúcsok alakulnak ki a differencia spektrumban, mely a  $\Delta_{abs}$ , akkor feltételezhetjük, hogy azokon a hullámszámokon lenne  $A_{gerj} = 0$ . Ez azt jelenti, hogy a gerjesztés hatására az ott megjelenő csúcsok eltűnnek, eltolódnak, és így a gerjesztett állapotú minta az adott hullámhosszon nem rendelkezik abszorpcióval. A negatív csúcs a nem gerjesztett állapothoz képest meglevő differencia miatt alakul ki. Ekkor a fenti egyenlet analógiájára a következő függvényt alakíthatjuk ki, melyben  $\Delta_{abs}$  biztosan ismert:

$$f \cdot A_{nem\ gerj} + \Delta_{abs} \quad (37)$$

Ha ebben az  $f$  értékét úgy variáljuk, hogy a negatív csúcs eltűnjön (tulajdonképpen  $\Delta_{abs}$ -ot korigáljuk,  $f \cdot A_{nem\ gerj}$  eltolással), akkor ebben az esetben igaz, hogy:

$$f = x \quad (38)$$

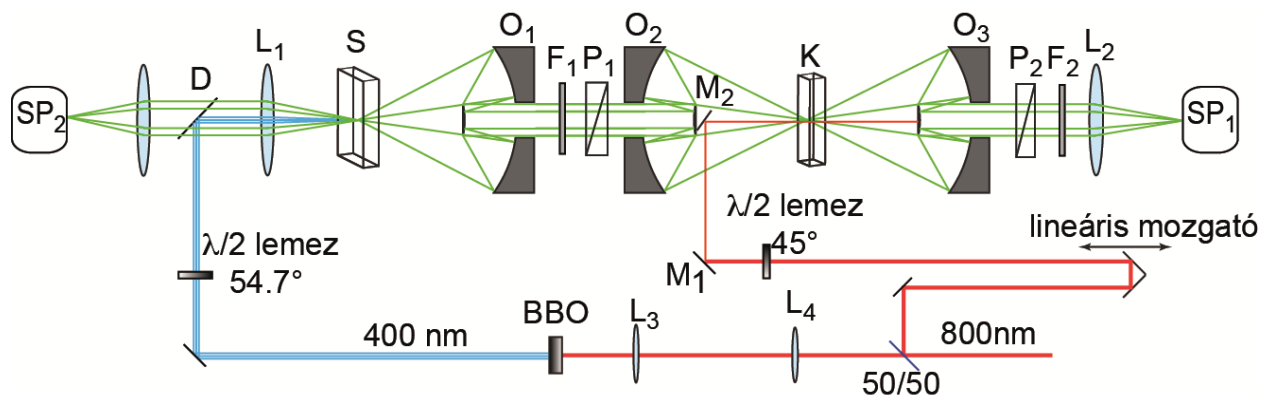
Ami azt jelenti, hogy a kapott függvény:

$$x \cdot A_{gerj} \quad (39)$$

azaz a keresett görbe lesz <sup>86</sup>.

### 3.1.9. Kerr-kapus idő-felbontásos spektroszkópia

A korábban taglalt TCSPC technológiához képest jobb időfelbontás érhető el, amennyiben fluoreszcencia upkonverziót vagy úgynevezett Kerr-kapuzott eljárást alkalmazunk <sup>87,88</sup>. Ekkor a minta fluoreszcenciájának útjában egy polarizátor-pár alkotta rendszer található, melyek egymásra merőleges állásúak, így nem képes a detektorra jutni a minta fluoreszcens fénye. A polarizátorok között helyezük el a Kerr anyagot, melynek fontos tulajdonsága, hogy intenzív lineárisan polarizált fény hatására megváltozik a törésmutatója, kettőtörővé válik. Ennek következtében a rajta áthaladó lineárisan polarizált fény elliptikusan polarizálttá válik, aminek hatására a fluoreszcens fény egy része átjuthat a második polarizátoron, azaz detektálható lesz. A kettős törést előidéző nyalábot kapuzó impulzusnak nevezzük, amelyet egy késleltető tükörrendszeren keresztül juttatunk a Kerr-közegre. A késleltető útvonal hossza szabályozható, ezáltal az is, hogy mikor nyílik a Kerr-kapu. Így tulajdonképpen meghatározott időszelleteket vehetünk fel a minta fluoreszcenciájáról, meglehetősen jó idő felbontással <sup>87</sup>.



**14. ábra** Kerr-kapuzott mérési elrendezés sémája. Legfontosabb részei; S: mintatartó, K: Kerr-cella, P1 és P2: keresztirányú polarizátorok, SP1: hűtött CCD-hez kapcsolt spektrométer a kapuzott fluoreszcencia detektálására, SP2: referencia spektrométer <sup>87</sup>.

A Kerr-kapuzott elrendezés további előnye, hogy ebben az esetben nem egy hullámhosszon végezzük a mérést, hanem egy szélesebb spektrális tartományt figyelünk meg, míg a fluoreszcencia upkonverzió és a TCSPC méréseknél csak egy hullámhosszt szoktunk detektálni. Így lényegében véve a fluoreszcencia emissziót két változó függvényeként nézzük, melyek a hullámhossz és az idő, ez pedig összetettebb adat elemzést igényel. Az alkalmazott kiértékelés a *global and target analysis* nevet viseli (globális és cél analízis). Globális, mivel minden mért idő spektrum kombinációt figyelembe vesz, a cél szó pedig arra utal, hogy valamilyen modellt próbál alkalmazni a kiértékelés során <sup>89</sup>. A model általában a rendszerről meglévő előzetes tudásunkat tartalmazza (pl.: ismert reakció átmenetek .stb). Egy komplex spektroszkópiai rendszerre a legegyszerűbben alkalmazható model során a rendszert úgy tekintjük, mintha adott számú különböző spektroszkópiai tulajdonságú és így különböző spektrumú komponensekből állna. A spektrumok súlyozott összegét rögzítjük a mérések során, mely összefügg az egyes komponensek koncentrációjával. Itt fontos megjegyezni, hogy mivel időben változó folyamatokról beszélünk, a komponensek aránya, koncentrációja időfüggést mutat. Ezt az alábbi egyenlet szemlélteti <sup>87</sup>:

$$F(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n c_i(t) a_i(\lambda) \quad (40)$$



Ahol  $F$  az általunk észlelt spektrum, mely  $n$  számú komponensből áll,  $c_i(t)$  az idő függő koncentráció, mely a komponensek arányát jellemzi,  $a_i(\lambda)$  pedig az egyes komponensek spektruma<sup>7,87,89</sup>.

## 3.2. Felhasznált anyagok és eszközök

### 3.2.1. Anyagok

A TCSPC mérések során használt nyúl májból származó III-as típusú glikogént a Sigma-Aldrichtól, a 7-aza-triptofán analógot pedig az Aldrichtól vásároltuk.

A következő AppA<sub>BLUF</sub> mutánsok fehérje expressziója és tisztítása: W64F, W64F/W104A, 7-aza-W104/W64F, Y21F/Y56F/W64F és Y21F/Y56F/W64F/W104F:

Az AppA vizsgált BLUF doménjét (AppA 5-125) BL21(DE3) *Escherichia coli* sejtekben expresszáltuk, melyet a sötétben történő fehérje preparálás és tisztítás módszere követett <sup>90</sup>. A W64F, W64F/W104A és Y21F/Y56F/W64F mutánsokat PCR amplifikációval, overlap extension mutagenézissel készítettük NdeI és BamHI resztrikciós enzimek segítségével a vad-típusú pET15b\_AppA<sub>BLUF</sub>-ből. A felhasznált primereket a következő táblázat listázza:

W64F forward	GGGCGTCTTCTCCAGTTCCTCGAAGGCCGCCCCG
W64F reverse	CGGGGCGGCCTTCGAGGAACTGGAAGAAGACGCC
W104A forward	CGCCGCTTTGCGGGAGCGCACATGCAGCTCTCC
W104A reverse	GGAGAGCTGCATGTGCGCTCCCGCAAAGCGGCG
Y21F forward	TCTGGTTTCTGCTGCTTCCGCAGCCTGGCGGCC
Y21F reverse	GGGCCGCCAGGCTGCGGAAGCAGCAGGAAACCAGA
Y56F forward	GACCGGCGCGCTCTTCTCAGCCAGGGCGTCTTCT
Y56F reverse	AGAAGACGCCCTGGCTGAAGAAGAGCGCGCCGGTC

1. táblázat Primerek táblázata

Az Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> mutáns előállításához szükséges DNS szekvenciát a Thermo Fisher Scientific-től szereztük be.

Az előállított mutánsokat ellenőrzésképpen DNS szekvencia analízisnek vetettük alá.

A 7-aza-W104/W64F mutánst a Belgian Coordinated Collection of Micro-Organisms-től vásárolt Triptofán auxotróf M5219 *Escherichia coli*-ban állítottuk elő. A W64F AppA<sub>BLUF</sub>-ot kódoló plazmidot hő-sokkal M5219 *E.coli*-ba transzformáltuk. Egy kolóniát 25 ml Luria Broth-ba oltottunk és egy éjszakán át 37°C-on 200 rpm-en inkubáltuk, amelyet ezt követően 1 liter M9-be

öntöttünk, amelyben a sejtek 30°C-on növekedtek, amíg az OD<sub>600 nm</sub> nagyjából 0.6 nem lett. Ezután a sejteket Trp elvonás végett háromszor mosó pufferrel tisztítottuk összesen 1 liter M9 ásványi sós 20%-os glükóz tartalmú médiumban. A mintát további 30 percig tenyésztettük 30°C-on, hogy biztos legyen a Trp elvonás<sup>91</sup>. Ezt követően 7-aza-triptofánt, egy triptofán analógot adtunk hozzá a kultúrához, majd további 15 percig inkubáltuk, utána a hőmérsékletet 18°C-ra csökkentettük 30 percre. A protein expressziót 0.8 mM izopropil β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)-al indukáltuk. A sejteket ezt követően kinyertük, lizáltuk és tisztítottuk Ni-NTA affinitás kromatográfiával, a szakirodalomban olvashatóknak megfelelően<sup>90</sup>. Az apoprotein a protein expresszió során keletkezett, és méretkizáró kromatográfiával különítettük el.

### 3.2.2. Steady State optikai és fluoreszcens mérések

Abszorpciós spektrumokat Perkin Elmer Lambda XLS+ és Jasco V-660 spektrofotométereken vettünk fel. Fluoreszcencia emissziós spektrumokat pedig Horiba Jobin Yvon Fluorolog spektrofluoriméterrel rögzítettünk. A gerjesztéshez használt hullámhosszak 295 nm, 310 nm, 350 nm, valamint 455 nm voltak. A résméret mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalon 5 nm volt. A mérések sötétben, 22°C-on zajlottak 10 mm x 1 mm-es kvarc kivetta segítségével.

### 3.2.3. Kioltási mérések

Az abszorpciós méréseket Jasco V-660 spektrofotométeren, míg az emissziós méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog spektrofluoriméteren végeztük. Emissziós mérések esetén 310 nm-es gerjesztést alkalmaztunk, 10 nm-es réssel a gerjesztési és az emissziós oldalon egyaránt. A méréshez használt akrilamidot a fehérjéhez is használt foszfát pufferben oldottuk fel.

### 3.2.4. Nanoszekundumos idő-felbontásos fluoreszcencia lecsengés mérések

Idő-felbontásos fluoreszcens mérések a nanoszekundumos skálán Horiba Jobin Yvon Nanolog FL3-2Ihr spektrofluoriméteren zajlottak TCSPC (időkorrelált egy-foton számlálásos) üzemmódban R928P Hamamatsu fotonsokszorozó segítségével. Detektor feszültségnek 950 V-ot alkalmaztunk. A mérési tartomány 200 ns-t ölelt fel, a gerjesztés ismétlése 1 MHz-es, a szinkronizációs késleltetés 50 ns-os volt, a résszélesség 10 nm volt. A lecsengési görbék pontjait 4096 csatornába több-csatorna analizátor segítségével rendeztük, 55 ps-os csatornaszélesség mellett. A dekonvolúciós művelet elvégezhetősége érdekében az impulzusválasz függvényt vízben oldott glikogén segítségével vettük fel (félértékszélesség  $\sim 1$  ns).

A fluoreszcencia élettartam mérések esetében a gerjesztést 7-aza-triptofán esetében 321 nm-en, míg FAD vizsgálata során 455 nm-en impulzus üzemmódban működő nanoLED-el (Horiba) végeztük. Az impulzus idők  $< 1$  ns és 1.2 ns-ok voltak. A fluoreszcencia emissziót 321 nm-en és 455 nm-en történő gerjesztést követően rendre 380 nm-en és 520 nm-en rögzítettük. A megfelelő emissziós hullámhossz szelekciója a rendszer beépített monokromátora segítségével történt. Minden mérés a Data Station v 2.6-os szoftver segítségével zajlott, az élettartam és anizotrópia adatok kiértékelése pedig a Jobin Yvon DAS6 v6.6 és FluoFit szoftverekkel.

A BLUF-domén proteinek világos állapotának elérése érdekében Thorlabs M385 L2C1, 385 nm-es csúcshullámhosszal rendelkező LED-et használtunk, amit a minta fölé helyeztünk, majd az elrendezést sötét lepelletel takartuk le. A világos állapotot 10 perc megvilágítás után értük el. A minta koncentrációja az 5-10  $\mu\text{M}$ -os tartományba esett. A fluoreszcens mérések során folytonos megvilágítással tartottuk a mintákat világos állapotban. Annak érdekében, hogy a 385 nm-es szórt fény zavaró hatását elkerüljük UG11 szűrőt helyeztünk a minta és a detektor közé. A mérések során 10 mm x 1 mm-es kvarc küvettákat alkalmaztunk. UV-ba és látható tartományba eső abszorpciós spektrumokat vettünk fel a fluoreszcens mérések előtt és után a világos állapot ellenőrzése érdekében, Thermo Scientific Evolution 600 UV-vis spektrofotométerrel alkalmazásával.

### 3.2.5. Pikoszekundumos idő-felbontásos fluoreszcencia mérések

Idő-felbontásos pikoszekundumos tartományba eső méréseket spektrálisan felbontott Kerr-kapuzott femtoszekundumos fluoriméterrel végeztünk. Az elrendezés Kerr-zárat alkalmaz <sup>92,93</sup>, és lehetőséget kínál arra, hogy a fluoreszcens spektrumot közel 100 femtoszekundumos és maximum néhány nanoszekundumos időskálán vegyük fel <sup>87</sup>. A kezdeti 780 nm-es lézernyalábot, melyet egy 1 kHz-es Ti:zafír lézer/erősítő rendszer (Quantronix Integra-C) generál, kettéosztjuk és az egyik útvonalon egy BBO kristály segítségével a frekvenciakétszerezés jelenségének köszönhetően 390 nm-es gerjesztő impulzussá alakítjuk. A másik, továbbra is 780 nm-es sugárrészt egy motorizált késleltető rendszer felé tereljük, majd a Kerr-közegre fókuszáljuk, ahol térben átfedésbe kerül a minta fluoreszcenciájával. A használt Kerr-anyag a CS<sub>2</sub> volt, melynek válaszfüggvény-szélessége közel 1.2 ps. A mintát 1 mm-es úthosszú optikai cellán áramoltattuk keresztül perisztaltikus pumpa segítségével. A világos állapot elérése érdekében a mintatartót

ThorLabs M450LP1 450 nm-es LED lámpával világítottuk meg. A tranziens fluoreszcencia spektrumokat maximum 1500 ps-os időablakkal vettük fel. Az időbeli és térbeli felbontású adatok globális analízisét diszkrét számú komponens lineáris kombinációját használva, mindre külön exponenciális sebességi állandót és lecsengéshez kapcsolt spektrumot feltételezve <sup>89</sup>, a Glotaran szoftverrel végeztük el <sup>94</sup>.

### 3.2.6. Tranziens infravörös spektroszkópia

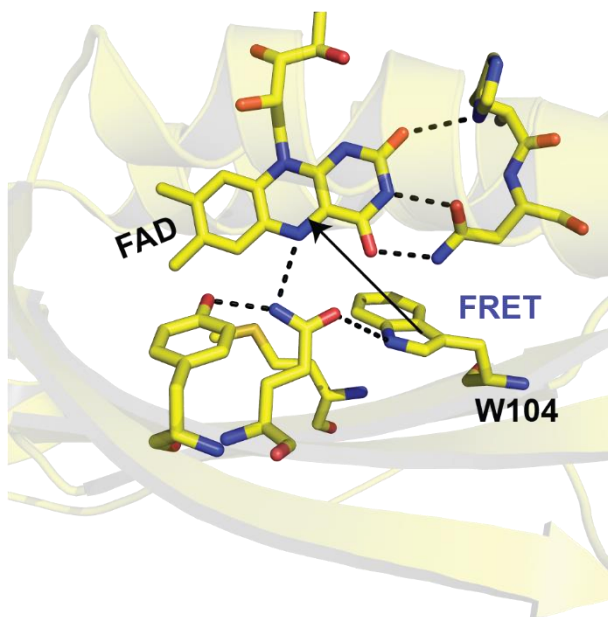
Az infravörös tranziens abszorpció (TRIR) mérések a Rutherford Appleton Laboratories Central Laser Facility 10 kHz ULTRA rendszerében készültek <sup>95</sup>. Az ULTRA száz femtoszekundum alatti időbeli felbontást, kiváló stabilitást, széleskörű hangolhatóságot biztosít a látható tartományban, valamint nagy sáv szélességet az IR próba esetében. A méréseink alkalmával a látható pumpa - IR próba elrendezést használtuk. A gerjesztő pumpa hullámhossza 450 nm volt, impulzusonként pár száz nJ-os energiával, melyet egy 100  $\mu\text{m}^2$  nagyságú területre fókuszáltunk. Az impulzus energiát úgy állítottuk be, hogy a kinetika független legyen a pumpálás energiájától. A mérés során a pumpa által indukált abszorpcióváltozást mértük az infravörös tartományban. Az általunk használt próba nyaláb szélessége közel 500  $\text{cm}^{-1}$ , így a méréseink tipikusan az 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$ -es tartományba estek.

## 4. Eredmények

### 4.1. FRET mérések

Annak érdekében, hogy kvantitatív információkat szerezzünk a fotoaktiváció folyamata során a Trp104 pozíciójáról fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) méréseket végeztünk.

A W104 és FAD közötti (15. ábra) FRET hatásfokot kétféle módszerrel kaphatjuk meg.



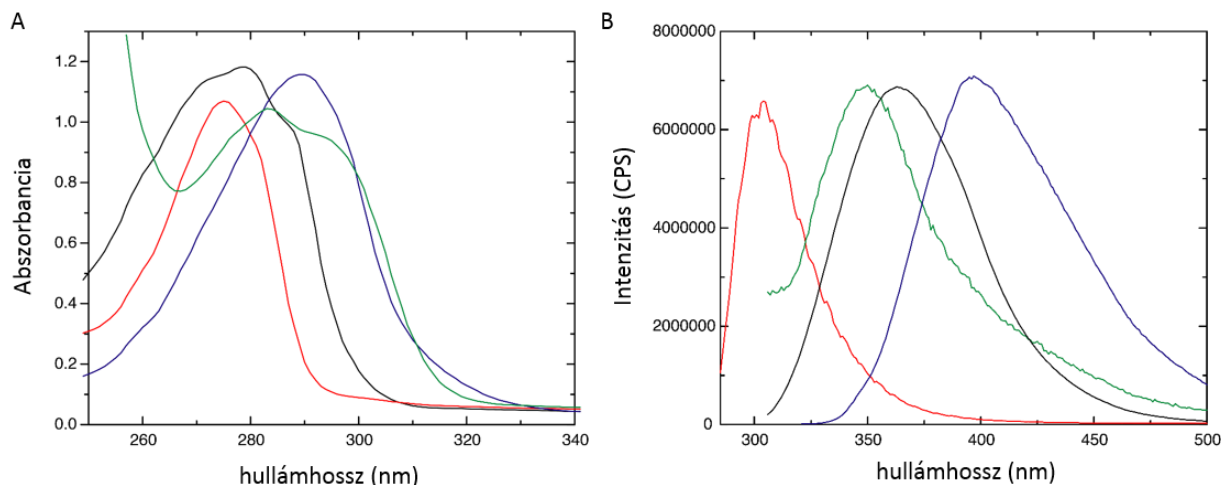
**15. ábra** C20S AppA<sub>BLUF</sub> (pdb: 1yrx) kristály szerkezetének szalagdiagramja, az ábrán látszik a FRET pár (FAD, W104).

Az egyik módszer a donor fluoreszcencia élettartamának mérése az akceptor (FAD) hiányában és annak jelenlétében. A másik lehetőséget az ún. akceptor érzékenyítés technikája jelenti, melynek során a donortól származó energiát az akceptor abszorbeálja, a vizsgálat tárgyát pedig az akceptor fluoreszcenciájában bekövetkező intenzitásnövekedés képezi.

### 4.2. A 7-aza-Trp analóg (7AW) használatának előnyei

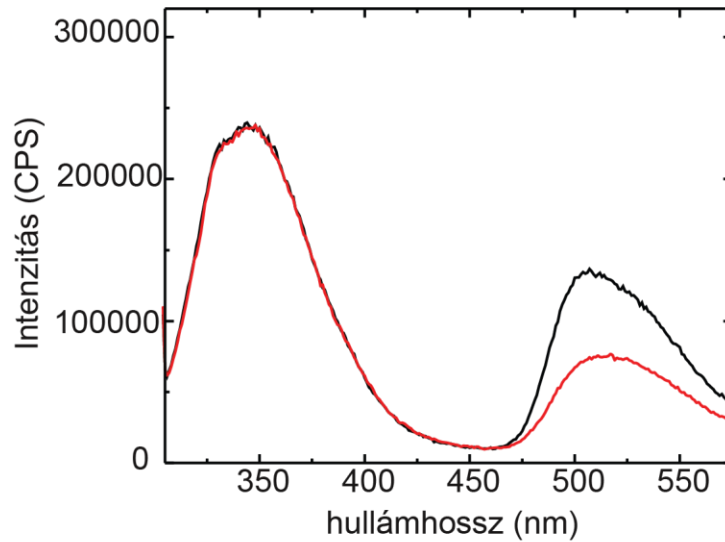
A W104-en kívül az APPA<sub>BLUF</sub> tartalmaz még egy triptofánt, a 64-es pozícióban (W64). Annak érdekében, hogy ennek a FRET-hez való hozzájárulását elkerüljük a W64F mutánst használtunk a méréseink során, melyben a triptofánt egy fenilalaninre módosítottuk, melynek a fluoreszcencia

intenzitása az általunk használt gerjesztés esetén elhanyagolható. Ennek érdekében, hogy elkerüljük a két tirozin (Y21 és Y56) fluoreszcencia emisszióját, az APPA<sub>BLUF</sub> vizsgálatokor a 295 nm-t választottuk gerjesztő hullámhossznak, ugyanis ebben az esetben a tirozin abszorpció minimális, ahogyan ez a 16. ábrán is látható.

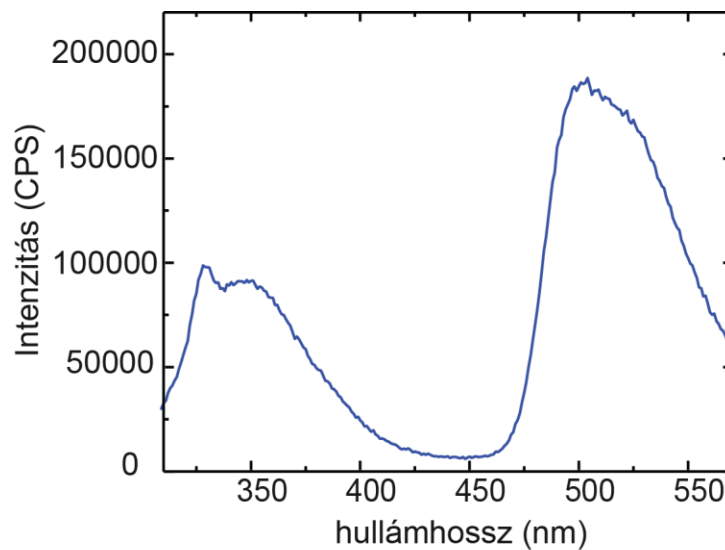


**16. ábra** A ábra: L-tirozin (vörös vonal) abszorpciós spektruma, L-Trp (fekete vonal) és 7-aza-trp (kék vonal) 50 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 8.00 pufferben, valamint L-tirozin (zöld vonal) glicin/NaOH pH 11.0 pufferben. B ábra: Emissziós spektrumok: L-tirozin (vörös vonal) (pH=8.0,  $\lambda_{gerj.}=280$  nm), L-tirozin (zöld vonal) (pH=11.0,  $\lambda_{gerj.}=295$  nm), L-triptofán (fekete vonal) (pH=8.00,  $\lambda_{gerj.}=295$  nm) és 7-aza-triptofán (kék vonal) (pH=8.00,  $\lambda_{gerj.}=310$  nm). A kvantum hatásfokok: L-Trp esetén 0.13, 7-aza-trp esetén 0.01, valamint L-Tyr esetén 0.14.

Várakozásainkkal ellentétben a triptofán nélküli mutáns W64F/W104A (18. ábra) is jelentős fluoreszcenciát mutatott 345 nm-en, ami valószínűsíthetőleg a triptofántól eltérő fluorofór jelenlétére utal, amely szintén hozzájárul a FRET-hez a W104 mellett.



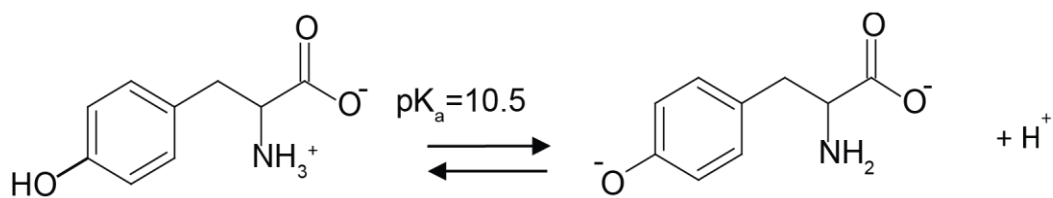
**17. ábra** W64F AppA<sub>BLUF</sub> emissziós spektruma sötét (fekete) és világos (vörös) állapotban ( $\lambda_{\text{gerj.}}=295\text{nm}$ ).



**18. ábra** W64F/W104A AppA<sub>BLUF</sub> ( $\lambda_{\text{gerj.}}=295\text{nm}$ ) emissziós spektruma. A keskeny kitüremkedő csúcs ~330 nm-nél a víz Raman szórásának járuléka.

Tirozin esetében ismert, hogy magas pH-n deprotonálódik és tirozinát lesz belőle (19. ábra), amely a triptofánhoz nagyon hasonló fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik.

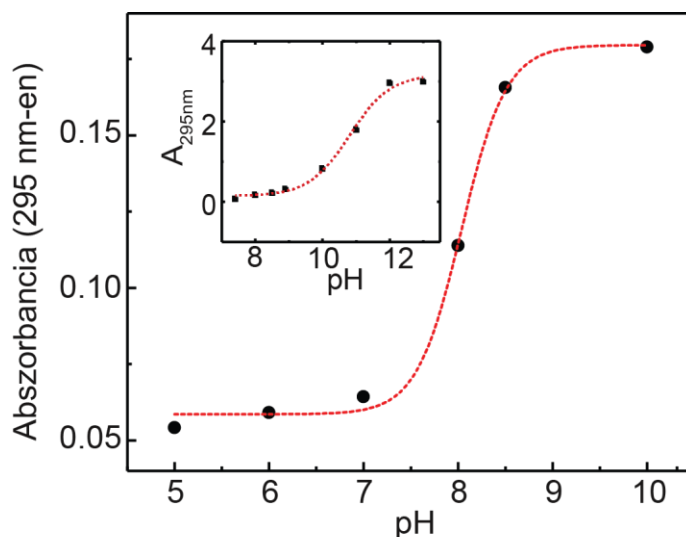




**19. ábra** Tirozin-tirozinát átmenetet bemutató kémiai struktúrák.

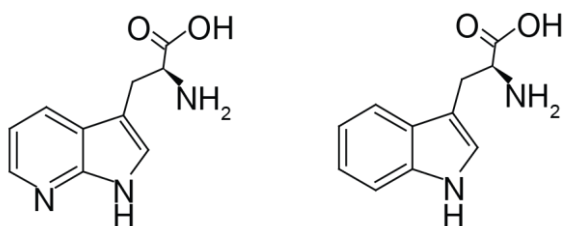
A környezeti pH emelkedésének eredményeképpen a 295 nm-en mért abszorpció megnő, míg a 270 nm-en felvett lecsökken, valamint a fluoreszcencia emisszió csúcsa 303 nm-ről eltolódik 340 nm-re<sup>96,97</sup>. Ez általában 10.5-nél magasabb pH-n következik be, mely a szabad tirozin pKa értéke<sup>98</sup>. Több protein kapcsán megfigyelték, hogy a szabad tirozinhoz képest a fehérjén levő tirozin reziduum alacsonyabb pKa értékkel rendelkezik, ami tirozinát formációhoz vezet és így fluoreszcencia emisszió jelenik meg 340 nm környékén, még pH < 10.5 esetén is<sup>99–102</sup>. Tirozinát fluoreszcenciát tapasztaltak például az Y99 szarvasmarha kalmodulin esetében, ahol a tirozin pKa értéke 7.0<sup>101</sup>. Ugyancsak tirozinát fluoreszcenciát figyeltek meg fotoaktív sárga fehérje esetén is (photoactive yellow protein, PYP), ahol a pKa érték markáns változást mutatott annak függvényében, hogy a tirozin mennyire volt az oldószernek kitett vagy attól védett pozícióban, ami a hidrogén kötések kialakításának valószínűségét befolyásolta<sup>103</sup>. Szintén pKa változást figyeltek meg csirke ovomucoid esetén, ahol azt tapasztalták, hogy a nyomás függő kitekeredés a 340 nm-es fluoreszcencia emisszió megnövekedéséhez vezetett<sup>97</sup>.

Annak tesztelése végett, hogy AppA W64F/W104A mutáns esetén pH=8.0 környezetben is előfordul-e tirozinát, pH függő méréseket folytattunk a 295 nm-nél megjelenő abszorpciót figyelve és megállapítottuk, hogy a tirozin pKa értéke a fehérjénk esetén 8.0. (20. ábra)



**20. ábra** A W64F/W104A AppA<sub>BLUF</sub> mutáns 295 nm-en mért tirozinát abszorpciójának pH-függő változása, valamint az oldatban levő L-tirozin azonos hullámhosszon mért abszorpciója (kisebb ábra). A szigmoid görbét Boltzman egyenlettel illesztve  $pK = 8.0$ -t kapunk az AppA<sub>BLUF</sub>-ben jelen levő két tirozinra, valamint  $pK = 10.5$ -t az oldatban levő L-tirozinra (kisebb ábra).

Ez azt jelenti, hogy  $pH=8.0$  esetén a tirozin reziduumok fele tirozinátként van jelen, amely erős fluoreszcenciát okoz 345 nm környékén, valamint torzuláshoz vezet olyan fluoreszcencia spektroszkópia méréseknél, amelyek esetében a triptofán fluoreszcenciát mérjük. Annak érdekében, hogy a tirozinát fluoreszcenciáját kiküszöböljük a W104-es triptofánt a 7-aza-triptofán nevű triptofán analóggal cseréltük ki.



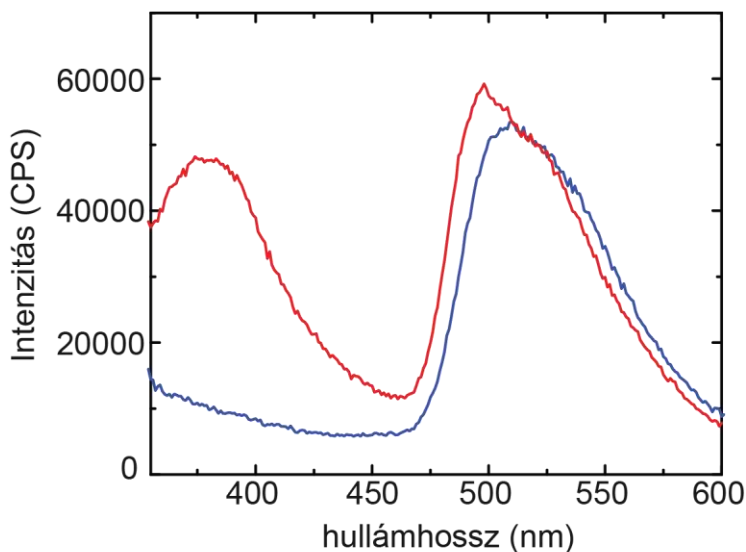
**21. ábra** 7-aza-triptofán (baloldal) és kanonikus triptofán (jobboldal) kémiai struktúrája.

7-aza-triptofánt 50 évvel ezelőtt építettek először fehérjébe<sup>104</sup>, ami ideális, nem-invazív, in situ szondaként működhet, amennyiben a fehérjék struktúráját és dinamikáját vizsgáljuk. Alkalmazásának előnye, hogy minimális strukturális és funkcionális változást okoz a fehérjében,

miközben kedvező spektrális tulajdonságokkal rendelkeznek a kanonikus triptofánhoz vagy más triptofán analógokhoz képest<sup>83,105</sup>. Ez konkrétan azt jelenti, hogy a 7-aza-triptofán abszorpciós maximuma 10 nm-t, fluoreszcencia maximuma pedig közel 50 nm-t tolódik el vörös irányban a kanonikus Trp-hoz képest (16. ábra)<sup>105</sup>.

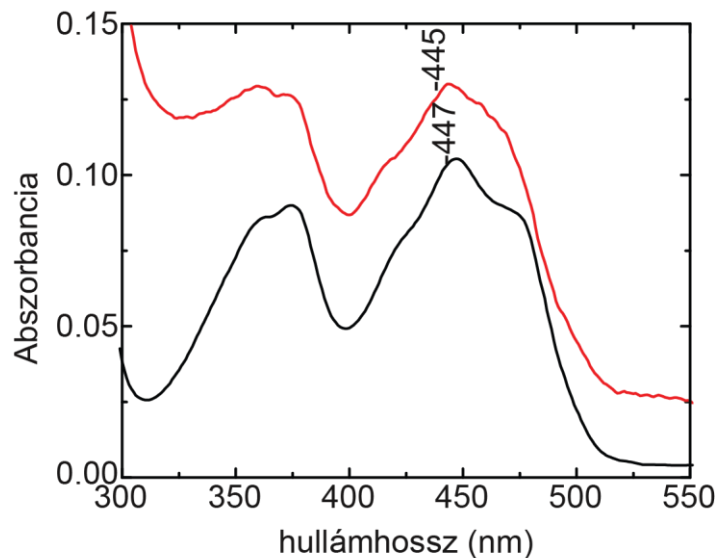
Az abszorpciós maximum vörös-eltolódása lehetővé teszi számunkra, hogy a 7-aza-triptofán analógot szelektív módon gerjesszük  $\lambda_{gerj} = 310 \text{ nm}$  segítségével, ahol a kanonikus triptofán ezen a hullámhosszon már nem abszorbeál, és ezzel megszabadulhatunk az említett 295 nm-es tirozinát abszorpciótól.

Triptofán auxotróf sejt vonalakat használva a W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutánsban a W104-et 7-aza-triptofán analógra cseréltük. Ennek sikerét a 310 nm-en történő gerjesztést követő karakterisztikus emissziós csúcs megjelenése jelezte, amely hiányzik a W64F mutánsból. (22. ábra)



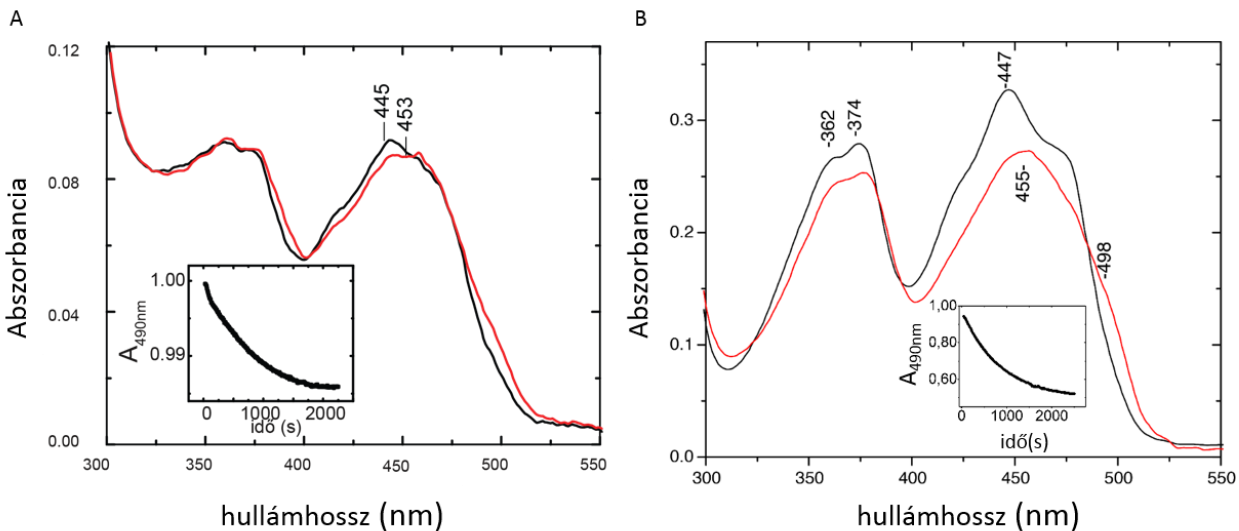
**22. ábra** W64F (kék vonal) és 7-aza-W104/W64F (vörös vonal) AppA<sub>BLUF</sub> mutánsok emissziós spektrumai ( $\lambda_{gerj.} = 310 \text{ nm}$ ). 310 nm-es gerjesztés esetén a W64F nem mutat fluoreszcencia emissziót 350 nm környékén a spektruma csak a Raman csúcs maradványt tartalmazza (ez nem látszik az ábrán).

A fehérje strukturális változása a kanonikus Trp-hoz képest hidrofilabb kötések miatt csak minimális, ahogy az a flavin abszorpciós spektrumából is látszik, amely hasonló a W64F-éhez (23. ábra)



**23. ábra** W64F (fekete vonal) és 7-aza-W104/W64F (vörös vonal) AppA<sub>BLUF</sub> mutánsok abszorpciós spektrumai. A spektrumokat vertikálisan eltoltuk, a könnyebb átláthatóság érdekében.

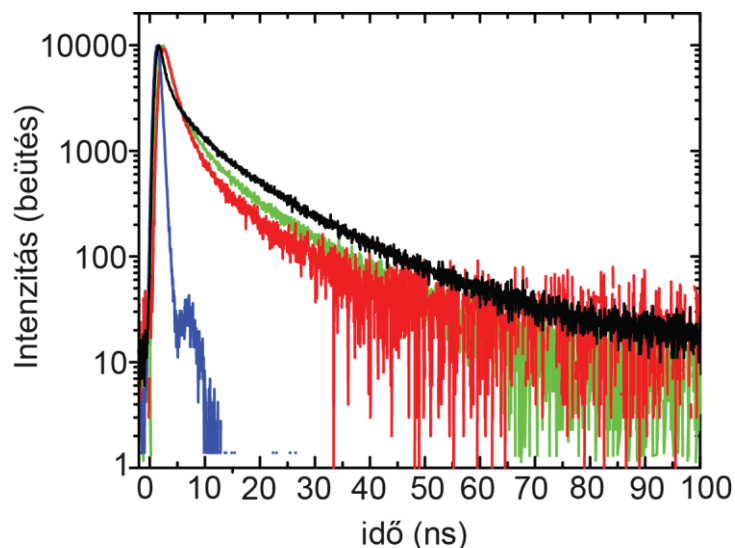
Másrészt a FAD izoalloxazin abszorpciós maximumának karakterisztikus vörös eltolódása világos állapot esetén hasonló, mint a W64F mutáns esetében. (24. ábra) Végül a sötét állapot visszaalakulási sebessége, mely kb. 14 perc, megegyezik a W64F-ével. (24. ábrába helyezett ábrák).



**24. ábra** A ábra: 7-aza-W104/W64F App<sub>BLUF</sub> abszorpciós spektruma sötét (fekete vonal) és világos (vörös vonal) állapotban, ami jól bemutatja a karakterisztikus vörös eltolódást. A kisebb ábra a sötét állapotba való visszatérés kinetikáját szemlélteti 490 nm-en, 385 nm-es gerjesztést követően. B ábra: Abszorpciós spektrumok: W64F App<sub>BLUF</sub> sötét (fekete vonal), valamint világos állapotban (vörös vonal). A kisebb ábra W64F App<sub>BLUF</sub> sötét állapotba való visszatérési kinetikája 490 nm-en, szintén 385 nm-es gerjesztés esetén.

### 4.3. FRET: 7-aza-W104/W64F App<sub>BLUF</sub> fluoreszcencia élettartam mérései

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a 7-aza-triptofán és a FAD közötti FRET hatásfokát (E) idő korrelált egy foton számlálás (TCSPC) méréseket végeztük az apoproteinén és a proteinén sötét és világos állapotokban (25. ábra).



**25. ábra** 7-aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub>, amely esetben a FAD jelen van, fluoreszcens lecsengése sötét (zöld), valamint világos (vörös) állapotban 321 nm-es gerjesztést követően, az emissziót 380 nm-en megfigyelve. A fekete görbén a 7-aza-triptofán fluoreszcencia lecsengése látható a FAD fehérjéből történő eltávolítását követően. A rendszer impulzusválasz függvényét (IRF) kékel ábráztuk.

A FRET hatásfokot a következő egyenlettel számoltuk:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (41)$$

Ahol  $\tau_{DA}$  a 7-aza-triptofán donor fluoreszcencia élettartama a FAD akceptor jelenlétében,  $\tau_D$  pedig az önálló donor fluoreszcencia élettartama. A gerjesztett állapotú triptofán analóg lecsengését mindhárom esetben három élettartam komponens használatával lehet a legjobban jellemezni (2. táblázat), a kanonikus triptofánt tartalmazó fehérjéhez hasonlóan.

<b>7-aza-Trp- W64F/W104</b>	$\tau_1$	$f_1$	$\tau_2$	$f_2$	$\tau_3$	$f_3$	$\tau_{\text{átlag}}$	<b>referencia</b>
apoprotein	0.4	0.2	4.1	0.3	16.2	0.4	8.7	7
holoprotein sötét	1.1	0.4	4.4	0.3	16	0.3	6.8	7
holoprotein világos	1.3	0.4	3.5	0.3	14.7	0.2	5.2	7
kanonikus Trp	0.2-0.9		1.2-3.6		3.7-9.2			106

2. táblázat 7-aza-triptofán fluoreszcencia élettartamok (ns) és a hozzájuk tartozó súlyok 7-aza-W104/W64F mutáns (FAD jelenléte nélkül) esetében, valamint a 7-aza-W104/W64F mutáns (FAD jelen a fehérjén) esetében sötét és világos állapotban.

A kanonikus triptofán két élettartama (0.2-0.9 ns és 1.2-3.6 ns) magára a triptofán struktúrára jellemző a környezettől függetlenül, míg a harmadik élettartam (3.7-9.2 ns) a triptofán környező reziduumokkal való interakciójából ered <sup>106</sup>. A 7-aza-triptofán esetében a legszembetűnőbb különbség a kanonikus triptofánhoz képest a harmadik élettartam hosszabb volta (14-16 ns). A másik két élettartam hasonló a kanonikus triptofánéhoz. A triptofán analóg élettartama rövidebb FAD jelenlétében, amely Förster-típusú energia transzferre utal.

Kiszámolva a FRET hatásfokot az átlag élettartamokat használva:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (42)$$

$$E_{\text{sötét}} = 1 - \frac{6.79}{8.73} = 1 - 0.77 = 0.23 \quad (43)$$

$$E_{\text{világos}} = 1 - \frac{5.24}{8.73} = 1 - 0.6 = 0.4 \quad (44)$$

Sötét állapot esetében 23%-os hatásfokot kaptunk, a világos állapot esetében pedig 40%-osat. A triptofán és a flavin átlagos távolsága megbecsülhető a következő képlet segítségével:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} \quad (45)$$

$R_0$  meghatározásához az alábbi formulát használjuk, mely egyenletet részletesebben is ismertettem az Anyagok és módszerek részben:

$$R_0 = 9.78 \cdot 10^3 [J(\lambda) \kappa^2 n^{-4} \phi_D]^{1/6} \text{ \AA} \quad (46)$$

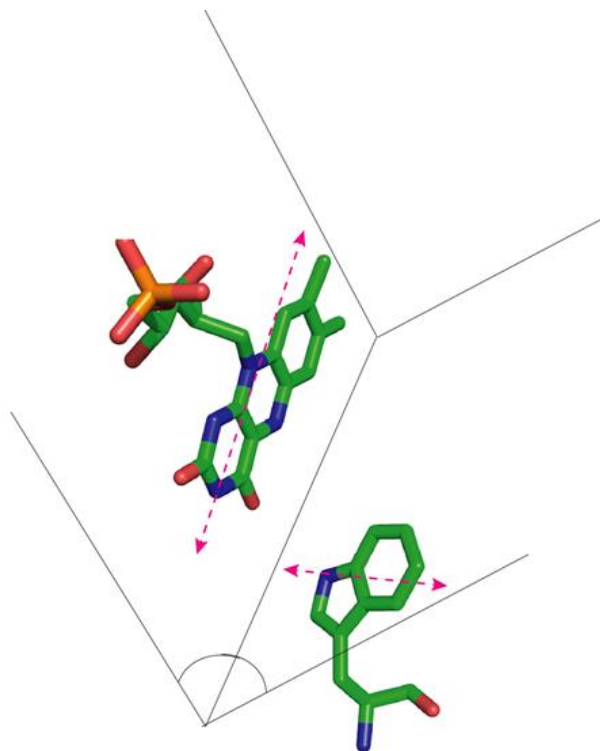
A 7-aza-triptofán és a FAD esetén  $R_0 = 16.8 \text{ \AA}$ , azt feltételezve, hogy a triptofán szabadon foroghat és így az orientációs faktor értéke  $\kappa^2 = 2/3$  [Förster distance calculator (verzió 1.0c, UMASS)]. Ezt a feltevésünket alátámasztják a későbbiekben részletezett fluoreszcencia anizotrópia lecsengés mérések. Így sötét állapot esetén a 7-aza-triptofán és flavin távolságot 20.5 Å-nek becsüljük:

$$R = 16.8 \cdot \sqrt[6]{\frac{1-0.23}{0.23}} = 20.5 \text{ \AA} \quad (47)$$

Világos állapot esetén a  $\text{Trp}_{\text{bent}}$  pozíciót feltételezve, mely felvetést szintén megerősítik a későbbi anizotrópia lecsengés mérések, a megfelelő kristály struktúra alapján (pdb:1yrx) látható, hogy a 104-es triptofán tranziciós dipól momentuma közel merőleges  $\theta_A = 80^\circ$ -os szöget zár be a flavin és a triptofán síkjainak találkozását jelző vonallal. A két sík  $\phi \sim 63^\circ$ -os szöget alkot, mely  $\kappa^2 = 0.02$ -t eredményez. Megjegyzendő, hogy  $\kappa^2$  meghatározásában bizonytalanság van, mivel a dihedrális szög  $63^\circ$  és  $74^\circ$  között változik (26. ábra). Ennek köszönhetően a  $\kappa^2$  értéke közel nulla, mely a merőleges orientáció teoretikus értéke. A számításaink során  $\kappa^2 = 0.02$  értéket kaptunk. Ez esetben  $R_0$  értéke 8.9 Å-re módosul, miközben a világos állapot esetén a triptofán és a flavin távolsága 9.5 Å-nek adódik:

$$R = 8.9 \cdot \sqrt[6]{\frac{1-0.4}{0.4}} = 9.5 \text{ \AA} \quad (48)$$





**26. ábra** FAD és a 104-es Trp tranzíciós dipólus momentumainak relatív orientációja (pdb:1YRX).

#### 4.4. FRET: akceptor érzékenyítés módszere

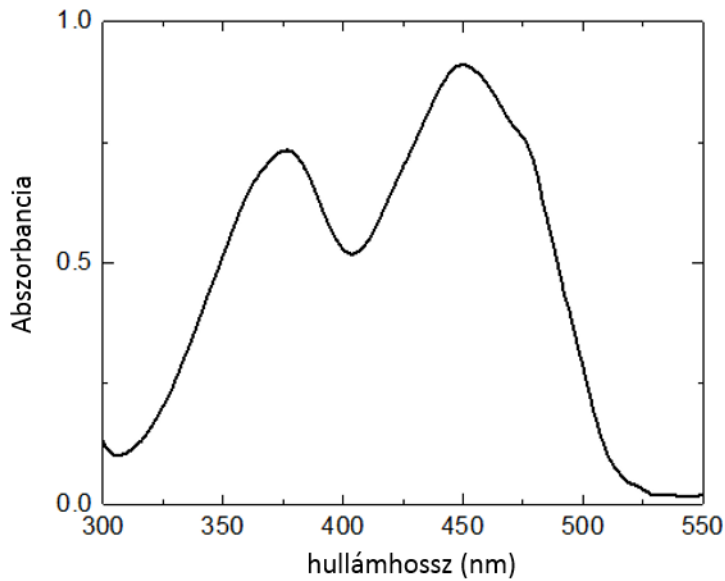
A fluoreszcens intenzitás triptofán és flavin közti FRET miatti erősödését 7-aza-W104/W64F mutánson mértük, hogy elkerüljük a tirozinát fluoreszcenciát. A 7-aza-W104 és a flavin közötti FRET hatásfok számolható a triptofán emissziós intenzitásának csökkenéséből vagy a flavin emisszió megerősödéséből, melyeket a rezonancia energia transzfer okoz. Az utóbbi módszer az akceptor érzékenyítés nevet viseli <sup>76,84</sup>. A FRET hatásfokot a következő egyenlettel számolhatjuk:

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] \quad (49)$$

Ahol  $\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})$  és  $\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})$  az akceptor és donor extinkciós koefficiensek a donor gerjesztési ( $\lambda_D^{gerj} = 310 \text{ nm}$ ) hullámhosszán.  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  és  $I_A(\lambda_A^{em})$  pedig az akceptor intenzitások a donor jelenlétében, valamint anélkül az akceptor emissziós hullámhosszán nézve ( $\lambda_A^{em} = 505 \text{ nm}$ ). A megfelelő értékeket az egyenletbe helyettesítve az alábbiakat kapjuk:

$$\begin{aligned}\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj}) &= \varepsilon_{FAD}(310nm) = \varepsilon_{FAD}(450nm) \cdot \left(\frac{OD310nm}{OD450nm}\right) = \\ &= 8500 \cdot 0.101 = 860.32 M^{-1}cm^{-1}\end{aligned}\quad (50)$$

A flavin abszorpciós spektrumát a 27. ábra mutatja:

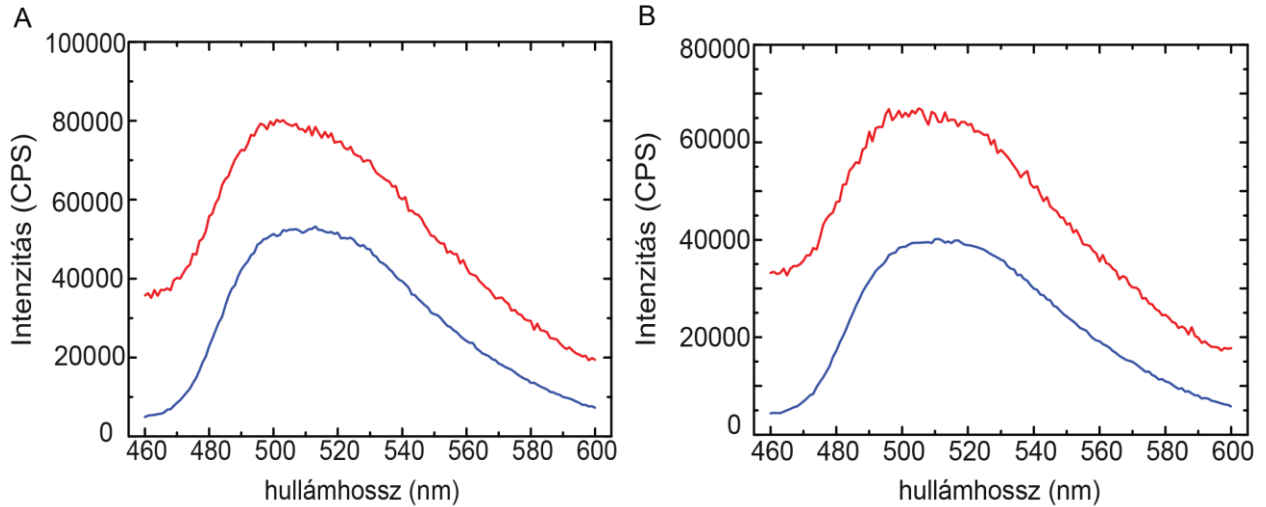


**27. ábra** PBS pufferben levő FAD abszorpciós spektruma.

$$\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj}) = \varepsilon_{7azaTrp}(310nm) = \varepsilon_{7azaTrp}(max) \cdot \left(\frac{OD310nm}{ODmax}\right) = 1013 M^{-1}cm^{-1}\quad (51)$$

7-aza-trp abszorpciós spektruma a 16.A ábrán található.

FAD moláris extinkciós koefficiense  $\varepsilon_{FAD} = 8500 M^{-1}cm^{-1}$  450 nm esetén <sup>107</sup>. A triptofán moláris extinkciós koefficiense pedig  $\varepsilon_{Trp} = 6000 M^{-1}cm^{-1}$  290 nm-en <sup>105</sup>. 7-aza-W104/W64F mutáns vizsgálatakor  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  értéke 78940 cps sötét állapot során, ahogy a 28. ábra A része szemlélteti (a 28. ábra B részén pedig a világos állapotú spektrum látható)



**28. ábra** A ábra: 7-aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> emissziós spektruma sötét állapotban (vörös vonal). B ábra: 7-aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> emissziós spektruma világos állapotban (vörös vonal) 310 nm-es gerjesztés során. A késsel jelzett spektrumok az akceptor érzékenyítés módszere során számolt, kizárólag akceptort tartalmazó spektrumok. Világos állapotban jelentős fluoreszcencia erősítés figyelhető meg a 7-aza-triptofán és a flavin közötti FRET esetén (vörös görbe a kékhez képest), ugyanez sötét állapot esetén kevésbé jelentős (A ábra).

7-aza-W104/W64F emissziós intenzitását [ $I_A(\lambda_A^{em})$ ] a donor hiányában a következő hányadossal számoltuk a W64F mutáns mérési eredményeit felhasználva:

$$\frac{I_{350nm}(\lambda_{FAD}^{505nm})}{I_{310nm}(\lambda_{FAD}^{505nm})} = 4.71 \quad (52)$$

310 és 350 nm-en gerjesztve, a W64F mutánsban a triptofánok nem gerjesztődnek, így ekkor a flavinból származó fluoreszcencia megfelel az akceptor fluoreszcencia intenzitásának a donor hiányában. Ennek alapján a FAD fluoreszcencia intenzitása sötét állapot esetén 7-aza-W104W64F mutánsra:

$$I_A(\lambda_A^{em}) = I_{\lambda_{gerj}=310nm}(\lambda_{FAD}^{505nm}) = \frac{I_{\lambda_{gerj}=350nm}}{4.71} = \frac{246978}{4.71} = 52437 \text{ cps} \quad (53)$$

Így 7-aza-W104/W64F mutáns esetén a FRET hatások sötét állapotban:

$$E_{sötét} = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] = \frac{860.32}{1013} \left[ \frac{78940}{52437} - 1 \right] = 0.42 \quad (54)$$

A FRET távolság függése miatt  $\left( E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \right)$  a Trp és FAD távolságot a következőképpen

becsülhetjük meg sötét állapotban:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} = 16.8 \sqrt[6]{\frac{1-0.42}{0.42}} = 17.7 \text{ \AA} \quad (55)$$

$R_0 = 16.8 \text{ \AA}$  a 7-aza-W104/W64F mutáns esetében.

Trp104 és Flavin közötti R távolság számítása a világos állapotú 7-aza-W104/W64F mutánsban.

Az előzőekben leírt módszert használva világos állapot esetén is kiszámoltuk az R távolságot a Trp104 és a Flavin között, melyre  $R = 8.3 \text{ \AA}$  adódott.

Részletezve, a világos állapotú 7-aza-W104/W64F mutánsnál a FRET határfokra a következőt kaptuk:

$$E_{világos} = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{gerj})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{gerj})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] = \frac{860.32}{1013} \left[ \frac{66940}{39377} - 1 \right] = 0.59 \quad (56)$$

Így a távolság Trp104 és a FAD között világos állapotban:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} = 8.9 \sqrt[6]{\frac{1-0.59}{0.59}} = 8.3 \text{ \AA} \quad (57)$$

Itt  $\kappa^2 = 0.02$  értéket használtunk. Ekkor  $R_0 = 8.9 \text{ \AA}$ , mely  $8.3 \text{ \AA}$ -s donor-akceptor távolsághoz vezet.

Az adatok elemzése a FAD emisszió jelentős növekedését mutatta a donor jelenlétében mind a sötét, mind a világos állapot során, mely hatásos FRET jelenlétére utal a 7-aza-triptofán és a FAD között. Ez a fluoreszcencia erősödés a világos állapotban még hangsúlyosabb. A FRET határfokot  $E_{sötét} = 42\%$  és  $E_{világos} = 59\%$ -nak számoltuk, melyekhez  $R_{sötét} = 17.7 \text{ \AA}$  és  $R_{világos} = 8.3 \text{ \AA}$  távolságok járulnak a sötét és világos állapotban<sup>52,108</sup>.

## 4.5. FRET-tel meghatározott távolságok összehasonlítása kristály struktúrákból származó távolságokkal

A becsült Trp104 és FAD távolságok, melyek az élettartam, valamint az akceptor érzékenyítés módszeréből származnak, relatíve jó közelítéssel megegyeznek a sötét állapot esetén (20.5 Å és 17.7 Å). A fluoreszcens mérések segítségével becsült távolságaink szintén összhangban vannak az AppA<sub>BLUF</sub> kristály struktúrákból (pdb: 2iyg, 2iyi) származó, valamint a Cys-gazdag régió nélküli teljes hosszúságú AppA (pdb:4hh0,4hh1) struktúrájának elemzéséből nyert adatokkal (3. táblázat), mely esetekben a W104-es aminosav a felszín irányába áll, távol a FAD-tól (Trp<sub>kint</sub> konformáció).

Azonban ezek jelentősen eltérnek az AppA<sub>BLUF</sub> (pdb:lyrx, 5.9 Å) első kristályszerkezetétől és az NMR-rel meghatározott struktúrától (pdb:2bun, 6.2 Å), ahol a W104 Trp befele fordul (Trp<sub>bent</sub>) konformációt vesz fel, közel a FAD-hoz. Fontos információ, hogy a helyi eltéréseket az AppA1-124C20S sötét struktúrában (pdb:2iyg) és az AppA17-133 (pdb:1yrx) struktúrában a korábban megkötött detergens molekuláknak tulajdonították<sup>62</sup>. Ez alapján az AppA1-124C20S jobban jellemzi az AppA<sub>BLUF</sub> oldott állapotát. A világos állapotú FRET és fluoreszcencia élettartam mérésekből adódó szignifikánsan rövidebb (9.4-11 Å) távolságok a W104 és a FAD között arra utalnak, hogy a világos állapot esetén a W104 Trp<sub>bent</sub> pozíciót vesz fel. Megjegyzendő, hogy ilyen különbség nem volt észlelhető a sötét és világos állapotú kristály struktúrák között AppA1-124C20S<sup>62</sup> (3. táblázat) esetében, mely valószínűleg a W104-hez tartozó indolgyűrű korlátozott mobilitásának tulajdonítható. Ezt tükrözi az is, hogy a kristály esetében a fotoaktiváció hatására bekövetkező vörös-eltolódás kisebb (5-6 nm), mint oldott állapotú rendszer esetében (14 nm), mely egy köztes stádiumra utal a teljes világos-állapot elérése előtt<sup>62</sup>. Érdekes módon szignifikáns konformáció változást nem figyeltek meg a W90-es triptofán esetén a kristályosított OaPAC BLUF-domén fehérjében a közel 10 nm-es fotoaktiváció okozta vörös eltolódás ellenére sem<sup>109</sup>.

Protein	pdb/FRET	Távolság (Å)	referencia
AppA <sub>BLUF</sub> (17-133)	1yrx	5.9	110
AppA <sub>BLUF</sub> (5-125)	2bun	6.2	70
AppA <sub>BLUF</sub> C20S (1-124)	2iyg (sötét)	16.0	62
AppA <sub>BLUF</sub> C20S (1-124)	2iyi (világos)	16.2	62
AppA C20S Δ399	4hh0	15.7	110
wt AppA Δ399	4hh1	15.7	110
TePixD <sub>BLUF</sub> (2-143)	1x0p	16.1	63
Slr1694 <sub>BLUF</sub> (2-140)	2hfn	15.7, 5.7*	64
OAPAC (1-366)	4yus	16.6	66
BrlB <sub>BLUF</sub> (1-140)	2byc	16.0	65
7-aza-W104W64F (sötét)	FRET:FL	20.5	7
7-aza-W104W64F (világos)	FRET:FL	9.5	7
7-aza-W104W64F (sötét)	FRET: AEM	17.7	7
7-aza-W104W64F (világos)	FRET: AEM	8.3	7

3. táblázat A W104 AppA<sub>BLUF</sub> esetén a Trp indol-gyűrűjének C7-es szénatomja és a flavin izoalloxazin gyűrűjének N3-as nitrogénje közötti távolságok összehasonlítása a rendelkezésre álló AppA<sub>BLUF</sub>, teljes hosszúságú AppA domének és más BLUF domének kristály struktúrái alapján. Azokra a struktúrákra vonatkozóan, melyek több mint egy alegységet tartalmaznak, a távolság átlaga van megadva. \*Slr1694<sub>BLUF</sub> (2-140) esetén rövidebb a megfigyelt távolság (5.7 Å) a tíz alegység egyikében. FRET: FL jelzés a saját FRET méréseinkre utal, melyek fluoreszcencia élettartam vagy FRET: AEM (akceptor érzékenyítés) módszerével történtek.

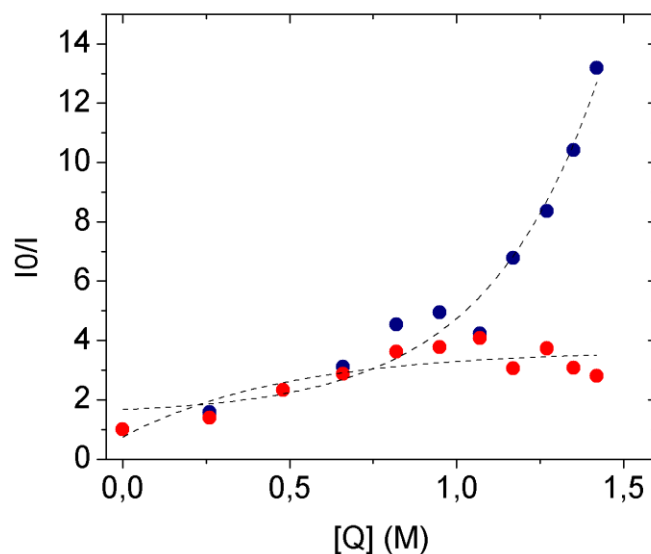
## 4.6. 7-azaTrp-W64F akrilamid kioltási mérései

Annak érdekében, hogy a 104-es triptofán hozzáférhetőségéről képet kapjunk, fluoreszcencia kioltási méréseket is végeztünk, megismételve a szakirodalom egy korábbi kísérletét <sup>60</sup>. Esetünkben a kioltási mérések során is az analóg triptofánt tartalmazó 7-azaTrp-W64F mutánst használtuk, hogy 310 nm-es gerjesztést alkalmazva elkerüljük a tirozinát fluoreszcenciáját. A minta fluoreszcenciáját 370 nm-en detektáltuk. A mérés alkalmával tíz lépésben ugyanazt az akrilamid mennyiséget adtuk hozzá a mintához, így fokozatosan növelve a kioltó molekulák koncentrációját a rendszerben. A kapott intenzitás értékeket a korábbiak során részletezett módon korigáltuk a következő egyenlet segítségével:

$$F_{korrigált} = F_{megfigyelt} \cdot \frac{V_{új}}{V_{eredeti}} \cdot 10^{\left(\frac{OD_{gerj} + OD_{emi}}{2}\right)} \quad (58)$$

Ehhez abszorpciós méréseket végeztünk, amelyek során minden egyes akrilamid adagolási lépést követően felvettük a minta abszorpcióját mind az emissziós méréseknél használt 310 nm-es gerjesztési, mind az emissziós mérésnél vizsgált 370 nm-es hullámhosszokon.

A 29. ábra szemlélteti az eredményül kapott kioltási görbéket:



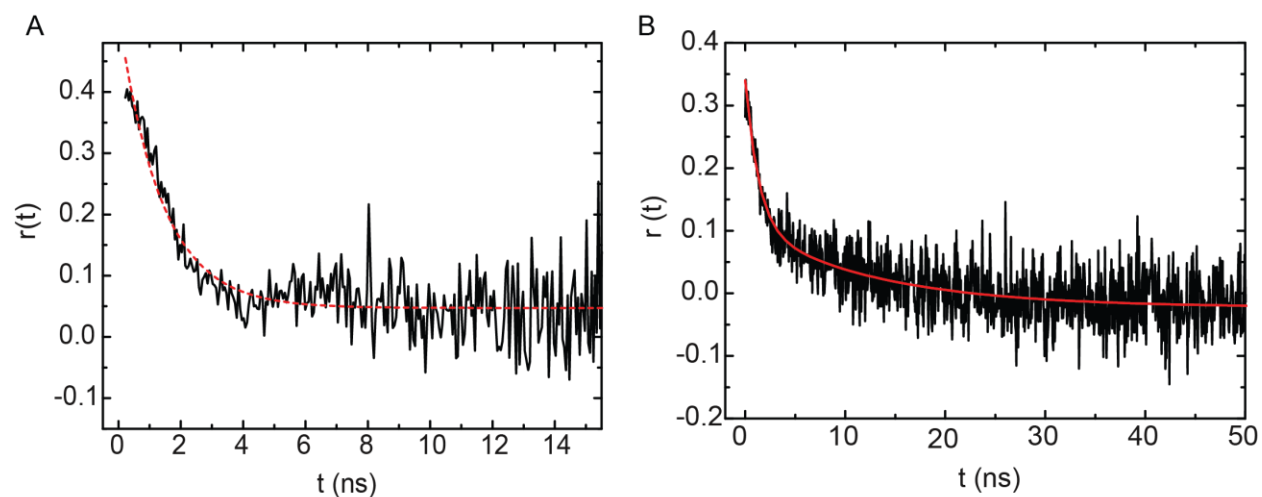
**29. ábra** 7-aza-Trp-W64F mutáns akrilamid kioltás mérése sötét (kék) és világos (piros) állapotban.

A kapott kiotási görbék alapján a 104-es triptofán jobban hozzáférhető az akrilamid számára a sötét állapotban, amit az ekkor detektálható erőteljesebb fluoreszcencia kioltás jelez. Ez azt a feltételezést támasztja alá, miszerint sötét állapotban a triptofán a Trp<sub>kint</sub> pozícióban van.

## 4.7. Anizotrópia mérések

Annak érdekében, hogy a W104 konformációs dinamikáját és térbeli korlátait megfigyeljük időfelbontásos fluoreszcencia anizotrópia lecsengés méréseket végeztünk.

A 30. ábra a fluoreszcencia anizotrópia lecsengését mutatja 7-aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutáns sötét és világos állapotai esetén.

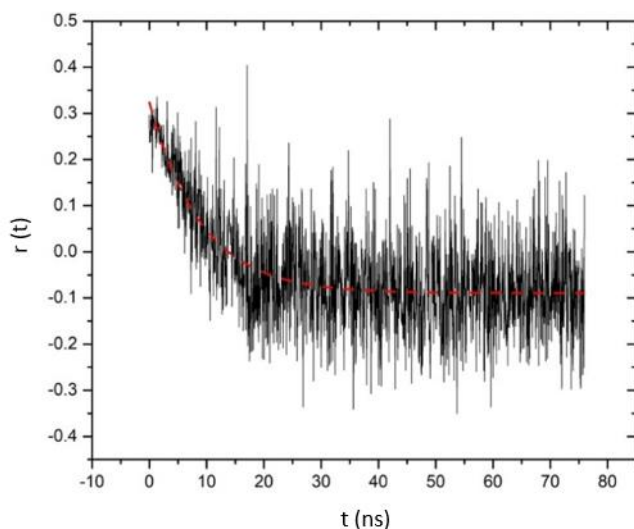


**30. ábra** Fluoreszcencia anizotrópia lecsengése 7-aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> esetén sötét (A) és világos (B) állapotokban.

Egy exponenciális illesztése a következő lecsengési konstansokat szolgáltatja:  $\theta_{\text{sötét}} = 1.5 \pm 0.06 \text{ ns}$  valamint  $\theta_{\text{világos}} = 11.1 \pm 0.5 \text{ ns}$ . A sötét állapotú rövid korrelációs idő a triptofán szabad forgását jelenti. A megfigyelt 11 ns-os hosszabb rotációs korrelációs idő a világos állapot esetében az egész protein forgását jellemzi és összhangban van azzal az értékkel, mely a Visser-féle empirikus formulából következik <sup>79</sup>:  $\phi = 3.84 \cdot 10^{-4} M_r$ , ahol  $\phi$  a rotációs korrelációs időt jelöli ns-ban, valamint  $M_r$  a fehérje molekulásúlya Da-ban kifejezve. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy kék fény hatására a W104-es triptofán közelebb kerül a flavinhoz és valószínűleg hidrogén kötést létesít egy közeli aminosav reziduummal, feltehetőleg a Q63-mal.



Fluoreszcencia anizotrópia lecsengés méréseket végeztünk az Y21F/Y56F/W64F AppA mutáns esetében is, melyek alapján a lecsengés kb. 10 ns-os eredménye nagyon közel van a világos állapotban megfigyelt rotációs korrelációs értékhez. Ez arra utal, hogy az Y21F/Y56F/W64F mutánsban a triptofán valószínűleg szintén hidrogén kötést alkot egy közeli aminosavval.



**31. ábra** Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutáns fluoreszcencia anizotrópia lecsengése.

Ezek az eredmények nagyon hasonlítanak a FRET méréseinknél látottakhoz, ahol a W104 AppA<sub>BLUF</sub> flexibilis dinamikával rendelkezik sötét állapotban, míg a világos állapot alkalmával a triptofán mozgása korlátozottabb. Ez valószínűleg a 7-aza-triptofán nitrogén atomjainak a flavin Q63-mal és az O14-es oxigénjével létesített hidrogén-kötéseinek tudható be, amely még komplexebbé teszi a flavin körüli erős hidrogén-kötés rendszert.

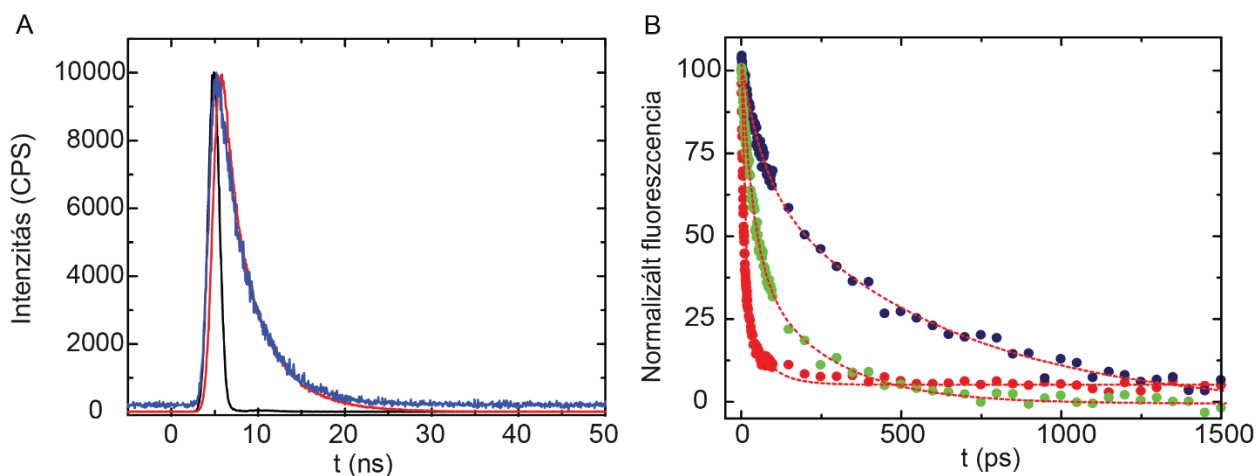
A W104 sötét állapot során megfigyelt flexibilis viselkedése jelentős, tekintve, hogy a korábbi tanulmányok a flavin közeli W104 esetben Trp<sub>bent</sub> konformációját részesítették előnyben<sup>60,62,71</sup>.

#### 4.8. Flavin fluoreszcencia élettartama sötét és világos állapot esetén

A közeli aromás aminosavakról, például triptofánról vagy a tirozinról a gerjesztett állapotú flavin kromofór irányába történő ultragyors elektrontranszfert számos flavoproteinnél megfigyelték, úgymint a glükóz-oxidáz, a flavodoxin, a riboflavin kötő fehérje, a fotoliáz/kriptokrómok és a ThyX esetében<sup>111–115</sup>. Ez az úgynevezett fotoindukálta elektron transzfer (PET), ami a flavin

fluoreszcencia élettartamának jelentős csökkenéséhez vezet. A flavin fluoreszcencia élettartam sötét és világos állapotban történő detektálásához TCSPC és Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiát <sup>87</sup> alkalmaztunk, amivel a W104 helyzetéről és a fotoaktiváció során a kioltó mechanikára gyakorolt hatásairól kívántunk további információt nyerni.

Az AppA<sub>BLUF</sub> mutáns esetében, amelyben az összes elektrondonort, azaz két tirozint és két triptofánt fenil-alaninre cseréltük (Y21F/Y56F/W64F/W104F), a flavin fluoreszcencia élettartama a vártnak megfelelően alakult, 3.8 ns-nak adódott (31. ábra).



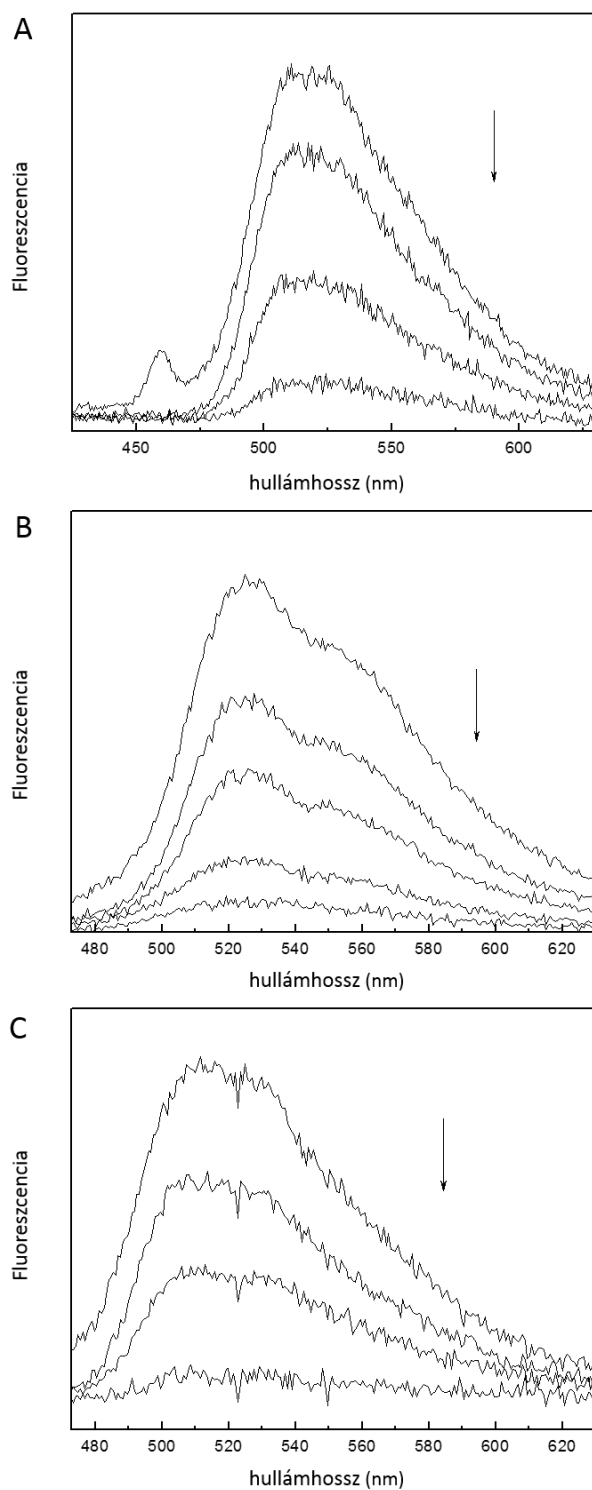
**32. ábra** A ábra: Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> (kék) és szabad FMN (piros) fluoreszcens lecsengése 455 nm-es gerjesztést követően ( $\lambda_{em} = 510$  nm). A válasz függvényt ( $\sim 1$  ns) feketével ábrázoltuk. B ábra: Emissziós maximum kinetikája ( $\lambda_{em} = 520$  nm) 390 nm-es gerjesztést követően AppA W64F sötét (kék) és világos állapota (piros), valamint a Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> (zöld) esetén. A válasz függvény  $\sim 1$  ps volt.

Ez az oldott flavinra jellemző, kb. 3.5 ns-os érték körül van, a FAD fluoreszcencia élettartamának a hosszabb komponense 3 ns körül van <sup>116</sup>, míg a vízben oldott szabad FMN-é 4.8 ns, lumiflaviné pedig 5.2 ns <sup>117,118</sup>. Ahogy az várható az AppA W64F FAD fluoreszcencia esetén, a sötét és világos állapotban is az alacsonyabb kvantum hatások miatt, melyek rendre 8.5% és 4.8%, egy lényegesen gyorsabb fluoreszcencia lecsengést figyelhetünk meg a négy mutációt tartalmazó fehérjéhez képest mind sötét, mind világos állapotban, valamint az Y21F/Y56F/W64F mutáns esetén is. (32. ábra és 4. táblázat)

Protein	A <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> (ps)	A <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> (ps)	R <sub>1</sub> (Å)	R <sub>2</sub> (Å)
W64F sötét	0.7	<b>500</b>	0.3	70	9.5	8.03
W64F világos	0.13	230	0.87	<b>11</b>	8.9	6.7
Y21F/Y56F/W64F	0.43	200	0.57	<b>36</b>	8.8	7.6

4. táblázat Flavinra jellemző fluoreszcencia lecsengés konstansok és az azokhoz köthető amplitúdók különféle AppA<sub>BLUF</sub> mutánsok esetén. A flavin-W104 távolságokat elektron-transzfer számolásokkal becsültük meg. A domináns járulékokat vastagon szedtük.

Az emissziós maximumon ( $\lambda_{max} = 520nm$ ) mért kinetikák az AppA W64F-re (sötét és világos állapot), valamint az AppA Y21F/Y56F/W64F-re vonatkozóan a 32. ábra B részén láthatóak, míg a 33. ábrán ugyanezeknek a mutánsoknak a tranziens pikoszekundumos fluoreszcencia spektrumait prezentáltuk.



**33. ábra** A ábra: Tranziens ps-os fluoreszcencia spektrum AppA W64F mutánsra, sötét állapotban 0.4 ps, 60 ps, 298 ps, 999 ps esetén valamint B ábra: világos állapotban 0.4 ps, 4.9 ps, 9.9 ps, 29.9

ps és 198 ps esetén végül C ábra: AppA Y21F/Y56F/W64F mutáns tekintetében 0.4 ps, 27.9 ps, 79.9 ps és 398 ps esetén.

A globális analízis a flavin kapcsán két domináns fluoreszcencia élettartamot talált (4. táblázat). A 7-aza-W104/W64F esetén a sötét állapotban jelen van egy  $\tau_{sötét} = 500$  ps-os lecsengési konstansú domináns fázis, amely körül-belül ötvenszer lassabb, mint a világos állapotú domináns fázis  $\tau_{sötét} = 11$  ps lecsengési konstansa. A világos állapot gyorsabb lecsengése arra utal, hogy a flavin gerjesztett állapotában kioltó hatás érvényesül, mégpedig a közeli aromás reziduumokról történő elektron transzfer miatt, mely reziduumoknak ezek alapján közelebb kell kerülniük a flavinhoz a sötét állapotú pozíciójukhoz képest.

A W104-es aminosavon kívül az összes többi elektrondonorától megfosztott Y21F/Y56F/W64F AppA mutáns esetében is megmértük a flavin fluoreszcencia élettartamát. Ekkor is jelentősen rövidült relaxációs időt figyeltünk meg a sötét állapotú AppA W64F idő konstansához képest, ami azt jelzi, hogy a triplamutánsban a triptofán közelebb van a flavinhoz az AppA W64F sötét állapotához képest és így effektív módon képes kioltani a flavin gerjesztett állapotát. Ez az eredmény összhangban van az anizotrópia mérésnél tapasztaltakkal és így arra utal, hogy a W104 mereven kötött pozícióban van a flavin közelében.

A fentiekből kifolyólag az AppA W64F világos állapotú fluoreszcens lecsengésének drasztikus gyorsulását a W104 flavinhoz való közeledésének tulajdonítjuk, emiatt világos állapotban fő kioltóként működhet. Emellett a W64F AppA<sub>BLUF</sub> (17. és 33./B ábrák) emissziós spektruma a világos állapotban elveszíti az ~500 nm körüli karakterisztikus rezgési vállát. A változásokat a fluoreszcencia csökkenése kíséri (17. ábra) és felerősödött elektron transzferre utalnak világos állapot esetén.

A Dutton-vonalzónak nevezett egyszerű empirikus kifejezés az alábbi módon írható fel <sup>119</sup>:

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6R - 3.1 \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{\lambda} \quad (59)$$

Ez a képlet összeköti az elektron transzfer sebességi állandóját ( $k_{ET}$ ) a reakció központok perem-perem távolságával, ahol R Å-ben van megadva. A Dutton-vonalzó segítségével igyekeztünk megbecsülni a flavin-triptofán távolságot a sötét ( $R_{sötét} = 9.5$  Å) és a világos ( $R_{világos} = 6.7$  Å)

állapot esetén, akadály mentes elektrontranszfert feltételezve ( $\Delta G = -\lambda$ ). A  $\Delta G$  a hajtóerő az elektron-transzfer számára a feltételezhetően világos állapotú W104-es elektron donor és a gerjesztett állapotú flavin között, a  $\lambda$  pedig a reorganizációs energiát fejezi ki.

A sötét és világos állapotú flavin-triptofán távolságra vonatkozó becslések az alábbiak:

$$\text{Sötét állapotú W64F: } k_{ET} = \frac{1}{504ps} = 1.98 \cdot 10^9 s^{-1} \text{ és } R_{sötét} = 9.5 \text{ \AA} \quad (60)$$

$$\text{Világos állapotú W64F: } k_{ET} = \frac{1}{11ps} = 90 \cdot 10^9 s^{-1} \text{ és } R_{világos} = 6.7 \text{ \AA} \quad (61)$$

A tripla mutáns (Y21F/Y56F/W64F) esetében, ahol mindkét tirozint és a W64 triptofánt lecseréltük, fotoinaktivációt figyeltünk meg, mivel nem történt vörös eltolódás kék fény hatására. Ez esetben úgy látszik a W104 világos állapotszerű állapotban rögzült, mivel a FAD fluoreszcencia lecsengése nagyon gyors. Érdekes, hogy a flavin két lecsengési fázisa hasonló hangsúllyal van jelen, ami arra utal, hogy a W104 két konformációban található meg a fehérjében a flavin kromofórhoz viszonyított távolsága alapján.

A Dutton vonalzó szerint a következő távolságokat becsültük: ( $R_{bent} = 7.6 \text{ \AA}$ )( $\tau = 36ps$ ) és ( $R_{kint} = 8.8 \text{ \AA}$ )( $\tau = 200ps$ ).

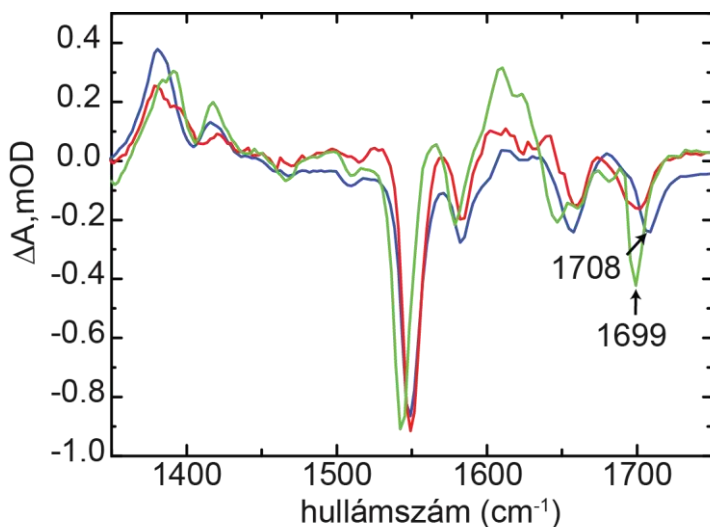
Y21FY56FW64F esete:

$$k_{ET1} = \frac{1}{200ps} = 5 \cdot 10^9 s^{-1} \text{ és } R = 8.85 \text{ \AA} \quad (62)$$

$$k_{ET2} = \frac{1}{36.5ps} = 27.4 \cdot 10^9 s^{-1} \text{ és } R = 7.6 \text{ \AA} \quad (63)$$

#### 4.9. Tranziens infravörös mérések

Az AppA<sub>BLUF</sub> protein kék fénnel történő megvilágításához kötődő dinamika tanulmányozása érdekében tranziens infravörös méréseket végeztünk a sötét és világos állapotokban az AppA<sub>BLUF</sub> W64F és az AppA<sub>BLUF</sub> Y21F/Y56F/W64F mutánsokon (34. ábra).



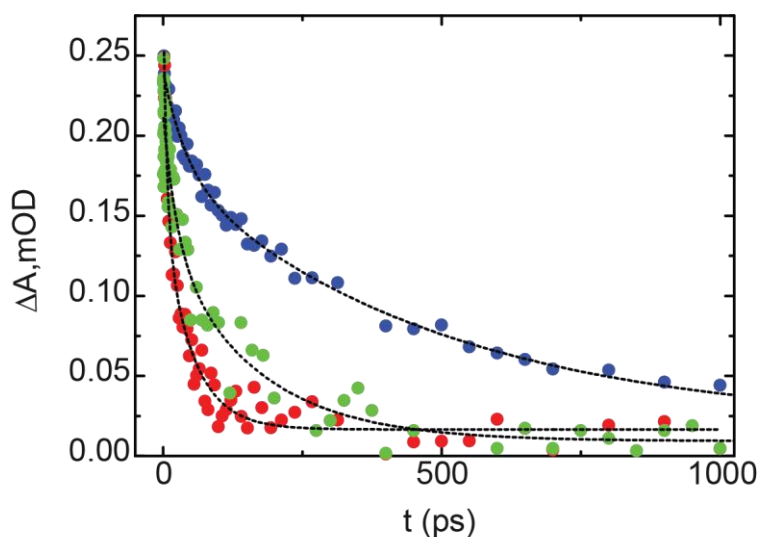
**34. ábra** A sötét (kék) és világos (piros) állapotú W64F és az Y21F/Y56F/W64F AppA (zöld) mutáns TRIR spektruma 10 ps-kor.

A tranziens infravörös spektrumok, melyeket a flavin 450 nm-en való gerjesztését követően eltelt 1 ps és 2 ns közé eső időintervallumon belül rögzítettünk, hasonlóak a vad típusú AppA<sub>BLUF</sub> spektrumához<sup>51,90</sup>. A felvett spektrum negatív tartományai, az úgynevezett kifehéredés komponensek (bleaching) összefüggésbe hozhatóak az alap állapotú populáció csökkenésével és a fehérje vibrációs spektrumában a fotoindukció generálta változásokkal. Az utóbbiakra vagy a direkt  $t = 0$  elektron gerjesztés vagy az azt követő strukturális dinamika miatt kerülhet sor. A pozitív tartományok a gerjesztett állapotú flavin vibrációihoz vagy a protein azon módusaihoz tartoznak, melyek eltolódnak a gerjesztés hatására vagy a gerjesztést követő termék képződéshez köthetőek. Az AppA<sub>BLUF</sub> esetében a flavoproteinek többségéhez hasonlóan négy domináns kifakulás figyelhető meg az 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  régióban: az 1547  $\text{cm}^{-1}$  és 1581  $\text{cm}^{-1}$  sávok az izoalloxazin gyűrű módusai miatt jelennek meg, míg a  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  és  $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$  sávok a FAD alapállapotában a C2=O és C4=O karbonil nyújtási módusaihoz köthetőek és érzékenyek a H-kötés rendszer alakulására<sup>51,120</sup>.

A W64F AppA mutáns sötét és világos állapotát jellemző spektrumok összehasonlítása  $\sim 9 \text{ cm}^{-1}$  lefelé tolódást mutatott a világos állapotban a C4=O karbonil sávnál. Ez hasonlít a WT AppA esetében megfigyelt eltolódáshoz és a C4=O-val újonnan kialakított hidrogén kötésnek

tulajdonítható. A mérés eredménye demonstrálja, hogy a W104 világos állapotában a rigid környezet a flavinnal létesített H-kötésnek köszönhető és alátámasztja a FRET méréseinket, melyek szerint a W104 közelebb van a flavinhoz világos állapotban.

Ez szintén összhangban van az anizotrópia lecsengés méréseinkkel, melyek lassabb rotációs korrelációs időt ( $\sim 11$  ns) mutatnak a W104 világos állapota esetén, annak rigidebb környezetét tükrözve. Az Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> esetén a C4=O karbonil csoporthoz köthető vibrációs módus ekkor is lefelé tolódott a sötét állapotú W64F AppA<sub>BLUF</sub>-hoz képest, ami a kötés megerősödésre utal. A 35. ábra az  $1380\text{ cm}^{-1}$ -en megfigyelt kinetikát mutatja, mely a flavin gerjesztett állapotának felel meg<sup>53</sup>.



**35. ábra** Gerjesztett állapotú flavin kinetika a sötét (kék) és világos (piros) állapotú W64F és az Y21F/Y56F/W64F AppA (zöld) mutánsok esetében  $1380\text{ cm}^{-1}$ -en.

Az 5. táblázatban levő kinetikák összhangban vannak a flavinon végzett pikoszekundumos fluoreszcens élettartam méréseinkkel, amelyek alapján a gerjesztett állapot lecsengése lassabb sötét- és gyorsabb világos állapot esetén, mely utóbbi hatékony kioltást jelez.



	$\tau_1$ (ps)	$\alpha_1$	$\tau_2$ (ps)	$\alpha_2$
Sötét W64F	41	0.27	482	0.73
Világos W64F	23	0.86	221	0.14
Y21F/Y56F/W64F	23	0.36	160	0.64

5. táblázat Lecsengési idő konstansok 1380 cm<sup>-1</sup>-en.

Az Y21F/Y56F/W64F kinetikája szintén gyorsabb relaxációt mutat az AppA<sub>BLUF</sub> W64F sötét állapotához képest, ami arra enged következtetni, hogy az ebben a mutánsban egyedüli elektrondonorként jelenlevő W104 mereven rögzített állapotban van a flavinhoz közelebbi pozícióban a sötét konformációhoz viszonyítva.

## 5. Diszkuszió

A BLUF-domént tartalmazó fotoreceptorok, úgymint az AppA, Slr1694, OaPAC, TePxD és BlrB <sup>109</sup> vizsgálata során a W104-es reziduum kitüntetett figyelemnek örvend, mivel a kristálystruktúrák alapján számos inkonzisztencia merült fel a sötét állapotú konformációjával és funkciójával kapcsolatban. Közismert, hogy a fehérjék röntgenkristallográfiás struktúrája csak azokról a konformációkról nyújt információt, melyek a kristályrács részét képezik, de ezek nem mindig relevánsak a funkció szempontjából.

Fluoreszcens spektroszkópiai módszereket, nevezetesen fluoreszcens anizotrópia lecsengés-, kioltás-, valamint Förster-féle energia transzfer méréseket végeztünk, hogy információt nyerhessünk a fotoaktiváció során mutatott W104 mobilitásról és a flavintól való távolságáról sötét és világos állapotban egyaránt. A FRET mérések alkalmával az akceptor fluoreszcencia intenzitásának változását figyeltük, mivel a donor oldalról nem volt lehetőség a FRET hatások mérésére, tekintve, hogy a flavin leválasztása fotoinaktívvá tette volna a fehérjét. Annak érdekében, hogy az akceptor érzékenyítés módszerével megvizsgálhassuk a FRET hatásfokot, először W64F/W104A mutánst készítettünk, melytől a 295 nm-en történő gerjesztéskor kizárólag az akceptortól származó fluoreszcencia megjelenését vártuk. Ezzel szemben 340 nm környékén erőteljes, nem várt fluoreszcencia jelet detektáltunk, annak ellenére, hogy a mutánsról hiányoztak a triptofánok. Ebből arra következtettünk, hogy jelentős fluoreszcencia származik az AppA<sub>BLUF</sub> tirozinátként jelen levő tirozinjaitól. Annak érdekében, hogy a triptofánok fluoreszcenciájával átfedő tirozinát emissziót kiiktassuk, az expresszió során 7-aza-triptofánt használtunk, melynek abszorpciós és fluoreszcens spektruma eltolódott a kanonikushoz képest. A W104 lecserélése a nem természetes 7-aza-triptofán aminosav reziduumra olyan mesterséges BLUF-domén fehérjét eredményezett, amely, azon túl, hogy funkcionálisan is aktív maradt, előnyös spektrális tulajdonságokkal rendelkezett. Mindez tiszta és jól elkülöníthető fluoreszcencia jelek detektálását tette lehetővé a számunkra a 104-es pozícióban 7-aza-triptofánt tartalmazó AppA<sub>BLUF</sub> anizotrópia lecsengésének vizsgálata során. A fluoreszcencia anizotrópia lecsengés mérések az előzetes feltételezéseinkhez képest nem várt eredményt mutattak: a 7-aza-triptofán esetében a sötét állapotra kapott gyors, közel 1 ns-os anizotrópia lecsengés a triptofán szabad mozgását tükrözi, mely azt sugalja, hogy nincs hidrogén kötésben a flavinnal, sem a

szomszédos glutaminnal (Q63). Ezzel szemben, a világos állapot során lassú forgást ( $\sim 11$  ns) figyeltünk meg, mely azt jelenti, hogy a triptofán együtt forog a fehérjével, valószínűleg a Q63-mal létesített „szoros” hidrogén kötésnek köszönhetően. Ezt a feltételezést erősítették meg az akrilamidok kioltó méréseink, melyek szerint a sötét állapotban hozzáférhetőbb a W104-es triptofán az akrilamid számára, hatékonyabban kioltva annak fluoreszcenciáját.

A W104-es triptofán 7-aza-triptofánra való módosítása a FRET mérések szempontjából is jelentőségteljes, annak pontossága érdekében. A FRET mérés „spektroszkópai vonalzóként” használható, amivel meghatározhatjuk a triptofán-flavin távolságot a sötét és a világos állapotok esetén. Az akceptor érzékenyítéssel becsült  $17.7 \text{ \AA}$ -ös távolság sötét állapot során összhangban van az AppA<sub>BLUF</sub> kristálystruktúrájának elemzéséből származó  $16 \text{ \AA}$ -ös, és a teljes hosszúságú fehérjéből kapott  $15.7 \text{ \AA}$ -ös távolsággal (3. táblázat). Kicsivel nagyobb  $20.5 \text{ \AA}$ -ös távolságot eredményeztek a fluoreszcencia élettartam mérések, feltehetőleg annak a bizonytalanságnak az okán, amely a 104-es pozícióban levő 7-aza-triptofán apoprotein élettartamának meghatározása során merült fel. A flavin hiányában a fehérje eltérő konformációt vehet fel, mint a jelenlétében, ami azonban módosult fluoreszcencia élettartamhoz vezethet, mivel a triptofán fluoreszcenciája nagyon érzékeny a fehérjestruktúra módosulásaira. A FRET mérések tanúsága szerint a triptofán sötét állapotban távolabb helyezkedik el a FAD-tól, mint a világos állapotban (3. táblázat). A FRET mérések alapján világos állapotra becsült FAD és W104 közötti  $8.3/9.5 \text{ \AA}$ -ös központ-központ távolságok összhangban vannak az elektron transzfer kioltási mérések során kapott  $6.7 \text{ \AA}$ -ös (perem-perem) értékkel. Ez megerősíti azt is, hogy a W104 világos állapotban elsődleges elektron donorként funkcionál a FAD\* számára .

A W104 FAD-tól mért távolságának és orientációjának fotoaktivációhoz kapcsolódó módosulása korábbi fluoreszcencia és tranziens abszorpciós spektroszkópia mérések alkalmával is megjelent. A korábbi, sötét állapotú AppA<sub>BLUF</sub>-on végzett fluoreszcencia élettartam mérések  $600 \text{ ps}^{54}$  körüli eredményt szolgáltatottak, összhangban a méréseinkkel (4. táblázat). A világos állapotban egy tizeddel kisebb értéket mutat (4. táblázat), amely azt sugallja, hogy a flavin fluoreszcenciája feltehetőleg egy közeli triptofán erős kioltó hatásának van kitéve, ami alátámasztani látszik a triptofán megváltozott, flavin molekulához közelebbi pozícióját.

A látható és infravörös tranziens abszorpciós mérésekből származó eredmények szintén korrelálnak a fent említettekkel. Ezek alapján a világos állapotban flavin és triptofán gyök keletkezik, ami azonban nincs jelen a sötét állapotban<sup>53,116</sup>. Ez összhangban van a következtetésünkkel, miszerint a sötét állapotban a triptofán nem tölt be jelentős kioltó szerepet. A megfigyeléseink egy egyszerű mechanisztikus modellel magyarázhatóak: a világos állapotban egy közeli triptofánról történő elektronátadásnak köszönhetően flavin gyök keletkezik, miközben a triptofán a flavin fluoreszcenciáját kioltja. Az elektron transzfer számításokból származó távolságok összhangban vannak a FRET mérésekből kapott távolságokkal, ami alátámasztja a triptofánról történő elektron transzfer elméletét.

Ezt erősíti továbbá a gerjesztett állapot erős kioltása, amelyet Y21F/Y56F/W64F mutáns esetében figyeltünk meg, ahol az egyetlen lehetséges elektron donor a flavinhoz közeli (7.6 Å) állapotban levő W104 volt. Ezen a mutánson végzett fluoreszcencia anizotrópia mérések hasonló rotációs korrelációs időket mutatnak (31. ábra), mint amiket világos esetben mértünk, ami azt mutatja, hogy feltehetőleg a hidrogén kötés részeként, zártan helyezkedik el a triptofán a világos-szerű állapotban.

A világos állapotú W64F, valamint Y21FY56FW64F mutánsokon mért TRIR adatok a C4=O karbonil frekvenciájának lefelé tolódását jelzik, ami azzal az Iwata és társai<sup>121</sup> által javasolt modellel magyarázható, mely hidrogén kötés feltételez a Q63 enol alakja, valamint a W104-es triptofán között.

Mindezek az észrevételek összhangban vannak a szakirodalomban megtalálható számításokkal, melyek az elektron transzfer szempontjából a W104 flavinhoz közeli pozíciójának kedvező voltát igazolják, megerősítve, hogy a W104-ről való elektron átadás a domináns abban az esetben, amikor a szükséges hidrogén kötés rendszer hiánya akadályozza az Y21-ről történő elektron transzfert<sup>69</sup>.

## 6. Konklúziók

Az App<sub>ABLUF</sub> 104-es triptofánjának a fehérje fotoaktivációs folyamatában játszott szerepét és funkcionális dinamikáját számos technika alkalmazásával tanulmányoztuk, aminek során többek között a fehérjébe történő mesterséges aminosav beépítést, fluoreszcens módszerek széles körét és idő-felbontásos infra-vörös spektroszkópiát is alkalmaztunk. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérések és a W104-nek a mesterséges 7-aza-triptofán aminosavra való módosítása kvantitatív információt szolgáltatott a W104 pozíciójáról sötét és világos állapotokban. Világos stádiumban a W104 mobilitása korlátozottabb, mint a sötét állapotban, ami a megerősített H-kötés rendszer hatásának tulajdonítható. Erre a fluoreszcencia anizotrópia mérések során kapott hosszú rotációs korrelációs idők segítségével (~11 ns), valamint az infravörös mérések alkalmával tapasztalt C4=O karbonil csúcs alacsonyabb frekvenciák felé tolódásának rögzítésével derítettünk fényt. Ezekon felül az akrilamid kioltási mérések is amellett szólnak, hogy a sötét állapotban hozzáférhetőbb a W104. Ráadásul a világos állapotban a rövid flavin fluoreszcencia élettartamok hatásos elektron transzferre utalnak, ami a kromofórhoz közeli elhelyezkedésű W104-ről zajlik a gerjesztett állapotú flavin irányába. Összességében a tanulmányunkban megvizsgáltuk az AppA fotociklusa során a 104-es triptofán pozíciójával kapcsolatban felmerült korábbi ellentmondásokat. Konklúzióink azt a modellt támogatják, amely szerint a világos állapotban a W104 közelebb van a flavinhoz, mint a sötét állapotban, mely utóbbi esetben attól elfele mutat és kevésbé zárt környezetben van.

### **Az alábbi pontokban a munkám fő eredményeit emelem ki .**

- 1) AppA-ban található FAD kromofór és a 104-es triptofán közötti FRET vizsgálata során végzett steady state fluoreszcencia méréseink rávilágítottak arra, hogy az AppA 104-es triptofánjának tanulmányozásához nem elegendő a W64F mutáció, mivel a méréseket a fehérjében található más fluorofórok jelenléte is befolyásolja.
- 2) Az abszorpciós pH függő méréseink kimutatták, hogy az 1-es pontban említett fluoreszcens jel tirozináttól származik. A méréseink rávilágítottak arra, hogy a fehérjében lévő tirozin a szabad tirozinhoz képest alacsonyabb pK értékkel rendelkezik, ezért alakul át tirozináttá.

- 3) Az 1-es pontban felmerült nehézséget 7-aza-triptofán analóg alkalmazásával oldottuk meg. Az analóg használatának előnye, hogy a többi fluorofórtól elkülönülten vizsgálhatóak spektroszkópiai tulajdonságai.
- 4) A fentieket figyelembe véve, a következő pontokban jelölt méréseinkkel igazoltuk, hogy a fotoaktivált állapotban lévő 104-es triptofán a FAD felé fordulva, ahhoz közelebb helyezkedik el a sötét állapothoz képest.
- 5) Az élettartam mérések eredményeit felhasználva számolt FRET hatásfokok alapján a FAD és a 104-es triptofán távolsága sötét állapotban 20.5 Å –nek, míg világos állapotban 9.5 Å –nek adódott.
- 6) Steady state FRET méréseket végeztünk az akceptor érzékenyítés módszerét használva, melyek során a FAD és a 104-es triptofán távolságára sötét állapotban 17.7 Å-öt , világos állapotban pedig 8.3 Å-öt kaptunk.
- 7) Akrilamid kioltási mérésekkel igazoltuk, hogy a W104 sötét állapotban hozzáférhetőbb az akrilamid számára a világos állapothoz viszonyítva, mely alátámasztja, hogy fotoaktivált állapotban a 104-es triptofán a fehérje felé irányul.
- 8) Az anizotrópia mérések igazolták, hogy a W104 világos állapotban rigidebb, mivel a fehérjéhez közelebbi, zártabb állapotban van a sötét állapothoz képest.
- 9) Az AppA flavinján történt ultragyors élettartam mérésekkel megerősítettük, hogy a fehérje fotoaktivált FAD kromofórja a hozzá a sötét állapothoz képest közelebb elhelyezkedő 104-es triptofán révén elektron transzfert követően gyorsabban relaxálódik.
- 10) Tranziens infravörös méréseink megerősítették, hogy a fotoaktiváció során a FAD a sötét állapothoz képest közelebb kerülő W104-el hidrogén kötést létesít.

## 7. Referenciák

1. Van Der Horst, M. A. & Hellingwerf, K. J. Photoreceptor Proteins, 'Star Actors of Modern Times': A Review of the Functional Dynamics in the Structure of Representative Members of Six Different Photoreceptor Families. *Acc. Chem. Res.* (2004) doi:10.1021/ar020219d.
2. Heijde, M. & Ulm, R. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science* (2012) doi:10.1016/j.tplants.2012.01.007.
3. Masuda, S. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* (2013) doi:10.1093/pcp/pcs173.
4. MacHeroux, P., Kappes, B. & Ealick, S. E. Flavogenomics - A genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS Journal* (2011) doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08202.x.
5. Losi, A. & Gärtner, W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: Flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochemistry and Photobiology* (2011) doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00913.x.
6. Conrad, K. S., Manahan, C. C. & Crane, B. R. Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nature Chemical Biology* (2014) doi:10.1038/nchembio.1633.
7. Karadi, K. *et al.* Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy. *Sci. Rep.* (2020) doi:10.1038/s41598-020-59073-5.
8. Chaves, I. *et al.* Functional Evolution of the Photolyase/Cryptochrome Protein Family: Importance of the C Terminus of Mammalian CRY1 for Circadian Core Oscillator Performance. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 1743–1753 (2006).
9. Sancar, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* (2003) doi:10.1021/cr0204348.
10. Gressel, J. Yearly review: Blue light photoreception. *Photochem. Photobiol.* **30**, 749–754

- (1979).
11. Ahmad, M. & Cashmore, A. R. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* (1993) doi:10.1038/366162a0.
  12. Batschauer, A. A plant gene for photolyase: An enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J.* (1993) doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04040705.x.
  13. Hsu, D. S. *et al.* Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* (1996) doi:10.1021/bi962209o.
  14. Todo, T. *et al.* Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* (80-. ). (1996) doi:10.1126/science.272.5258.109.
  15. Adams, M. D. *et al.* Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* (1995).
  16. Van Der Spek, P. J. *et al.* Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* (1996) doi:10.1006/geno.1996.0539.
  17. Lin, C. *et al.* Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* (80-. ). (1995) doi:10.1126/science.7638620.
  18. Sancar, A. *et al.* Photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors use light energy to repair DNA or set the circadian clock. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (2000). doi:10.1101/sqb.2000.65.157.
  19. Sancar, A. Cryptochrome: The Second Photoactive Pigment in the Eye and Its Role in Circadian Photoreception. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 31–67 (2000).
  20. Kavakli, I. H. Circadian Photoreception in Humans and Mice. *Mol. Interv.* **2**, 484–492 (2002).
  21. Thompson, C., Oncogene, A. S.- & 2002, undefined. Photolyase/cryptochrome blue-light



photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock.  
*nature.com*.

22. Chaves, I. *et al.* The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* (2011) doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103759.
23. 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).
24. Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. & Liu, D. Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* (1999) doi:10.1126/science.284.5415.760.
25. Lukacs, A., Eker, A. P. M., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. H. Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J. Am. Chem. Soc.* (2008) doi:10.1021/ja805261m.
26. Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. M. & Brettel, K. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* (2000) doi:10.1038/35014644.
27. Herrou, J. & Crosson, S. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology* (2011) doi:10.1038/nrmicro2622.
28. Losi, A. & Gärtner, W. The Evolution of Flavin-Binding Photoreceptors: An Ancient Chromophore Serving Trendy Blue-Light Sensors. *Annu. Rev. Plant Biol.* (2012) doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105538.
29. Losi, A. LOV Proteins: Photobiophysics. in *Encyclopedia of Biophysics* (ed. Roberts, G. C. K.) 1312–1316 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-16712-6\_800.
30. Raffelberg, S., Mansurova, M., Gärtner, W. & Losi, A. Modulation of the photocycle of a LOV domain photoreceptor by the hydrogen-bonding network. *J. Am. Chem. Soc.* (2011) doi:10.1021/ja1097379.
31. Zoltowski, B. D. & Gardner, K. H. Tripping the light fantastic: Blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions. *Biochemistry*

- (2011) doi:10.1021/bi101665s.
32. Wu, Y. I. *et al.* A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* (2009) doi:10.1038/nature08241.
  33. Losi, A. & Gärtner, W. Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. in *Photochemical and Photobiological Sciences* (2008). doi:10.1039/b802472c.
  34. Masuda, S. & Bauer, C. E. AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* (2002) doi:10.1016/S0092-8674(02)00876-0.
  35. Brust, R. *et al.* Proteins in action: Femtosecond to millisecond structural dynamics of a photoactive flavoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* (2013) doi:10.1021/ja407265p.
  36. Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* (2002) doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03058.x.
  37. Iseki, M. *et al.* A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* (2002) doi:10.1038/4151047a.
  38. Zeilstra-Ryalls, J. H. & Kaplan, S. Oxygen intervention in the regulation of gene expression: The photosynthetic bacterial paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2004) doi:10.1007/s00018-003-3242-1.
  39. Giraud, E. & Verméglio, A. Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* (2008) doi:10.1007/s11120-008-9323-0.
  40. Shimada, H., Iba, K. & Takamiya, K. Blue-light irradiation reduces the expression of puf and puc operons of *Rhodobacter sphaeroides* under semi-aerobic conditions. *Plant Cell Physiol.* (1992).
  41. 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.* (1995) doi:10.1128/jb.177.16.4609-4618.1995.

42. Gomelsky, M. & Kaplan, S. Appa, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel FAD binding domain. *J. Biol. Chem.* (1998) doi:10.1074/jbc.273.52.35319.
43. Yoshihara, S. & Ikeuchi, M. Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2004) doi:10.1039/b402320j.
44. Moon, Y. J. *et al.* The role of cyanopterin in UV/blue light signal transduction of cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 phototaxis. *Plant Cell Physiol.* (2010) doi:10.1093/pcp/pcq059.
45. Masuda, S. & Ono, T. A. Biochemical characterization of the major adenylyl cyclase, Cya1, in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* (2004) doi:10.1016/j.febslet.2004.09.086.
46. Okajima, K. *et al.* Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J. Biochem.* (2005) doi:10.1093/jb/mvi089.
47. Sato, S. *et al.* A large-scale protein-protein interaction analysis in *synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res.* (2007) doi:10.1093/dnares/dsm021.
48. Yuan, H. & Bauer, C. E. PixE promotes dark oligomerization of the BLUF photoreceptor PixD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008) doi:10.1073/pnas.0802149105.
49. Tanaka, K. *et al.* Light-induced conformational change and transient dissociation reaction of the BLUF photoreceptor *synechocystis* PixD (Slr1694). *J. Mol. Biol.* (2011) doi:10.1016/j.jmb.2011.04.032.
50. Masuda, S., Hasegawa, K., Ohta, H. & Ono, T. A. Crucial role in light signal transduction for the conserved Met93 of the BLUF protein PixD/Slr1694. *Plant Cell Physiol.* (2008) doi:10.1093/pcp/pcn132.
51. Haigney, A. *et al.* Ultrafast infrared spectroscopy of an isotope-labeled photoactivatable flavoprotein. *Biochemistry* (2011) doi:10.1021/bi101589a.
52. Masuda, S., Hasegawa, K. & Ono, T. A. 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* (2005) doi:10.1021/bi047876t.
53. Lukacs, A. *et al.* BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J. Am. Chem. Soc.* (2014) doi:10.1021/ja4121082.
  54. Gauden, M. *et al.* Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* (2005) doi:10.1021/bi047359a.
  55. Unno, M., Masuda, S., Ono, T. A. & Yamauchi, S. Orientation of a key glutamine residue in the BLUF domain from AppA revealed by mutagenesis, spectroscopy, and quantum chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* (2006) doi:10.1021/ja060633z.
  56. Obanayama, K., Kobayashi, H., Fukushima, K. & Sakurai, M. Structures of the chromophore binding sites in BLUF domains as studied by molecular dynamics and quantum chemical calculations. in *Photochemistry and Photobiology* (2008). doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00351.x.
  57. Masuda, S., Hasegawa, K. & Ono, T. A. Tryptophan at position 104 is involved in transforming light signal into changes of  $\beta$ -sheet structure for the signaling state in the BLUF domain of AppA. *Plant Cell Physiol.* (2005) doi:10.1093/pcp/pci208.
  58. Masuda, S., Tomida, Y., Ohta, H. & Takamiya, K. ichiro. 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.* (2007) doi:10.1016/j.jmb.2007.02.087.
  59. Laan, W. *et al.* On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochemistry* (2006) doi:10.1021/bi051367p.
  60. Dragnea, V., Arunkumar, A. I., Hua, Y., Giedroc, D. P. & Bauer, C. E. Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: Addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state. *Biochemistry* (2009) doi:10.1021/bi9009067.
  61. Anderson, S. *et al.* Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from

- Rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry* (2005) doi:10.1021/bi0502691.
62. 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.* (2006) doi:10.1016/j.jmb.2006.07.024.
  63. Kita, A., Okajima, K., Morimoto, Y., Ikeuchi, M. & Miki, K. Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tll0078, containing a novel fad-binding blue light sensor domain. *J. Mol. Biol.* (2005) doi:10.1016/j.jmb.2005.03.067.
  64. Yuan, H. *et al.* Crystal structures of the Synechocystis photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry* (2006) doi:10.1021/bi061435n.
  65. Jung, A. *et al.* Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0500722102.
  66. Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2016) doi:10.1073/pnas.1517520113.
  67. Udvarhelyi, A. & Domratcheva, T. Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: A mechanistic reappraisal. *J. Phys. Chem. B* (2013) doi:10.1021/jp400437x.
  68. Collette, F., Renger, T. & Schmidt Am Busch, M. Revealing the functional states in the active site of BLUF photoreceptors from electrochromic shift calculations. *J. Phys. Chem. B* (2014) doi:10.1021/jp506400y.
  69. Goyal, P. & Hammes-Schiffer, S. Role of active site conformational changes in photocycle activation of the AppA BLUF photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017) doi:10.1073/pnas.1621393114.
  70. Grinstead, J. S. *et al.* The solution structure of the AppA BLUF domain: Insight into the mechanism of light-induced signaling. *ChemBioChem* (2006)

doi:10.1002/cbic.200500270.

71. Unno, M., Kikuchi, S. & Masuda, S. Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance raman spectroscopy. *Biophys. J.* (2010) doi:10.1016/j.bpj.2010.01.007.
72. Toh, K. C. *et al.* On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the AppA BLUF domain. *Biophys. J.* (2008) doi:10.1529/biophysj.107.117788.
73. Jablonski diagram including vibrational levels for absorbance, non-radiative decay, and fluorescence. [https://en.wikipedia.org/wiki/Jablonski\\_diagram](https://en.wikipedia.org/wiki/Jablonski_diagram).
74. Schematic diagramme of a double beam absorption photometer. <https://seos-project.eu/earthspectra/earthspectra-c04-p06.nl.html>.
75. Simplified diagram of a spectrofluorometer. <https://www.edinst.com/blog/what-is-a-spectrometer/>.
76. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
77. Becker, W. The bh TCSPC Handbook. *Scanning* 1–566 (2010).
78. Principle of time-correlated single photon counting (TCSPC). The photons are represented by pulses of the output from a constant fraction discriminator. [https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0013\\_maroti\\_lasers\\_in\\_biophysics/72\\_timeresolution\\_of\\_fluorescence.scoml](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0013_maroti_lasers_in_biophysics/72_timeresolution_of_fluorescence.scoml).
79. Dijkstra, D. S., Broos, J., Visser, A. J. W. G., Van Hoek, A. & Robillard, G. T. Dynamic fluorescence spectroscopy on single tryptophan mutants of EII(mtl) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochemistry* (1997) doi:10.1021/bi9629081.
80. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* (1948) doi:10.1002/andp.19484370105.

81. Okamoto, K. & Sako, Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* (2017) doi:10.1016/j.sbi.2017.03.010.
82. Stryer, L. & Haugland, R. P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1967) doi:10.1073/pnas.58.2.719.
83. Alexander Ross, J. B., Rusinova, E., Luck, L. A. & Rousslang, K. W. Spectral Enhancement of Proteins by in vivo Incorporation of Tryptophan Analogues. in *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (2005). doi:10.1007/0-306-47102-7\_2.
84. Valeur, B. *Molecular Fluorescence - Principles and Applications. Methods* (2001). doi:10.1002/3527600248.
85. Blue excitation light intensity is gradually diminished due to sample absorption outside the measurement volume. Red emission light is diminished due to reabsorption of emitted fluorescent light. [https://www.horiba.com/en\\_en/technology/measurement-and-control-techniques/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/what-is-an-excitation-emission-matrix-eem/](https://www.horiba.com/en_en/technology/measurement-and-control-techniques/spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/what-is-an-excitation-emission-matrix-eem/).
86. Paz, Y. Transient IR spectroscopy as a tool for studying photocatalytic materials. *J. Phys. Condens. Matter* (2019) doi:10.1088/1361-648X/ab3eda.
87. Laptенок, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A. & Vos, M. H. Subpicosecond kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol. Biol.* (2014) doi:10.1007/978-1-62703-649-8\_13.
88. Buday, L., Nyitray, L. & Perczel, A. *Ezerarcú fehérvék.* (Simmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, 2018).
89. Van Stokkum, I. H. M., Larsen, D. S. & Van Grondelle, R. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (2004) doi:10.1016/j.bbabi.2004.04.011.
90. 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.* (2011) doi:10.1021/ja2060098.

91. Broos, J. Biosynthetic incorporation of tryptophan analogs in proteins. *Methods Mol. Biol.* (2014) doi:10.1007/978-1-62703-649-8\_15.
92. Arzhantsev, S. & Maroncelli, M. Design and characterization of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical Kerr gating. *Appl. Spectrosc.* (2005) doi:10.1366/0003702053085007.
93. Schmidt, B., Laimgruber, S., Zinth, W. & Gilch, P. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* (2003) doi:10.1007/s00340-003-1230-7.
94. Snellenburg, J. J., Laptanok, S., Seger, R., Mullen, K. M. & van Stokkum, I. H. M. Glotaran: A Java-based graphical user interface for the R package TIMP. *J. Stat. Softw.* (2012) doi:10.18637/jss.v049.i03.
95. Greetham, G. M. *et al.* ULTRA: A unique instrument for time-resolved spectroscopy. in *Applied Spectroscopy* (2010). doi:10.1366/000370210793561673.
96. Antosiewicz, J. M. & Shugar, D. UV–Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 1: basic principles and properties of tyrosine chromophore. *Biophysical Reviews* (2016) doi:10.1007/s12551-016-0198-6.
97. Maeno, A., Matsuo, H. & Akasaka, K. Tyrosine/tyrosinate fluorescence at 700 MPa: A pressure unfolding study of chicken ovomucoid at pH 12. *Biophys. Chem.* **183**, 57–63 (2013).
98. MARTIN, R. B., EDSALL, J. T., WETLAUFER, D. B. & HOLLINGWORTH, B. R. A complete ionization scheme for tyrosine, and the ionization constants of some tyrosine derivatives. *J. Biol. Chem.* (1958).
99. 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.* (1978) doi:10.1016/0014-5793(78)80948-X.
100. Prendergast, F. G., Hampton, P. D. & Jones, B. Characteristics of Tyrosinate Fluorescence



- Emission in  $\alpha$ - and  $\beta$ -Purothionins. *Biochemistry* (1984) doi:10.1021/bi00321a063.
101. Pundak, S. & Roche, R. S. Tyrosine and Tyrosinate Fluorescence of Bovine Testes Calmodulin: Calcium and pH Dependence. *Biochemistry* (1984) doi:10.1021/bi00302a032.
  102. Alexander Ross, J. B., Laws, W. R., Rousslang, K. W. & Wyssbrod, H. R. Tyrosine Fluorescence and Phosphorescence from Proteins and Polypeptides. in *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/0-306-47059-4\_1.
  103. Oktaviani, N. A. *et al.* Comprehensive determination of protein tyrosine pK<sub>a</sub> values for photoactive yellow protein using indirect <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biophys. J.* (2012) doi:10.1016/j.bpj.2011.12.024.
  104. Schlesinger, S. & Schlesinger, M. J. The effect of amino acid analogues on alkaline phosphatase formation in Escherichia coli K-12. I. Substitution of triazolealanine for histidine. *J. Biol. Chem.* (1967).
  105. Twine, S. M. & Szabo, A. G. Fluorescent amino acid analogs. *Methods Enzymol.* (2003) doi:10.1016/S0076-6879(03)60108-4.
  106. Albani, J. R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins. *J. Fluoresc.* (2014) doi:10.1007/s10895-013-1274-y.
  107. Kraft, B. J. *et al.* Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: A novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. *Biochemistry* (2003) doi:10.1021/bi030055o.
  108. Laan, W., van der Horst, M. A., van Stokkum, I. H. & Hellingwerf, K. J. Initial Characterization of the Primary Photochemistry of AppA, a Blue-light–using Flavin Adenine Dinucleotide–domain Containing Transcriptional Antirepressor Protein from Rhodospirillum rubrum: A Key Role for Reversible Intramolecular Proton Transfer. *Photochem. Photobiol.* (2003) doi:10.1562/0031-8655(2003)078<0290:icotpp>2.0.co;2.
  109. Ohki, M. *et al.* Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate

- cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017) doi:10.1073/pnas.1704391114.
110. Winkler, A. *et al.* A ternary AppA-PpsR-DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2013) doi:10.1038/nsmb.2597.
111. Nag, L., Lukacs, A. & Vos, M. H. Short-Lived Radical Intermediates in the Photochemistry of Glucose Oxidase. *ChemPhysChem* (2019) doi:10.1002/cphc.201900329.
112. Liu, Z. *et al.* Determining complete electron flow in the cofactor photoreduction of oxidized photolyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1311073110.
113. Malaga, N. *et al.* Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace. *J. Phys. Chem. B* (2000) doi:10.1021/jp002145y.
114. Laptенок, S. P. *et al.* Ultrafast real-time visualization of active site flexibility of flavoenzyme thymidylate synthase ThyX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1218729110.
115. Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y. & Tanaka, F. Ultrafast fluorescence quenching dynamics of flavin chromophores in protein nanospace. *J. Phys. Chem. B* (1998) doi:10.1021/jp982583t.
116. Brazard, J. *et al.* New insights into the ultrafast photophysics of oxidized and reduced fad in solution. *J. Phys. Chem. A* (2011) doi:10.1021/jp110741y.
117. LEENDERS, R., VAN HOEK, A., VAN IERSEL, M., VEEGER, C. & VISSER, A. J. W. G. Flavin dynamics in oxidized *Clostridium beijerinckii* flavodoxin as assessed by time-resolved polarized fluorescence. *Eur. J. Biochem.* (1993) doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18456.x.
118. Leenders, H. R. M., Vervoort, J., van Hoek, A. & Visser, A. J. W. G. Time-resolved fluorescence studies of flavodoxin. Fluorescence decay and fluorescence anisotropy decay of tryptophan in *Desulfovibrio* flavodoxins. *Eur. Biophys. J.* (1990) doi:10.1007/BF00185419.

119. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. & Dutton, P. L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* (1999) doi:10.1038/46972.
120. Haigney, A. *et al.* Vibrational assignment of the ultrafast infrared spectrum of the photoactivatable flavoprotein AppA. *J. Phys. Chem. B* (2012) doi:10.1021/jp305220m.
121. Iwata, T. *et al.* Hydrogen Bonding Environments in the Photocycle Process around the Flavin Chromophore of the AppA-BLUF domain. *J. Am. Chem. Soc.* (2018) doi:10.1021/jacs.8b05123.

## 8. Publikációk

### *Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemény*

1.

Karadi, Kristof ; M. Kapetanaki, Sofia ; Raics, Katalin ; Pecs, Ildiko ; Kapronczai, Robert ; Fekete, Zsuzsanna ; Iuliano, James ; Tolentino Collado, Jinnette ; Gil, Agnieszka ; Orban, Jozsef et al.

Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy

SCIENTIFIC REPORTS 10 Paper: 2061 , 15 p. (2020)

IF: 3,998

### *Az értekezés alapjául szolgáló saját poszterek, előadások*

1.

Karádi, Kristóf Kálmán ; Kapronczai, Róbert ; Pirisi, Katalin ; Lukács, András

Fotoindukált elektron transzfer vizsgálata flavinokban fluoreszcencia és tranziens abszorpciós spektroszkópiai módszerekkel

In: 46. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg

(2016) pp. 69-69. , 1 p.

2.

Kapronczai, Róbert ; Szekeres, Gábor ; Karádi, Kristóf ; Grama, László ; Lukács, András

Az AppA fotociklusának vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel

In: 46. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg

(2016) p. 68

3.

Kapronczai, Róbert ; Karádi, Kristóf ; Pirisi, Katalin ; Lukács, András

Functional dynamics of the key tryptophan in AppA revealed by fluorescence spectroscopy

In: Ács, Kamilla; Bencze, Noémi; Bódog, Ferenc; Ha<sup>2</sup>ner, Tamás; Hegyi, Dávid; Horváth, Orsolya Melinda; Hüber, Gabriella Margit; Kovács, Áron; Kis Kelemen, Bence; Lajkó, Adrienn; Schilli, Gabriella Krisztina; Szendi, Anna; Szilágyi, Tamás Gábor; Varga, Zoltán (szerk.) Book of Abstracts = Absztraktkötet : V. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia

Pécs, Magyarország : Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, (2016) p. 173

4.

KAPRONCZAI, RÓBERT ; PASITKA, JONATÁN ; KARÁDI, KRISTÓF ; SZEKERES, GÁBOR ; GRAMA, LÁSZLÓ ; NYITRAI, MIKLÓS ; LUKÁCS, ANDRÁS

Tirozinát fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata az AppA nevű fotoaktív fehérjében

In: Zimányi, László (szerk.) A Magyar Biofizikai Társaság XXVI. Kongresszusa : Szeged, 2017.

augusztus 22-25.

Szeged, Magyarország : Magyar Biofizikai Társaság, (2017) pp. 81-81. Paper: P27 , 1 p.

5.

Kapronczai, Róbert ; Karádi, Kristóf ; Pécsi, Ildikó ; Grama, László ; Lukács, András

AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) segítségével

In: 48. Membrán-Transzport Konferencia

(2018) Paper: 31 , 1 p.

6.

Karádi, Kristóf ; Kapronczai, Róbert ; Sofia, Kapetanaki ; Pécsi, Ildikó ; Fekete, Zsuzsanna ; Lukács,András

AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata triptofán-analógot tartalmazó mutáns on végzett fluoreszcencia spektroszkópiai eljárások segítségével

In: 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17

(2019) Paper: 30 , 1 p.

A következőben csatoltam az értekezés alapjául szolgáló közleményt.

OPEN

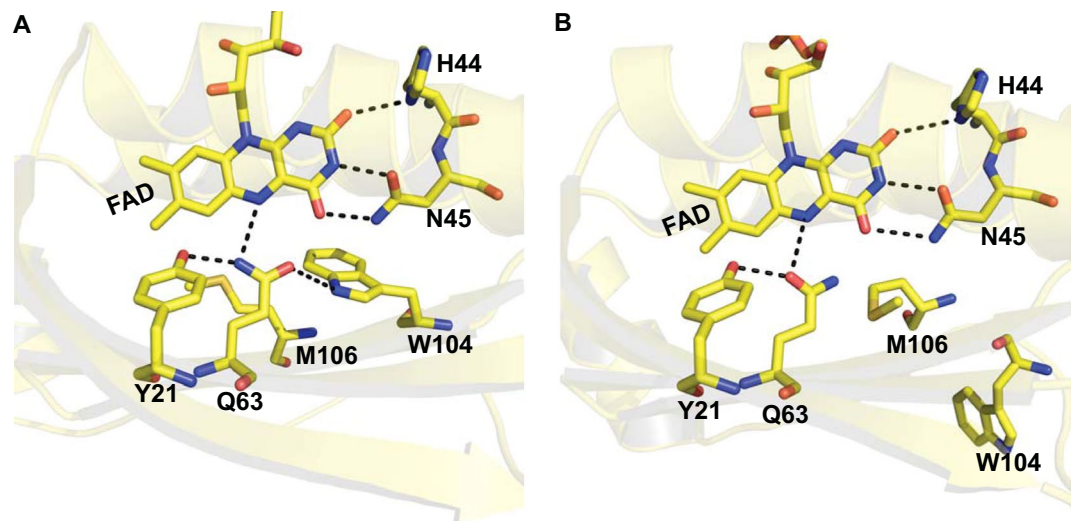
# Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy

Kristof Karadi<sup>1,2</sup>, Sofia M. Kapetanaki<sup>1,2</sup>, Katalin Raics<sup>1</sup>, Ildiko Pecszi<sup>1</sup>, Robert Kapronczai<sup>1</sup>, Zsuzsanna Fekete<sup>1</sup>, James N. Iuliano<sup>3</sup>, Jinnette Tolentino Collado<sup>3</sup>, Agnieszka A. Gil<sup>3</sup>, Jozsef Orban<sup>1</sup>, Miklos Nyitrai<sup>1,2</sup>, Greg M. Greetham<sup>4</sup>, Marten H. Vos<sup>5</sup>, Peter J. Tonge<sup>3</sup>, Stephen R. Meech<sup>6</sup> & Andras Lukacs<sup>1,2\*</sup>

Blue Light Using Flavin (BLUF) domains are increasingly being adopted for use in optogenetic constructs. Despite this, much remains to be resolved on the mechanism of their activation. The advent of unnatural amino acid mutagenesis opens up a new toolbox for the study of protein structural dynamics. The tryptophan analogue, 7-aza-Trp (7AW) was incorporated in the BLUF domain of the Activation of Photopigment and pucA (AppA) photoreceptor in order to investigate the functional dynamics of the crucial W104 residue during photoactivation of the protein. The 7-aza modification to Trp makes selective excitation possible using 310 nm excitation and 380 nm emission, separating the signals of interest from other Trp and Tyr residues. We used Förster energy transfer (FRET) between 7AW and the flavin to estimate the distance between Trp and flavin in both the light- and dark-adapted states in solution. Nanosecond fluorescence anisotropy decay and picosecond fluorescence lifetime measurements for the flavin revealed a rather dynamic picture for the tryptophan residue. In the dark-adapted state, the major population of W104 is pointing away from the flavin and can move freely, in contrast to previous results reported in the literature. Upon blue-light excitation, the dominant tryptophan population is reorganized, moves closer to the flavin occupying a rigidly bound state participating in the hydrogen-bond network around the flavin molecule.

Flavins are found in more than 370 enzymes<sup>1</sup> but only a few of them are photoactive<sup>2,3</sup>. Three major families of photoreceptors which utilize flavin as a cofactor and whose functions are triggered by absorption of light are the photolyase/cryptochromes, the light oxygen voltage (LOV) domains and the blue light sensors using flavin (BLUF) proteins. Their photochemistry, though is rather diverse. In photolyases and cryptochromes, FAD (flavin adenine dinucleotide) is reduced via electron transfer through a tryptophan triad<sup>4–6</sup>. Photolyases use light to repair UV-damaged DNA<sup>7</sup> whereas the proposed functions of cryptochromes range from setting the circadian clock in insects to sensing the weak magnetic field of Earth in migrating birds<sup>6</sup>. In the LOV domains, the flavin cofactor is excited to a triplet state upon blue light absorption, followed by formation of a signalling state, characterized by a covalent bond between the flavin and a nearby cysteine residue, leading to the enhancement of the phototropin kinase activity<sup>3</sup>. In BLUF domains, blue light excitation results in a signalling state (light-adapted state) that is characterized by a reorganization of the hydrogen bond network around FAD and the Tyr-Gln-Trp (Met) tetrad (Fig. 1). This is revealed by a characteristic 10–15 nm red-shift of the first  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition and a 20  $\text{cm}^{-1}$  downshift of the flavin C4=O stretching vibration compared to the dark-adapted state<sup>8,9</sup>. In AppA<sub>BLUF</sub> site directed mutagenesis has shown that Y21 and Q63 play a crucial role during photoactivation as the red shift upon illumination disappears if one of these residues is replaced<sup>8–12</sup>. A strong and specific chemical coupling

<sup>1</sup>Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, 7624, Pécs, Hungary. <sup>2</sup>Szentagotthai Research Center, University of Pécs, 7624, Pécs, Hungary. <sup>3</sup>Department of Chemistry, Stony Brook University, Stony Brook, NY, 11794-3400, USA. <sup>4</sup>Central Laser Facility, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK. <sup>5</sup>LOB, CNRS, INSERM, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, 91128, Palaiseau, Cedex, France. <sup>6</sup>School of Chemistry, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ, UK. \*email: [andras.lukacs@aok.pte.hu](mailto:andras.lukacs@aok.pte.hu)



**Figure 1.** Ribbon diagrams of the BLUF domain crystal structures from WT (A, pdb:1yrx) and C20S (B, pdb:2iyg) AppA<sub>BLUF</sub> domains showing W104 in the vicinity of the flavin in the Trp<sub>in</sub> conformation (A) and away from the flavin in the Trp<sub>out</sub> conformation (B). Important residues involved in an H-bond network around the flavin (Y21, H44, N45, Q63) are shown. Dashed lines represent H-bonds between the flavin and the residues.

between the flavin and the protein by means of glutamine tautomerization has been proposed to provide a basis for light sensing<sup>13</sup>.

W104 is also a key player in the photocycle in communicating the electronic excitation of the flavin ring to the protein backbone<sup>14</sup>. Recent time-resolved IR experiments<sup>15</sup> have shown that W104A AppA<sub>BLUF</sub> undergoes reduced structural changes on the  $\mu$ s timescale along with an 80-fold increase in the rate of dark-state recovery, compared to that of the wild-type<sup>16</sup>. A 1.5-fold increase of the quantum yield of signalling state formation with a slight increase of the ground state recovery have been observed for the W104F AppA<sub>BLUF</sub> mutant<sup>17</sup>. Mutation of the W104 residue (W104A) does suppress the red-shift in the full-length protein<sup>18</sup> and renders the protein insensitive to blue light *in vivo*<sup>16</sup> underlying the importance of this residue for the downstream signalling events.

The exact conformation of W104 during the photoactivation process in AppA and other BLUF domains has been a controversial topic in the field. The first crystal structure of AppA<sup>19</sup> (pdb:1yrx) showed that W104 in the dark-adapted state is located close to flavin in the so called Trp<sub>in</sub> conformation (Fig. 1A), whereas subsequent crystal structures from Schlichting and coworkers<sup>20</sup> (pdb: 2iyg, 2iyi) presented a different picture where the tryptophan is pointing away from the flavin both in the dark- and light-adapted state (Trp<sub>out</sub> conformation) (Fig. 1B). Crystal structures of other BLUF domains like PixD<sup>21,22</sup>, BlrB<sup>23</sup> and OaPAC<sup>24</sup> have also contributed to the confusion as tryptophan is located in a solvent exposed position in a Trp<sub>out</sub> conformation. Interestingly, Slr1694 exhibits both conformations with one of the 10 crystallographic subunits adopting the Trp<sub>in</sub> conformation and the others the Trp<sub>out</sub> conformation<sup>22</sup>.

Computational calculations and spectroscopic studies have tried to address the question of the tryptophan flip in AppA, leading to opposite conclusions. Two independent studies by Udvarhelyi *et al.*<sup>25</sup> and Collette *et al.*<sup>26</sup> concluded that the Trp<sub>out</sub> represents the dark-adapted state of the protein whereas a recent study by Goyal and Hammes-Schiffer<sup>27</sup> revealed that both the *in* and *out* conformations are allowed at equilibrium but the *in* conformation is more stable. The solution NMR structure (pdb: 2bun) has also the majority of the snapshots in the Trp<sub>in</sub> conformation<sup>28</sup>. UV resonance Raman studies have supported the Trp<sub>in</sub> conformation in the dark state<sup>29</sup>. Tryptophan fluorescence spectroscopic studies have suggested that Trp does not become fully solvent exposed as suggested by some crystal structures but were conflicting regarding the conformation of the Trp<sup>18,30</sup>.

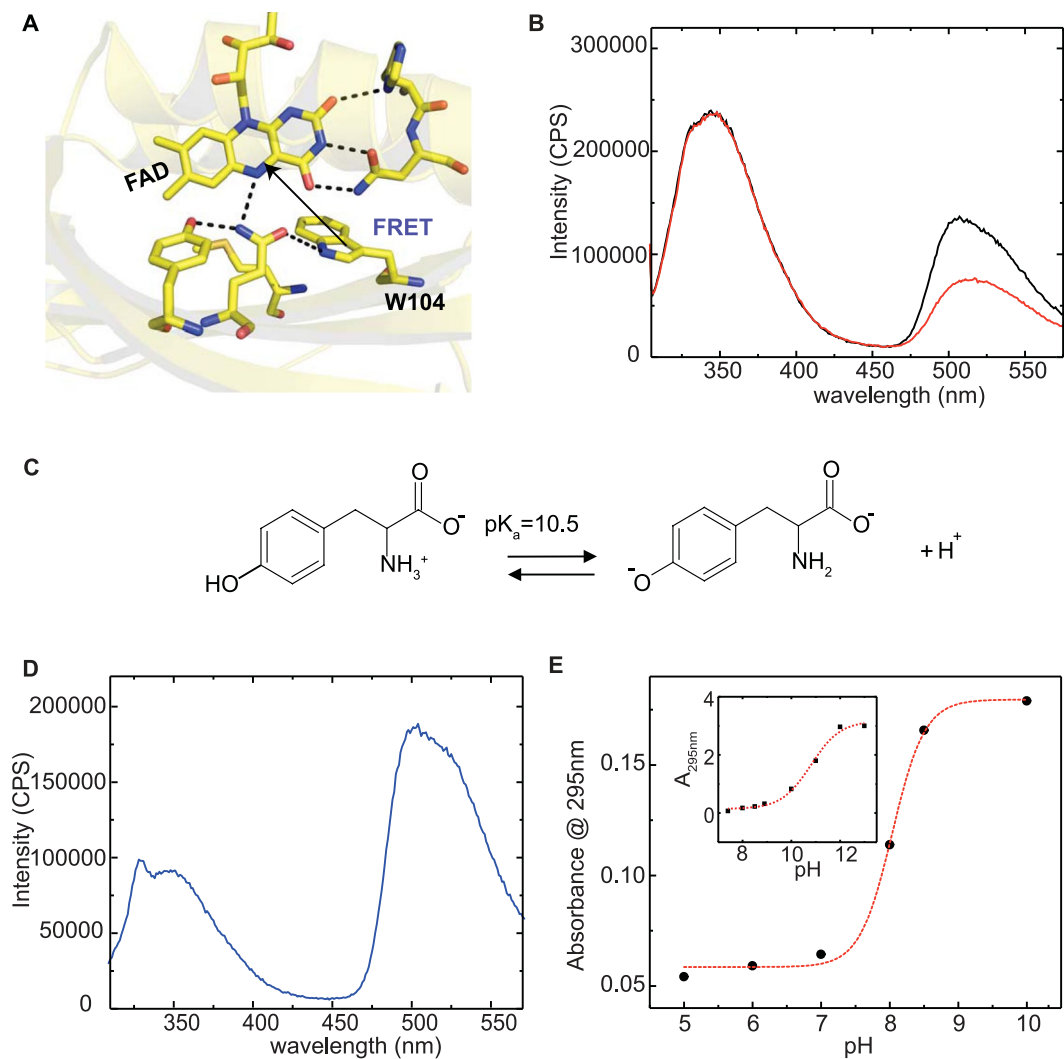
As there is still a controversy about the conformation and the role of W104 during photoactivation of AppA, we revisited the question using a different approach. Specifically, we exploit the spectroscopic properties of the 7-aza Trp (7AW) unnatural amino acid as an intrinsic fluorescent probe, able to separate the signals of interest from other Trp and Tyr residues. The absorption and fluorescence maxima of 7AW are red-shifted compared to canonical Trp allowing the exclusive excitation of the Trp analogue. We incorporated 7AW at position 104 and applied a wide range of fluorescence techniques to probe the functional dynamics of Trp104 in AppA<sub>BLUF</sub>. The results of our study provide strong evidence that W104 adopts a Trp<sub>out</sub> conformation in the dark-adapted state and a Trp<sub>in</sub> conformation in the light-adapted state.

## Results

**FRET measurements.** To provide quantitative information on the position of Trp104 during the photoactivation process in AppA, we used fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements.

Fluorescence resonance energy transfer, is a long-range non-radiative energy transfer process that takes place between two fluorophores, one in the excited state and one in the ground state<sup>31,32</sup>. The FRET efficiency—which is defined as the fraction of energy absorbed by the donor that is subsequently transferred to the acceptor depends on the distance between the donor and the acceptor<sup>33,34</sup> and can be calculated by Eq. (1)





**Figure 2.** (A) Ribbon diagram of the crystal structure of C20S AppA<sub>BLUF</sub> (pdb: 1yrx), showing the FRET pair (FAD, W104). (B) Emission spectra of W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the dark- (black) and light- (red) adapted states ( $\lambda_{exc} = 295$  nm). (C) Chemical structures showing ionization of tyrosine to tyrosinate. (D) Emission spectrum of W64F/W104A AppA<sub>BLUF</sub> ( $\lambda_{exc} = 295$  nm). The narrow peak ~330 nm is the contribution of Raman scattering of water (E) pH dependent formation of tyrosinates monitored at 295 nm for the W64F/W104A AppA<sub>BLUF</sub> mutant and for L-tyrosine in solution (inset). Fitting of the sigmoidal curve with a Boltzmann equation reveals a  $pK = 8.0$  for the two tyrosine residues present in AppA<sub>BLUF</sub> and a  $pK = 10.5$  for L-tyrosine in solution (inset).

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

where  $E$  is the FRET efficiency,  $R$  is the distance between the donor and the acceptor fluorophores and  $R_0$  is the distance between the two fluorophores in the case of 50% transfer efficiency. This strong distance dependence of FRET efficiency makes possible the measurement of molecular distances in the range of 10–100 Å and the term “spectroscopic ruler” has been coined for the method<sup>35</sup>.

FRET efficiency between W104 and FAD (Fig. 2A) has been obtained by two methods: measuring the fluorescence lifetime of the donor (7AW in position 104) in the absence and in the presence of the acceptor (FAD) and by using the method of acceptor enhancement. In this latter case the increase of the acceptor fluorescence intensity is monitored when the donor is present: if the donor transfers energy to the acceptor, enhancement of the fluorescence intensity of the acceptor is observed (see Supplementary Information).

**The 7-aza-Trp analogue (7AW) enables FRET measurements between residue 104 and flavin in the presence of tyrosines.** Besides W104, AppA<sub>BLUF</sub> contains one more tryptophan residue, W64. To eliminate a FRET contribution arising from W64, we have used the W64F mutant in our studies. In addition, to avoid fluorescence emission from the two tyrosine residues (Y21 and Y56) in AppA<sub>BLUF</sub>, we used 295 nm as the excitation wavelength, where tyrosines do not absorb (Fig. S1A). However, the emission spectra of W64F (Fig. 2B) and

of the tryptophanless mutant W64F/W104A (Fig. 2D) display a substantial fluorescence emission around 345 nm, suggesting the existence of a fluorophore (other than a tryptophan residue) and hence the presence of another component that may contribute to FRET in addition to W104. The 345 nm emission component is shown below to arise from tyrosinates.

Tyrosine residues are well known to deprotonate at high pH to form tyrosinates (Fig. 2C) which have very similar fluorescent features to tryptophan. In particular, an increase of the pH results in an increase of the absorption at 295 nm with concomitant decrease at 270 nm and a fluorescence emission shift from 303 nm to 340 nm<sup>36,37</sup>. This generally occurs at pH > 10.5 which is the pK<sub>a</sub> of free tyrosine<sup>38</sup>. However, as it has been reported for a series of proteins<sup>39–42</sup> tyrosine residues can have lower pK<sub>a</sub> values which results in the formation of tyrosinates and hence fluorescence emission appears around 340 nm, even at pH < 10.5. For example, tyrosinate fluorescence was observed from Y99 in calmodulin from bovine testes and the pK<sub>a</sub> of this tyrosine residue was shown to be as low as 7.0<sup>41</sup>. Tyrosinate fluorescence was also observed in photoactive yellow protein (PYP) where the pK<sub>a</sub> changes substantially, depending on whether the tyrosine is solvent exposed, buried or hydrogen bonded<sup>43</sup>, and in chicken ovomucoid where the pK<sub>a</sub> changes upon pressure dependent unfolding resulting in an increase of the fluorescence emission at 340 nm<sup>37</sup>.

To test whether tyrosinates are also formed in the AppA W64F/W104A mutant at pH 8.0, we performed pH dependent measurements of the absorbance at 295 nm and determined a pK<sub>a</sub> value of 8.0 (Fig. 2e). This finding suggests that at pH 8.0, half of the tyrosine residues exists as tyrosinates giving rise to the strong fluorescence emission at ~345 nm. This will necessarily result in a distorted picture for any fluorescence spectroscopy measurement where tryptophan fluorescence is monitored. To eliminate any contribution from tyrosinates, we used 7AW (Fig. 3A) and exploited its spectroscopic properties.

7AW (Fig. 3A) was first incorporated in bacterial proteins 50 years ago<sup>44</sup>. It is an ideal non-invasive *in situ* probe of the structure and dynamics of proteins, as it introduces minimal structural and functional modifications to the protein and in addition has favourable spectral properties compared to canonical Trp and other Trp analogues<sup>45,46</sup>. In particular, the absorption and fluorescence maxima of 7AW are red-shifted by 10 nm and 50 nm, respectively compared to that of canonical Trp (Fig. S1A,B and<sup>45</sup>). This red shift in the absorbance allows us to selectively excite the tryptophan analogue 7AW, using  $\lambda_{\text{exc}} = 310$  nm (canonical Trp has no absorbance at 310 nm) and to avoid the tyrosinates' absorbance at 295 nm.

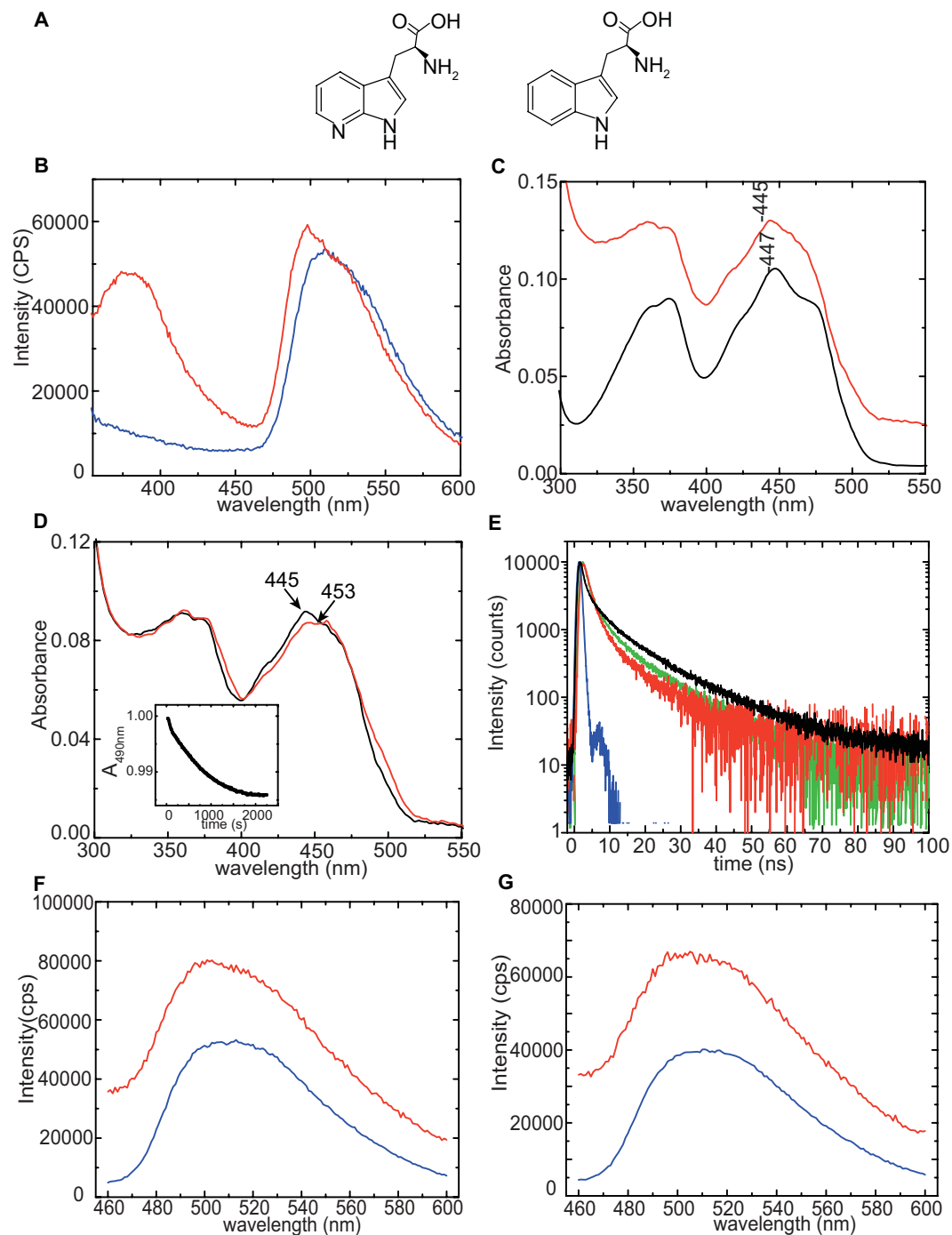
Using tryptophan auxotroph cell lines (as described in the Methods section), we incorporated the 7AW analogue in the place of W104 in the W64F mutant of AppA<sub>BLUF</sub>. The successful incorporation of the analogue in W64F AppA<sub>BLUF</sub> was confirmed by the characteristic emission band at 380 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 310$  nm) which is absent in the W64F mutant (Fig. 3B). The structural modification to the protein, due to the more hydrophilic character of the side chain of 7AW and potential new contacts by means of hydrogen bonds compared to canonical Trp is minimal, as reflected in (1) the flavin absorption spectrum which is similar to that of W64F (Fig. 3C) (2) the characteristic red shift of the isoalloxazine absorption maximum in the light-adapted state is similar to the corresponding shift observed in the W64F mutant (Figs. 3D and S2A) and (3) the identical dark state recovery rate (~14 min) compared to that of W64F (Fig. 3D inset.) The hydrogen bonding environment due to the extra N-atom of the 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutant is expected to be different between the wild-type and the 7aza analogue, resulting in an electronically modified structure of the flavin which is reflected as a small shift of the maximum and change in its vibronic structure (Fig. 3D). In the light-adapted state, W104 points towards the flavin. As explained above, the extra N-atom of the indole ring of the tryptophan results in a different hydrogen-bonding environment compared to the wild type, leading to different atom displacements in the excited state and hence to different shifts of the maximum for the S<sub>0</sub> to S<sub>1</sub> transition.

**FRET: Fluorescence lifetime measurements of 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub>.** To determine the FRET efficiency (*E*) between 7AW and FAD we performed time correlated single photon counting (TCSPC) measurements on the tryptophan in the case of the apoprotein and on the protein in the dark-adapted and light-adapted states (Fig. 3E). FRET efficiency was calculated using equation:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (2)$$

where  $\tau_{DA}$  is the fluorescence lifetime of the donor (7AW) in the presence of the acceptor (FAD) and  $\tau_D$  is the fluorescence lifetime of the donor alone. In all three cases the decay of the excited tryptophan analogue is described best using three lifetime components (Table 1) as previously reported for canonical tryptophan. Two of the fluorescence lifetimes of canonical tryptophan (0.2–0.9 ns and 1.2–3.6 ns) are inherent to the tryptophan structure itself independent of the surrounding environment whereas the third lifetime (3.7–9.2 ns) is generated by interactions between the tryptophan and neighbouring residues<sup>47</sup>. In the case of 7AW, the most striking difference compared to the canonical tryptophan is that the third lifetime component is longer (ca. 14–16 ns), whereas the other two components are observed in the same range as for tryptophan. The lifetime of the tryptophan analogue is shorter when FAD is present, suggesting the existence of Förster-type energy transfer. Calculating the FRET efficiency using the average lifetimes we obtained 23% efficiency in the dark-adapted case and 40% in the light-adapted case (see Supplementary information). An estimate of the average distance between the tryptophan analogue and the flavin can be obtained by

$$R = R_0^6 \sqrt{\frac{1-E}{E}}. \quad (3)$$



**Figure 3.** (A) Chemical structures showing 7AW (left) and canonical tryptophan (right). (B) Emission spectra of W64F (blue line) and 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutant (red line) ( $\lambda_{exc} = 310$  nm). W64F does not show fluorescence emission with 310 nm excitation; around 350 nm the spectrum shows remains of the Raman peak (not shown on this scale). (C) Absorption spectra of W64F (black line) and 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> (red line). Spectra are vertically translated for visualization purposes. (D) Absorption spectra of 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the dark- (black line) and light-adapted (red line) states showing the characteristic red-shift. The inset shows the recovery kinetics of the dark-adapted state monitored at 490 nm after illumination at 385 nm. (E) Fluorescence decay of the 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the dark (green) - and light-adapted (red) states after excitation at 321 nm, ( $\lambda_{em} = 380$  nm) in the presence of FAD and of the 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the de-flavinated, donor-only (black) state after excitation at 321 nm ( $\lambda_{em} = 380$  nm). The instrument response function is shown in blue. (F) Emission spectra of 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the dark-adapted state (G) Emission spectra of 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the light-adapted state. The acceptor only spectra (blue) are calculated as explained in the Supplementary Information. Excitation was set at 310 nm. A significant fluorescence enhancement in the light-adapted state (red) is observed for 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> due to FRET transfer from 7AW to the flavin. The fluorescent enhancement is lesser in the dark-adapted state (F).

7azaTrp-W64F/ W104	$\tau_1$	$\alpha_1$	$\tau_2$	$\alpha_2$	$\tau_3$	$\alpha_3$	$\tau_{\text{average}}$	reference
apoprotein	0.4	0.2	4.1	0.3	16.2	0.4	8.7	this work
holoprotein dark	1.1	0.4	4.4	0.3	16	0.3	6.8	this work
holoprotein light	1.3	0.4	3.5	0.3	14.7	0.2	5.2	this work
canonical Trp	0.2–0.9		1.2–3.6		3.7–9.2			<sup>47</sup>

**Table 1.** Fluorescence lifetimes (ns) of 7AW and corresponding amplitudes in the 7aza-W104/W64F mutant (no FAD present), and the 7aza-W104/W64F mutant (FAD present) in the dark- and light-adapted states.

In the case of 7AW and FAD,  $R_0$  is 16.8 Å using the assumption that the tryptophan can freely rotate thus the value of the orientation factor (see SI)  $\kappa^2 = 2/3$ . In support of free rotation of the tryptophan ( $\kappa^2 = 2/3$ ) the anisotropy decay of the dark-adapted state (see next section) is substantially faster when compared to the light-adapted state. Hence in the dark-adapted state, the distance between 7AW and the flavin is estimated to be 20.5 Å (see Supplementary Information). The slower rotational correlation time observed in the case of the light-adapted state of the protein (see below) suggests that the tryptophan is not able to freely rotate as it is hydrogen-bonded in the Trp<sub>in</sub> position. This locked position imposes a strong constraint on the orientation of the transition dipole of W104, implying that  $\kappa^2 = 2/3$  used for the freely rotating dipoles cannot be used. From the crystal structure (pdb:1yrx) we can observe that the orientation of the transition dipole moments of the flavin and W104 are close to perpendicular (see Fig. S6) thus  $\kappa^2$  is expected to be close to zero, the theoretical value for perpendicular orientation; we have actually calculated  $\kappa^2 = 0.02$  (see Supplementary Information). In this case, the value of  $R_0$  is modified to 8.9 Å, and the distance calculated between tryptophan and flavin in the light-adapted state is 9.5 Å.

**FRET: acceptor enhancement method.** FRET efficiency between 7AW104 and the flavin can also be calculated by measuring the intensity loss of the emission of the tryptophan or the intensity enhancement of the emission of the flavin due to the resonance energy transfer. In the latter case, known as the acceptor enhancement approach<sup>31,32</sup>, the FRET efficiency is calculated by Eq. (4)

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] \quad (4)$$

where  $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})$  and  $\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})$  are the extinction coefficients of the acceptor and donor at the donor excitation wavelength ( $\lambda_D^{ex}$ ), and they were calculated using the absorption spectrum of FAD (Fig. S4).  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  and  $I_A(\lambda_A^{em})$  are the acceptor intensity in the presence and the absence of the donor, respectively.

The enhancement of the fluorescence intensity due to the FRET between tryptophan and flavin was measured in the case of the 7aza-W104/W64F mutant in order to avoid the fluorescence from the tyrosinates as previously discussed.

Figure 3F,G show the emission spectra of the 7aza-W104/W64F mutant in the dark and light states, respectively using  $\lambda_{exc} = 310$  nm. Inspection of the data reveals a significant increase of the emission of FAD in the presence of the donor both in the dark-adapted and light-adapted states indicating efficient FRET from 7AW to FAD. This fluorescence enhancement is even more pronounced in the light-adapted state. We calculate a FRET efficiency of  $E_{\text{dark}} = 42\%$  and  $E_{\text{light}} = 59\%$ , which corresponds to a distance  $R_{\text{dark}} = 17.7$  Å and  $R_{\text{light}} = 8.3$  Å for the dark- and light-adapted states, respectively<sup>8,48</sup>.

**Comparison of the FRET obtained distances with those from crystal structures.** The estimated distances between W104 and FAD obtained from lifetime measurements and the acceptor enhancement method are in relatively good agreement for the dark-adapted state (20.5 Å and 17.7 Å, respectively).

The estimated distances from our fluorescence measurements are also in good agreement with the distances obtained from the crystal structures of AppA<sub>BLUF</sub> (pdb: 2iyg, 2iyi) and AppA full-length without the Cys-rich region (pdb:4hh0, 4hh1) (Table 2) where W104 has been reported to be located on the surface/distal to FAD (Trp<sub>out</sub> conformation). However, they significantly deviate from those in the first solved crystal structure of AppA<sub>BLUF</sub> (pdb:1yrx, 5.9 Å) and the NMR solution structure (pdb:2bun, 6.2 Å) for which W104 exhibits the Trp<sub>in</sub> conformation (close to FAD). It should be noted that local differences between the C20SAppA(1–124) dark structure (pdb:2iyg) and the AppA17–133 (pdb:1yrx) have been earlier attributed to the presence of bound detergent molecules<sup>20</sup>, and hence considered for the structure of AppA1–124C20S to represent better AppA<sub>BLUF</sub> in solution. The significantly (9.4–11 Å) shorter distance between W104 and FAD for the light-adapted state from FRET and fluorescence lifetime measurements suggest that in the light-adapted state W104 adopts a Trp<sub>in</sub> conformation. It should be mentioned that such a difference was not observed between the dark-adapted and light-adapted states of the crystal structures of C20S-AppA(1–124)<sup>20</sup> (Table 1) potentially originating from constraints in the movement of the indole ring of W104 inside the crystal. This is also reflected in the smaller light-induced red shift in the crystal (5–6 nm) compared to that in the solution (14 nm) suggesting the formation of a preceding intermediate of the full signalling light-adapted state<sup>20</sup>. Interestingly, no significant conformational changes have been observed in the corresponding tryptophan residue (W90) in the photoactivated state of the OaPAC BLUF protein despite the ~10 nm light-induced red-shift observed in the crystal<sup>49</sup>.

Protein	pdb/FRET	Distance (Å)	references
AppA <sub>BLUF</sub> (17–133)	1yrx	5.9	50
AppA <sub>BLUF</sub> (5–125)	2bun	6.2	28
C20S AppA <sub>BLUF</sub> (1–124)	2iyg (dark)	16.0	20
C20S AppA <sub>BLUF</sub> (1–124)	2iyi (light)	16.2	20
C20S AppA Δ399	4hh0	15.7	50
wt AppA Δ399	4hh1	15.7	50
TePixD <sub>BLUF</sub> (2–143)	1x0p	16.1	21
Slr1694 <sub>BLUF</sub> (2–140)	2hfn	15.7, 5.7*	22
OAPAC (1–366)	4yus	16.6	24
BrlB <sub>BLUF</sub> (1–140)	2byc	16.0	23
7azaW104W64F AppA (dark)	FRET:FL	20.5	this work
7azaW104W64F AppA (light)	FRET:FL	9.5	this work
7azaW104W64F AppA (dark)	FRET: AEM	17.7	this work
7azaW104W64F AppA (light)	FRET: AEM	8.3	this work

**Table 2.** Comparison of the distance between C7 of the indole ring of Trp (W104 in AppA<sub>BLUF</sub>) and N3 of the isoalloxazine ring of flavin from the various crystal structures available for AppA<sub>BLUF</sub>. AppA full-length domains and other BLUF domains. An average distance is provided for those structures that contain more than one subunit. \*In Slr1694<sub>BLUF</sub> (2–140), a shorter distance (5.7 Å) is observed in one of the ten subunits. FRET: FL refers to our FRET measurements using fluorescent lifetimes and FRET: AEM to FRET measurements using the acceptor enhancement method.

**7-aza W104 has restricted movement in the light-adapted state as revealed by fluorescence anisotropy decay measurements.** To probe the conformational dynamics of W104 and steric restrictions, we have applied time-resolved fluorescence anisotropy decay measurements, which have been used for decades to characterize protein dynamics. The relaxation of anisotropy induced by a polarized excitation pulse reflects both the dynamics of the fluorophore itself and the protein or segment to which it is attached to. Time dependent anisotropy  $r(t)$  can be fitted as a sum of exponentials<sup>32</sup>,

$$r(t) = \sum_i r_{0i} \exp\left(-\frac{t}{\theta_i}\right), \quad (5)$$

where  $\theta_i$  values are the rotational correlation times, and  $r_{0i}$  are the limiting anisotropies in the absence of rotational diffusion. In principle, fast rotational correlation times ( $\sim 1$  ns) suggest a fast movement of the fluorophore whereas longer correlation times (tens of nanoseconds) may reflect a slower rotation of the fluorophore or the entire protein complex<sup>32</sup>.

Figure 4A shows the decay of the fluorescence anisotropy of the 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutant in the dark- and light-adapted states. Single exponential fitting reveals a decay constant for the dark-adapted state,  $\tau_{dark} = 1.5 \pm 0.06$  ns and for the light-adapted state,  $\tau_{light} = 11.1 \pm 0.5$  ns. The short rotational correlation time in the dark-adapted state reflects a less restricted rotation of the tryptophan residue, and it is close to the rotational correlation time of L-tryptophan in buffer ( $\theta = \sim 0.6$  ns) implying an almost free rotation of the indole moiety.

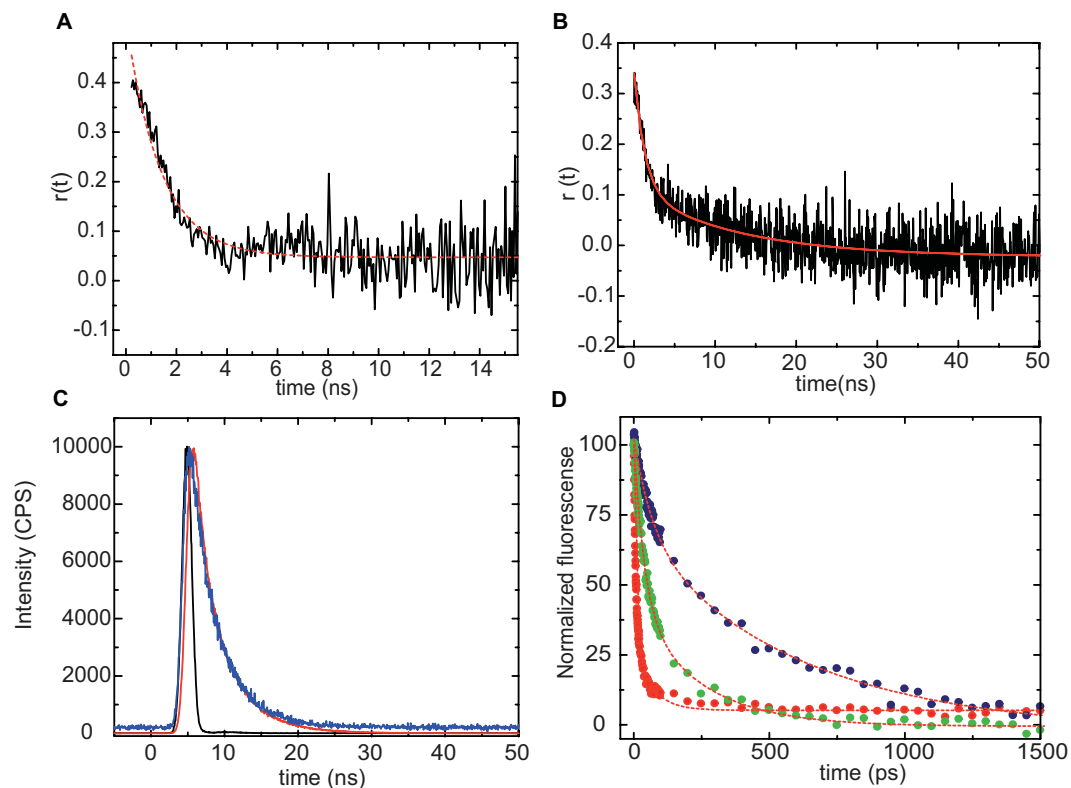
The observed 11 ns long rotational correlation time in the light adapted state corresponds to the rotation of the whole protein and agrees well with the value expected based on the empirical formula proposed by Visser<sup>51</sup>:  $\Phi = 3.84 \cdot 10^{-4} M_r$ , where  $\Phi$  is the rotational correlation time in ns and  $M_r$  is the molecular weight of the protein in Da. This observation suggests that upon blue light absorption, the W104 tryptophan residue moves closer to the flavin and gets hydrogen bonded to an adjacent amino acid residue, most probably Q63.

Fluorescence anisotropy decay measurements were performed in the Y21F/Y56F/W64F AppA mutant as well, in which case the protein is locked in a state which is very similar to the light adapted. The rotational correlation time was calculated to be  $\sim 10$  ns (see Fig. S5), hence very similar to the one observed in the light-adapted state of the 7aza-W104/W64F mutant. That finding suggests that the tryptophan at 104 position is rigidly bound to the protein, in the triple mutant.

These results are in line with the findings from our FRET measurements: W104 in AppA<sub>BLUF</sub> is characterized by flexible dynamics in the dark- adapted state whereas in the light-adapted state, it is present in a more restricted environment, probably due to a stronger hydrogen bond network around the flavin molecule, originating from the nitrogen atoms of the tryptophan that are expected to form additional hydrogen bonds with Q63 and O14 of the flavin. It should be pointed out that the flexibility of W104 in the dark-adapted state is a novel finding that hasn't been observed in previous studies which have favoured a position of the W104 close to the flavin in a Trp<sub>m</sub> conformation<sup>18,19,29</sup>.

**Fluorescence lifetimes of the flavin in the dark- and light-adapted state.** Ultrafast electron transfer from the neighbouring aromatic amino acid residues (Trp and Tyr) to the electronically excited flavin chromophore has been observed in many flavoproteins (including glucose oxidase, flavodoxin, riboflavin binding protein, photolyase/cryptochromes and ThyX)<sup>52–56</sup>. This photoinduced electron transfer (PET) results





**Figure 4.** Decay of the fluorescence anisotropy of 7aza-W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> in the dark-(A) and light-adapted states (B). (C) Fluorescence decay of the Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> (blue) and free FMN (red) after excitation at 455 nm, ( $\lambda_{em} = 520$  nm). The instrument response function ( $\sim 1$  ns) is shown in black. (D) Kinetics at the emission maximum ( $\lambda_{em} = 520$  nm) after excitation at 390 nm for AppA W64F dark-adapted state (navy), light-adapted state (red) and Y21F/Y56F/W64F AppA BLUF (green). The instrument response function was  $\sim 1$  ps.

in substantial shortening of the fluorescence lifetime of the flavin. Measurements of the fluorescence lifetime of the flavin can therefore provide significant information on the flavin environment. Here, we applied TCSPC and Kerr-gated fluorescence spectroscopy<sup>57</sup> to determine the fluorescence lifetimes of the flavin in the dark- and light-adapted state in order to obtain further information on the position of W104 during photoactivation, and its influence on the quenching mechanism.

As expected, in the AppA<sub>BLUF</sub> mutant where all four tyrosine and tryptophan residues have been mutated (Y21F/Y56F/W64F/W104F) and hence all possible electron donors are removed, the fluorescence lifetime of the flavin was 3.8 ns (Fig. 4B). This is in the range expected for the fluorescence lifetime of the flavin in solution  $\sim 3$ –5 ns: the fluorescence lifetime (the longer component) of FAD is around 3 ns<sup>58</sup>, free FMN in water is around 4.8 ns, lumiflavin is 5.2 ns<sup>59,60</sup>. As expected from the lower quantum yield of FAD fluorescence in AppA W64F (8.5% and 4.8% in dark- and light-adapted state respectively) a substantially faster fluorescence decay with respect to that of the quadruple mutant was observed both in the dark- and light-adapted case (Fig. 4C and Table 3).

Transient picosecond fluorescence spectra (Fig. S3A–C) and kinetics at the emission maximum ( $\lambda_{max} = 520$  nm) (Fig. 4D) are shown for W64F AppA (dark- and light-adapted states) and Y21F/Y56F/W64F AppA. Global analysis reveals a biphasic fluorescence decay for the flavin. (Table 3). In the dark-adapted state of the W104/W64F, there is a dominant phase with a decay constant  $\tau_{dark} = 500$  ps that is around fifty times slower than the dominant phase of the light-adapted state,  $\tau_{light} = 11$  ps. The faster decay in the light-adapted state, suggests that the excited state of the flavin is quenched by electron transfer from close-by aromatic residues that should be positioned closer to the flavin compared to their position in the dark-adapted state.

We measured the fluorescence lifetime of the flavin in the Y21F/Y56F/W64F AppA mutant where all the potential electron donors were removed except for W104. In this case we also observed a significantly ( $\sim 4$ –5 times) shortened relaxation time compared to the time constant measured in the dark-adapted state of W64F AppA. This indicates that the tryptophan in this mutant is closer to the flavin than in dark-adapted state of AppA W64F and it is able to quench efficiently the excited state of the flavin. This result lines up well with the findings from the anisotropy decay measurements (Fig. S5) altogether indicating that W104 is in a rigidly bound position close to the flavin.

We therefore assign the drastic acceleration of the fluorescence decay in the light-adapted state of AppA W64F to the movement of the W104 towards the flavin and its acting as the main quencher in the light-adapted state (see Discussion). Despite the fact that in PixD the respective tyrosine (Y8) is involved in proton coupled electron transfer (PCET) we don't anticipate that Y21 is an efficient quencher in the case of AppA<sub>BLUF</sub>. We have already

Protein	A1	T1(ps)	A2	T2(ps)	R1 (Å)	R2 (Å)
W64F dark	0.7	<b>500</b>	0.3	70	9.5	8.03
W64F light	0.13	230	0.87	<b>11</b>	8.9	6.7
Y21F/Y56F/W64F	0.43	200	0.57	<b>36</b>	8.8	7.6

**Table 3.** Fluorescence decay constants of the flavin and corresponding amplitudes in various AppA<sub>BLUF</sub> mutants. Estimated distances between the flavin and W104 based on electron transfer calculations. The major contribution is shown in bold.

demonstrated<sup>9</sup> the lack of an efficient ET during the forward reaction in AppA<sub>BLUF</sub> which we attribute to the low pKa of Tyr21. Our previous work<sup>73</sup> on PixD where we replaced Tyr8 with fluorinated tyrosines, lowering the pKa of the tyrosine (by fluorination) led to an increase of the lifetime of the excited state. The same effect was observed in another BLUF protein (unpublished results) implying that the ability of the respective tyrosine to quench the flavin decreases with low pKa. The possible reason is that despite the higher driving force for ET, tyrosinate formation prevents the PCET which is clearly needed in PixD.

In addition, the emission spectra of the W64F AppA<sub>BLUF</sub> (Figs. 2B and S3B) lose the characteristic vibrational shoulder at ~500 nm in the light-adapted state. These changes are also accompanied by a decrease in the fluorescence (Fig. 2B) and are indicative of an enhanced electron transfer in the case of the light-adapted state.

Using the simple empirical expression known as the Dutton ruler (Eq. 6)<sup>61</sup>

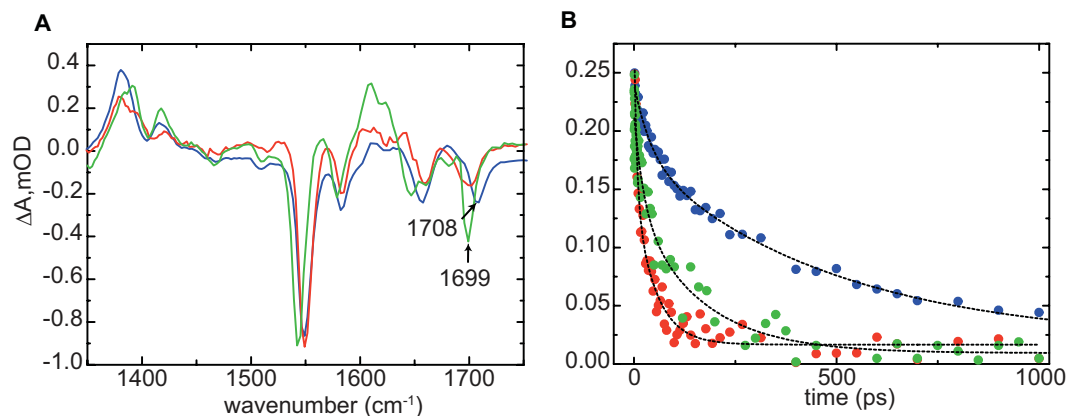
$$\log k_{ET} = 15 - 0.6R - 3.1 \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{\lambda} \quad (6)$$

that relates the electron transfer rate constant ( $k_{ET}$ ) to the edge-to-edge distance ( $R$  in Å) between two reaction centres, we roughly estimated the distances between flavin and the tryptophan for the dark-adapted state ( $R_{\text{dark}} = 9.5$  Å) and the light-adapted state ( $R_{\text{light}} = 6.7$  Å) (Supplementary information), assuming a barrierless electron transfer ( $\Delta G = -\lambda$ ), where  $\Delta G$  is the driving force for the electron transfer between the electron donor (presumably W104 at least for the light-adapted state) and the excited flavin and  $\lambda$  is the reorganization energy.

The triple mutant (Y21F/Y56F/W64F) where both tyrosines and W64 tryptophan were removed is photoinactive, no red shift is observed upon blue light illumination. The absorption spectra of this mutant and the Y21F/Y56F/W64F/W104F mutant can be found in the Supplementary Information (Fig S7). Both mutants are very stable even at high concentrations (300–500 μM) and able to retain the flavin despite the multiple mutations. In the case of the Y21F/Y56F/W64F mutant it seems that W104 is locked in a position that is characterized by similar photophysics with the light-adapted state of W64F AppA<sub>BLUF</sub> as the fluorescence decay of the flavin is very fast. Interestingly, the two decay phases of the flavin have similar contributions indicating that W104 exists in two conformations relative to its proximity to the flavin chromophore. Based on the Dutton ruler, the following estimated distances were calculated,  $R_{\text{in}} = 7.6$  Å ( $\tau = 36$  ps) and  $R_{\text{out}} = 8.8$  Å ( $\tau = 200$  ps).

**Transient infrared measurements.** To study the protein dynamics in the AppA<sub>BLUF</sub> domain after blue light absorption we performed transient infrared measurements on the dark- and light-adapted states of AppA<sub>BLUF</sub> W64F and on the AppA<sub>BLUF</sub> Y21F/Y56F/W64F mutants (Fig. 5A). Transient infrared spectra recorded at time delays between 1 ps and 2 ns after 450 nm excitation of the flavin show similarities with the spectra observed for the wild type AppA<sub>BLUF</sub><sup>62,63</sup>. The negative features (bleaches) of the recorded spectra associate with depletion of the ground state population or with photoinduced changes in the vibrational spectrum of the protein, occurring either directly through electronic excitation at  $t = 0$  or as a result of subsequent structural dynamics; positive bands are associated with vibrations of the electronically excited state of the flavin, or with modes of the protein which shift as a result of electronic excitation, or of products formed subsequently. In AppA<sub>BLUF</sub> (and the majority of flavoproteins) four dominant bleaches are observed in the 1300–1800 cm<sup>-1</sup> region: the bands at 1547 cm<sup>-1</sup> and 1581 cm<sup>-1</sup> arise from ring modes of the isoalloxazine ring whereas the ~1650 cm<sup>-1</sup> and ~1710 cm<sup>-1</sup> bands are related to the carbonyl stretches C2=O and C4=O of the FAD ground state, respectively, and are sensitive to the H-bond environment<sup>62,64</sup>.

Comparison of the dark- and light adapted spectra of the W64F AppA mutant reveals a ~9 cm<sup>-1</sup> downshift for the C4=O carbonyl band in the light adapted state, that is similar to the shift observed for the WT AppA<sup>63</sup> and attributed to the formation of new hydrogen bond to C4=O. That result demonstrates the arrangement of a rigid environment for W104 in the light-adapted state due to the formation of a H-bond to the flavin, and supports our FRET measurements that reveal a change of the location of W104 close to the flavin in that state. It is also in line with our anisotropy decay measurements that demonstrate a slower rotation (~11 ns) for W104 in the light-adapted state, reflecting rotation of W104 together with the whole protein due to the more restricted environment of W104. Similarly, the vibrational mode related to the C4=O carbonyl group is downshifted in the Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> compared to the dark-adapted W64F AppA<sub>BLUF</sub> suggesting a bond strengthening. Figure 5B shows the kinetics observed at 1380 cm<sup>-1</sup> which reflect the decay of the excited state of the flavin<sup>9</sup>. The kinetics in Table 4 are in line with our findings from the picosecond fluorescence lifetime measurements for the flavin: the decay of the excited state is slower in the dark-adapted state and faster in the light-adapted state reflecting the efficient quenching of the excited state in the latter case. The kinetics for the Y21F/Y56F/W64F reflect also a significantly faster relaxation compared to the AppA<sub>BLUF</sub> W64F dark-adapted state which allows us to conclude that W104 (the only possible electron donor in this case) is in a rigidly bound and closer position to the flavin compared to the dark-adapted state.



**Figure 5.** (A) TRIR spectra of dark- and light-adapted (blue and red respectively) W64F and the Y21F/Y56F/W64F AppA mutants (green) recorded at 10 ps; (B) Kinetics of the excited state of the flavin in the dark- and light-adapted (blue and red respectively) states of W64F AppA<sub>BLUF</sub> and in the Y21F/Y56F/W64F AppA<sub>BLUF</sub> (green) observed at 1380 cm<sup>-1</sup>.

	$\tau_1$ (ps)	$\alpha_1$	$\tau_2$ (ps)	$\alpha_2$
Dark W64F	41	0.27	482	0.73
Light W64F	23	0.86	221	0.14
Y21F/Y56F/W64F	23	0.36	160	0.64

**Table 4.** Decay time constants at 1380 cm<sup>-1</sup>.

## Discussion

W104, a residue present in the majority of BLUF containing photoreceptors [AppA, Slr1694, OaPAC, TePxD, BlrB]<sup>49</sup> is of special interest because of the inconsistencies reported concerning its conformation in the dark-adapted states, based on crystal structures and its potential role in the long-range signalling. It is well known that X-ray crystal structures of proteins capture only those conformations that fit into the crystal lattice, which may or may not be relevant to function.

Earlier spectroscopic studies<sup>18,29</sup> have favoured the Trp<sub>in</sub> conformation for the dark-adapted state based on indirect evidence for a buried and hydrophobic environment around the tryptophan. A fluorescence spectroscopy approach was used by Dragnea *et al.*<sup>18</sup> where they used acrylamide quenching to characterize the dynamics of the respective tryptophan. Acrylamide quenching was proved to be a useful method to obtain information about the tryptophan accessibility. The quenching of the fluorescence of a buried tryptophan is less efficient than the quenching of a solvent exposed one. In the previous experiments though, the results of acrylamide quenching were influenced by the unexpected appearance of tyrosinate fluorescence, revealed here. Incorporating the unnatural amino acid 7AW we were able to avoid the fluorescence of tyrosinate, in this way our work provides unequivocal evidence, as it relies on a novel approach and the application of advanced fluorescence techniques to address the orientation of W104 in the BLUF functional states.

Fluorescence spectroscopy methods – namely fluorescence anisotropy decay and Förster-type energy transfer – were used to both characterize the mobility and position of W104 tryptophan during photoactivation, and its distance from flavin in dark- and light-adapted states. In the case of the FRET experiments we monitored the changes of the fluorescence intensity of the acceptor as there was no possibility to measure the FRET efficiencies from the donor side; removing the flavin would have led to a photoinactive protein. In order to measure the FRET efficiency using the acceptor enhancement method we first made the W64F/W104A mutant which was anticipated to have a fluorescence intensity arising only from the acceptor following excitation at 295 nm. However, an unexpectedly strong fluorescence signal around 340 nm was observed, despite the lack of the tryptophans, pointing to substantial fluorescence from the tyrosinate form of tyrosines in AppA<sub>BLUF</sub>. In order to eliminate this fluorescence emission, which overlaps with the fluorescence coming from the tryptophans, we used the 7AW tryptophan analogue which has shifted absorption and fluorescence spectra compared to the canonical one.

Substitution of W104 with the unnatural amino acid residue 7AW resulted in a tailor made BLUF protein with useful spectral properties that allowed us to obtain clear and distinct fluorescent signals, making possible measurement of the fluorescent anisotropy decay of 7AW in the 104 position of AppA<sub>BLUF</sub> in the dark- and light-adapted state of the protein. The outcome of the fluorescence anisotropy decay measurements resulted in an unexpected picture compared to our presumption: the fast anisotropy decay (~1 ns) of 7AW in the dark-adapted state reflects the nearly free rotation of the tryptophan suggesting that it is therefore not hydrogen bonded to the flavin and the adjacent glutamine (Q63). In contrast a slow rotation (~11 ns) was observed in the light-adapted state, which shows that the tryptophan is rotating together with the protein, most probably because it is tightly hydrogen bonded to Q63.



The substitution of W104 by the tryptophan analogue 7AW paved the way for the FRET experiments using the “spectroscopic ruler” to determine the tryptophan-flavin distance in both the dark- and light-adapted states. The estimated distance obtained from the acceptor enhancement method for the dark-adapted state (17.7 Å) is in good agreement with the distance obtained from the crystal structures of the AppA<sub>BLUF</sub> (16 Å) and full-length protein (15.7 Å) (Table 2). A slightly longer distance (20.5 Å) was obtained from the fluorescence lifetime measurements probably due to the uncertainty in the estimation of the fluorescence lifetime of 7AW in position 104 in the apoprotein. In the absence of the flavin, the protein may adopt a different conformation compared to when flavin is present which may result in a modified fluorescence lifetime as the tryptophan is very sensitive to the protein environment. The FRET measurements for the dark-adapted state point towards a more distant position for the tryptophan compared to the light-adapted state in which the tryptophan is very close (8.3/9.5 Å, Table 2) to FAD. The estimates of 8.3/9.5 Å center-to-center between FAD and 7AW-Trp104 from the FRET experiments are in good agreement with the estimate of 6.7 Å (edge-to-edge) between FAD and W104 from the electron transfer quenching experiments. This assessment also confirms that W104 acts as the predominant electron donor to FAD\* (excited FAD) in the light-adapted state.

The change in the orientation and the distance of W104 during the photoactivation was reflected in earlier fluorescence and transient absorption spectroscopy measurements. Streak camera measurements on the dark-adapted AppA<sub>BLUF</sub> have shown that the fluorescence lifetime of flavin is ~ 600 ps<sup>10</sup> in line with our measurements (Table 3). This value drops by a factor of ten (Table 3) in the case of the light-adapted state of the protein suggesting that flavin fluorescence is strongly quenched most probably by the nearby tryptophan, hence supporting a different location for the tryptophan residue closer to the flavin molecule.

Results from visible and infrared transient absorption measurements are also consistent with the above measurements: in the light-adapted state a flavin and tryptophan radical was formed, which is not the case for the dark-adapted state<sup>9,58</sup> (in agreement with our assessment that W104 is not a main quencher in the dark-adapted state). These observations can be explained by the simple mechanistic scheme that in the light-adapted state efficient electron transfer takes place by the closely positioned tryptophan that can provide an electron to the excited flavin, quench it and form the flavin radical. As discussed above, the distances obtained from the electron transfer calculations are in good agreement with those obtained from the FRET measurements supporting an electron transfer from the tryptophan residue. This finding is underlined by the strong quenching of the excited state observed in the Y21F/Y56F/W64F mutant where the only possible electron donor is W104 and it is in a close position (7.6 Å) to the flavin. Fluorescence anisotropy decay measurements performed on this mutant show a similar rotational correlation time (see Fig. S5) to that measured in the light-adapted case, indicating that the tryptophan in this case is locked – most probably via hydrogen bonding – in a light-like state.

The TRIR data measured on the light-adapted W64F and Y21FY56FW64F mutant show a downshift of frequency of C4=O carbonyl which can be explained based on the model suggested by Iwata *et al.*<sup>65</sup> (Model 7) which assumes a hydrogen bond formed between the enol form of Q63 and W104.

All these findings agree with recent calculations<sup>27</sup> which show that the close position of W104 is favourable for electron transfer from tryptophan to flavin and this pathway is dominating when the transfer is from Y21 to the flavin is repressed by the lack of the conducive hydrogen-bonding network. Overall our study addresses previous discrepancies on the subtle conformational differences of W104 that characterize the dark and signalling states in BLUF containing photoreceptor proteins, and provides significant information that allow us to re-examine the existing mechanistic models of photoactivation<sup>63</sup>. The hierarchical relaxation pathway after flavin photoexcitation in the AppA<sub>BLUF</sub> domain occurs on the pico- to nanosecond time scale for the flavin localized dynamics while subsequent protein structural reorganization is observed over microseconds<sup>66</sup>. Rearrangement of the hydrogen bond network around the flavin is believed to be associated with conformational changes involving the  $\beta$ 5 strand<sup>18,28</sup>. The movement of the W104 residue which resides on the  $\beta$ 5-strand is therefore not unexpected and can result in further structural changes in the C-terminal  $\alpha$ -helices affecting the interaction of the protein with downstream components. Understanding the dynamic behaviour of photoreceptors has a major impact on the field of optogenetics as it can help to control gene expression and engineered biosynthetic pathways.

## Conclusions

A wide range of fluorescence techniques, time-resolved infrared spectroscopy and unnatural amino acid incorporation have been used to probe the functional dynamics of W104 during the photoactivation process in AppA<sub>BLUF</sub>. Fluorescence resonance transfer (FRET) measurements and replacement of W104 with the unnatural amino acid 7AW have provided quantitative information on the position of W104 in the dark- and light-adapted states. In the light-adapted state, W104 is in a restricted environment with an enhanced H-bond network compared to that in the dark-adapted state, as revealed by the long rotational correlation time (~11 ns) for W104 from fluorescence anisotropy decay measurements and the downshift of the C4=O carbonyl band from infrared measurements. In addition, in the light-adapted state the short fluorescence lifetime of the flavin suggests that efficient electron transfer takes place to the excited flavin from the closely placed W104. Overall, our study addresses previous discrepancies on the position of W104 during the photocycle of AppA and supports a conformation of W104 close to the flavin in the light-adapted state whereas in the dark-adapted state W104 is present in a less restricted environment pointing away from the flavin.

## Methods

**Materials.** Glycogen (Type III: from rabbit liver) was purchased from Sigma-Aldrich. 7AW was purchased from Aldrich.

**Expression and purification of W64F, W64F/W104A, 7aza-W104/W64F, Y21F/Y56F/W64F and Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> proteins.** The BLUF domain of AppA (AppA<sub>BLUF</sub>: residues 5–125) was expressed in BL21(DE3) *Escherichia coli* cells. Protein expression and purification were performed in the dark as described previously<sup>63</sup>. The constructs for the site-directed mutants W64F, W64F/W104A and Y21F/Y56F/W64F were generated by PCR amplification (overlap extension method) from wild-type pET15b\_AppA<sub>BLUF</sub> using the NdeI and BamHI restriction enzymes. The primers used are described in Supplementary Table 1. The DNA sequence for expressing the Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA<sub>BLUF</sub> mutant was purchased from Thermo Fisher Scientific. All constructs were verified by DNA sequencing.

The 7aza-W104/W64F construct was expressed in a Tryptophan auxotroph M5219 *Escherichia coli* strain, purchased from the Belgian Coordinated Collection of Micro-Organisms (<http://bccm.belspo.be/>). The W64F AppA<sub>BLUF</sub> contained construct was transformed by heat shock into M5219 *E. coli* strain. A single colony was inoculated into 25 mL Luria Broth (LB) media incubated overnight at 200 rpm and 37 °C. The overnight culture was used to inoculate 1 L M9 medium in a 4 L flask and cells were allowed to grow at 30 °C until OD<sub>600nm</sub> reached ~0.6. At this point, the cells were washed three times with washing buffer (M9 mineral salts solution and 20% glucose) to remove all Trp from the medium harvested, resuspended in 1 L M9 media and cultured for additional 30 minutes at 30 °C to ensure full Trp depletion<sup>66</sup>. 7AW was then added and incubated for 15 minutes to allow the cells to uptake it after which the temperature was decreased to 18 °C for 30 min followed by addition of 0.8 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce protein expression. Cells were harvested, lysed and purified using Ni-NTA affinity resin as previously described<sup>63</sup>. The apoprotein is produced during protein expression and was isolated by size exclusion chromatography.

**Steady state optical and fluorescence measurements.** Absorption spectra were measured on a Perkin Elmer Lambda XLS + and Jasco V-660 spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were obtained with a Horiba Jobin Yvon Fluorolog spectrofluorometer using three excitation wavelengths ( $\lambda_{exc} = 295$  nm,  $\lambda_{exc} = 350$  nm,  $\lambda_{exc} = 455$  nm). The applied slit width was set at 5 nm for both the excitation side and the emission side. Unless otherwise indicated all fluorescence spectra were measured in the dark at 22 °C in a 10 mm × 1 mm quartz cuvette.

**Fluorescence lifetime and anisotropy decay measurements.** *Fluorescence anisotropy decay measurements.* Fluorescence anisotropy ( $r$ ) measures the depolarization of the fluorescence emission of a fluorophore due to energy transfer to another molecule with a different orientation or molecular rotation caused by Brownian motion. As molecular motion depends on the size of the fluorophore and on local environment factors such as viscosity and molecular confinement, fluorescence anisotropy measurements can provide useful information on the molecular size and the mobility of the fluorophore<sup>32</sup>. In the case of continuous excitation, the steady-state anisotropy  $\bar{r}$  is given by Eq. (7)

$$\bar{r} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (7)$$

where  $I_{\parallel}$  and  $I_{\perp}$  are the intensities measured with a linear polarizer for emission parallel and perpendicular, respectively, to the electric vector of linearly polarized incident light.

In a fluid environment, the initial uniaxial distribution of photo-selected molecules is usually randomized by rotational diffusion, leading to depolarization of fluorescence. In the case of free rotation, the fluorescence anisotropy decays to zero, while for hindered rotation the anisotropy reaches a time-independent value at long times,  $r_{\infty}$ , called the *residual anisotropy*. The analysis of the temporal decay of the anisotropy yields direct information on the orientational dynamics, which depends on the size and shape of the rotating species and on the fluidity of its microenvironment<sup>31,32</sup>.

For an excited species in a single type of isotropic environment,  $r(t)$  is, in general, given by a linear combination of exponentially decaying functions

$$r(t) = \sum_i \beta_i \exp\left(-\frac{t}{\theta_i}\right) \quad (8)$$

where  $\theta_i$  are the rotational correlation times. Obviously, the sum of the factors  $\beta_i$  yields the initial emission anisotropy  $r_0$ .

**Nanosecond time-resolved fluorescence measurements.** Time-resolved fluorescence measurements in the nanosecond time range were performed on a Horiba Jobin Yvon Nanolog FL3-2lhr spectrofluorometer operating in the time-correlated single photon counting (TCSPC) mode and coupled to a R928P Hamamatsu photomultiplier. The applied detector voltage was set at 950 V. The measurement range of the TCSPC system was 200 ns, the repetition rate of the excitation pulses was 1 MHz, and the sync delay was 50 ns. Decay curves were collected in 4096 channels of a multi-channel analyser using a channel width of 55 ps. For the deconvolution procedure, the dynamic instrument response function (IRF) was determined using a freshly made solution of glycogen in water (half-bandwidth ~1 ns).

To measure the fluorescence lifetimes, the excitation wavelength was set at 321 nm (7aza-tryptophan excitation) and 455 nm (FAD excitation) using pulsed nanoLEDs (Horiba) with pulse duration <1 ns and 1.2 ns, respectively. The fluorescence emission was collected at 380 nm ( $\lambda_{exc} = 321$  nm) and at 520 nm ( $\lambda_{exc} = 455$  nm). The appropriate emission wavelength was set by a built-in the system monochromator. All measurements were

performed using the Data Station v 2.6 software and the lifetime and anisotropy data were analysed using the Jobin Yvon DAS6 v6.6 and FluoFit softwares.

To generate and maintain the light-adapted state of the BLUF proteins, a Thorlabs M385 L2-C1 UV Led ( $\lambda_{\text{exc}} = 385 \text{ nm}$ ) was placed above the sample compartment and covered by a black cloth. The light-adapted state was reached after 10 minutes of illumination. Sample concentration was in the 5–10  $\mu\text{M}$  range. All samples were illuminated continuously during the fluorescence measurements. To eliminate the 385 nm scattered light, an UG11 filter was placed between the sample and the detector. 10 mm  $\times$  1 mm quartz cuvettes were used for the measurements. UV-vis absorption spectra were obtained before and after the fluorescence measurements to monitor the integrity of the light-adapted state, using a Thermo Scientific Evolution 600 UV-vis spectrophotometer.

**Picosecond time-resolved fluorescence measurements.** Time-resolved fluorescence experiments in the ps time range were performed using a spectrally resolved Kerr-Gate femtosecond fluorometer. The setup employs a Kerr shutter<sup>67,68</sup> and allows measuring fluorescence spectra with a resolution of  $\sim 100 \text{ fs}$  and up to the nanoseconds timescale<sup>67</sup>. The setup was described elsewhere<sup>52,72</sup> but briefly, the excitation pulse centered at 390 nm is obtained by frequency-doubling, using a BBO crystal, part of the 780 nm pulse from the Ti:sapphire laser/amplifier system (Quantronix Integra-C) operating at 1 kHz. The remaining 780 nm beam is led through a motorized delay-line and focused into the Kerr medium where it spatially overlapped the fluorescence from the sample. The Kerr medium used was CS<sub>2</sub> (response function width  $\sim 1.2 \text{ ps}$ ). The sample was flowed through the 1 mm pathlength optical cell using a peristaltic pump. To generate and maintain the light-adapted state the sample reservoir was illuminated using a Thorlabs M450LP1 LED ( $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ ). Transient fluorescence spectra were measured on time windows up to 1500 ps for all samples. Global analysis of the time and spectrally resolved data sets in terms of a linear combination of a discrete number of components, each with a distinct exponential rate constant and decay-associated spectrum<sup>69</sup>, was completed using Glotaran<sup>70</sup>.

**Transient infrared spectroscopy.** All transient infrared absorption (TRIR) measurements reported here used the 10 kHz ULTRA facility developed at the Central Laser Facility of the Rutherford Appleton Laboratories which are described in detail elsewhere<sup>71</sup>. As described earlier<sup>9,15,71</sup> ULTRA offers wide tunability in the visible region, a broad bandwidth in the IR probe, sub 100 fs rime resolution and excellent stability. In the present experiments it was used in the visible pump – IR probe geometry. The excitation (pump) wavelength was 450 nm with a pulse energy of a few hundred nJ focussed to a 100 micron spot size. It was checked that the spectra and kinetics were independent of the pump wavelength and pulse energy. IR transmission was measured sequentially for pump-on and pump-off using a 5 kHz mechanical chopper, and the data were processed to provide the TRIR difference spectra.

Received: 4 November 2019; Accepted: 23 January 2020;

Published online: 06 February 2020

## References

- MacHeroux, P., Kappes, B. & Ealick, S. E. Flavogenomics - A genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS J.* **278**, 2625–2634 (2011).
- Losi, A. & Gärtner, W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem. Photobiol.* **87**, 491–510 (2011).
- Conrad, K. S., Manahan, C. C. & Crane, B. R. Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 801–809 (2014).
- Lukacs, A., Eker, A. P., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. H. Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14394–14395 (2008).
- Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nat.* **405**, 586–90 (2000).
- Chaves, I. *et al.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 335–64 (2011).
- Sancar, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* **103**, 2203–37 (2003).
- Masuda, S., Hasegawa, K. & Ono, T. Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using FAD (BLUF) domain of AppA for a signaling state. *Biochem.* **44**, 1215–24 (2005).
- Lukacs, A. *et al.* BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4605–15 (2014).
- Gauden, M. *et al.* Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochem.* **44**, 3653–62 (2005).
- Unno, M., Masuda, S., Ono, T. A. & Yamauchi, S. Orientation of a key glutamine residue in the BLUF domain from AppA revealed by mutagenesis, spectroscopy, and quantum chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5638–9 (2006).
- Obanayama, K., Kobayashi, H., Fukushima, K. & Sakurai, M. Structures of the Chromophore Binding Sites in BLUF Domains as Studied by Molecular Dynamics and Quantum Chemical Calculations. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1003–1010 (2008).
- 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**, 1–14 (2016).
- Masuda, S., Hasegawa, K. & Ono, T. Tryptophan at position 104 is involved in transforming light signal into changes of beta-sheet structure for the signaling state in the BLUF domain of AppA. *Plant. Cell Physiol.* **46**, 1894–901 (2005).
- Brust, R., Lukacs, A. & Haigney, A. Proteins in Action: Femtosecond to Millisecond Structural Dynamics of a Photoactive Flavoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16168–16174 (2013).
- Masuda, S., Tomida, Y., Ohta, H. & Takamiya, K. 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.*, 1223–1230 (2007)
- Laan, W. *et al.* On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochem.* **45**, 51–60 (2006).
- Dragnea, V., Arunkumar, A. I., Yuan, H., Giedroc, D. P. & Bauer, C. E. Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state. *Biochem.* **48**, 9969–9979 (2009).
- Anderson, S. *et al.* Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochem.* **44**, 7998–8005 (2005).

20. 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).
21. Kita, A., Okajima, K., Morimoto, Y., Ikeuchi, M. & Miki, K. Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tl10078, containing a novel FAD-binding blue light sensor domain. *J. Mol. Biol.* **349**, 1–9 (2005).
22. Yuan, H. *et al.* Crystal structures of the Synechocystis photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochem.* **45**, 12687–94 (2006).
23. Jung, A. *et al.* Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12350–12355 (2005).
24. Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 6659–64 (2016).
25. Udvarhelyi, A. & Domratcheva, T. Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: A mechanistic reappraisal. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2888–2897 (2013).
26. Collette, F., Renger, T. & Schmidt am Busch, M. Revealing the functional states in the active site of BLUF photoreceptors from electrochromic shift calculations. *J. Phys. Chem. B* **118**, 11109–11119 (2014).
27. Goyal, P. & Hammes-Schiffer, S. Role of active site conformational changes in photocycle activation of the AppA BLUF photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 1480–1485 (2017).
28. Grinstead, J. S. *et al.* The solution structure of the AppA BLUF domain: insight into the mechanism of light-induced signaling. *ChemBioChem* **7**, 187–93 (2006).
29. Unno, M., Kikuchi, S. & Masuda, S. Structural refinement of a key tryptophan residue in the BLUF photoreceptor AppA by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biophys. J.* **98**, 1949–56 (2010).
30. Toh, K. C. *et al.* On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the AppA BLUF domain. *Biophys. J.* **95**, 312–21 (2008).
31. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications.* (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001).
32. Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* (Springer, 2006).
33. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Phys.* **437**, 55–75 (1948).
34. Okamoto, K. & Sako, Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **46**, 16–23 (2017).
35. Stryer, L. & Haugland, R. P. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 719–26 (1967).
36. Antosiewicz, J. M. & Shugar, D. UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 1: basic principles and properties of tyrosine chromophore. *Biophys. Rev.* **8**, 151–161 (2016).
37. Maeno, A., Matsuo, H. & Akasaka, K. Tyrosine/tyrosinate fluorescence at 700 MPa: a pressure unfolding study of chicken ovomucoid at pH 12. *Biophys. Chem.* **183**, 57–63 (2013).
38. Martin, R. B., Edsall, J. T., Wetlaufer, D. B. & Hollingworth, B. R. A complete ionization scheme for tyrosine, and the ionization constants of some tyrosine derivatives. *J. Biol. Chem.* **233**, 1429–35 (1958).
39. 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**, 249–52 (1978).
40. Prendergast, F. G., Hampton, P. D. & Jones, B. Characteristics of tyrosinate fluorescence emission in alpha- and beta-purothionins. *Biochem.* **23**, 6690–6697 (1984).
41. Pundak, S. & Roche, R. S. Tyrosine and tyrosinate fluorescence of bovine testes calmodulin: calcium and pH dependence. *Biochem.* **23**, 1549–1555 (1984).
42. Alexander Ross, J. B., Laws, W. R., Rousslang, K. W. & Wyssbrod, H. R. Tyrosine fluorescence and phosphorescence from proteins and polypeptides. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Biomedical Applications* vol. 3 1–64 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
43. Oktaviani, N. A. *et al.* Comprehensive Determination of Protein Tyrosine p K a Values for Photoactive Yellow Protein Using Indirect <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. *Biophys. J.* **102**, 579–586 (2012).
44. Schlesinger, S. & Schlesinger, M. J. The effect of amino acid analogues on alkaline phosphatase formation in Escherichia coli K-12. I. Substitution of triazolealanine for histidine. *J. Biol. Chem.* **242**, 3369–72 (1967).
45. Twine, S. M. & Szabo, A. G. Fluorescent amino acid analogs. *Methods Enzymol.* **360**, 104–27 (2003).
46. Alexander Ross, J. B., Rusinova, E., Luck, L. A. & Rousslang, K. W. Spectral Enhancement of proteins *in vivo* incorporation of tryptophan analogues. In *Topics in Fluorescence, Protein fluorescence* vol. 6 17–43 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
47. Albani, J. R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins. *J. Fluoresc.* **24**, 105–117 (2014).
48. Laan, W., van der Horst, M. A., van Stokkum, I. H. & Hellingwerf, K. J. Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from Rhodospirillum rubrum: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine? *Photochem. Photobiol.* **78**, 290–7 (2003).
49. Ohki, M. *et al.* Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 8562–8567 (2017).
50. Winkler, A. *et al.* A ternary AppA-PpsR-DNA complex mediates light regulation of photosynthesis-related gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 859–67 (2013).
51. Dijkstra, D. S., Broos, J., Visser, A. J., van Hoek, A. & Robillard, G. T. Dynamic fluorescence spectroscopy on single tryptophan mutants of EII(mtI) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochem.* **36**, 4860–6 (1997).
52. Nag, L., Lukacs, A. & Vos, M. H. Short-Lived Radical Intermediates in the Photochemistry of Glucose Oxidase. *ChemPhysChem* **20**, 1793–1798 (2019).
53. Liu, Z. *et al.* Determining complete electron flow in the cofactor photoreduction of oxidized photolyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 12966–71 (2013).
54. Mataga, N. *et al.* Dynamics and Mechanisms of Ultrafast Fluorescence Quenching Reactions of Flavin Chromophores in Protein Nanospace. *J. Phys. Chem. B* **104**, 10667–10677 (2000).
55. Laptanok, S. P. *et al.* Ultrafast real-time visualization of active site flexibility of flavoenzyme thymidylate synthase ThyX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8924–9 (2013).
56. Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y. & Tanaka, F. Ultrafast Fluorescence Quenching Dynamics of Flavin Chromophores in Protein Nanospace. *J. Phys. Chem. B* **102**, 7081–7084 (1998).
57. Laptanok, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A. & Vos, M. H. Subpicosecond Kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol. Biol.* **1076**, 321–36 (2014).
58. Brazard, J. *et al.* New insights into the ultrafast photophysics of oxidized and reduced FAD in solution. *J. Phys. Chem. A* **115**, 3251–62 (2011).
59. Leenders, R., Van Hoek, A., Van Iersel, M., Veeger, C. & Visser, A. J. Flavin dynamics in oxidized Clostridium beijerinckii flavodoxin as assessed by time-resolved polarized fluorescence. *Eur. J. Biochem.* **218**, 977–984 (1993).
60. Leenders, H. R., Vervoort, J., van Hoek, A. & Visser, A. J. Time-resolved fluorescence studies of flavodoxin. Fluorescence decay and fluorescence anisotropy decay of tryptophan in Desulfovibrio flavodoxins. *Eur. Biophys. J.* **18**, 43–55 (1990).



61. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. & Dutton, P. L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nat.* **402**, 47–52 (1999).
62. Haigney, A. *et al.* Ultrafast Infrared Spectroscopy of an Isotope-Labeled Photoactivatable Flavoprotein. *Biochem.* **50**, 1321–1328 (2011).
63. 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).
64. Haigney, A. *et al.* Vibrational assignment of the ultrafast infrared spectrum of the photoactivatable flavoprotein AppA. *J. Phys. Chem. B* **116**, 10722–10729 (2012).
65. Iwata, T. *et al.* Hydrogen Bonding Environments in the Photocycle Process around the Flavin Chromophore of the AppA-BLUF domain. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 11982–11991 (2018).
66. Broos, J. Biosynthetic incorporation of tryptophan analogs in proteins. *Methods Mol. Biol.* **1076**, 359–70 (2014).
67. Arzhantsev, S. & Maroncelli, M. Design and characterization of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical Kerr gating. *Appl. Spectrosc.* **59**, 206–20 (2005).
68. Schmidt, B., Laimgruber, S., Zinth, W. & Gilch, P. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B* **76**, 809–814 (2003).
69. van Stokkum, I. H., Larsen, D. S. & van Grondelle, R. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**, 82–104 (2004).
70. Snellenburg, J. J., Laptienok, S., Seger, R., Mullen, K. M., Stokkum, I. H. M. & van. Glotaran : A Java-Based Graphical User Interface for the R Package TIMP. *J. Stat. Softw.* **49**, 1–22 (2012).
71. Greetham, G. M. *et al.* ULTRA: A Unique Instrument for Time-Resolved Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **64**, 1311–1319 (2010).
72. Nag, L., Sournia, P., Myllykallio, H., Liebl, U. & Marten, H. Vos, Identification of the TyrOH<sup>•+</sup> Radical Cation in the Flavoenzyme TrmFO. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11500–11505 (2017).
73. Gil, A. *et al.* Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **139**(41), 14638–14648 (2017).

## Acknowledgements

A.L. acknowledges funding from EFOP-3.6.2-16-2017-00005. A.L. and M.H.V. are grateful to the “Balaton” project (NKFIH 2017-2.2.5-TÉT-FR-2017-00005 and PHC Balaton 40173VE) for funding the travel exchanges. S.R.M. is grateful to EPSRC for financial support (EP/N033647/1 and EP/M001997/1). P.J.T. thanks NSF for financial support (MCB-1817837). We thank Éva Hoffmanné Simon for excellent technical assistance in protein expression and purification.

## Author contributions

All raw data and metadata from experiments and simulations are available from the corresponding author on request. A.L., K.R., S.R.M. and P.J.T. designed the experiments. I.P. developed the protocol for the production of the 7 $\alpha$ -W104/W64F AppA<sub>BLUF</sub> mutant and Z.F. made the constructs of all AppA<sub>BLUF</sub> mutants. Experimental work was conducted by K.K., S.M.K., K.R., I.P., R.K., Z.F., J.I., J.O., G.G., M.H.V. and A.L. Experimental data were analysed by K.K., S.M.K., K.R., M.N., M.H.V. and A.L. and results discussed by all authors. S.M.K and A.L. wrote the paper. The project was conceived by A.G., J.T.C., S.R.M., P.J.T. and A.L.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59073-5>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## Supplementary Information

### Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy

Kristof Karadi<sup>1,2</sup>, Sofia M. Kapetanaki<sup>1,2</sup>, Katalin Raics<sup>1</sup>, Ildiko Pecs<sup>1</sup>, Robert Kapronczai<sup>1</sup>, Zsuzsana Fekete<sup>1</sup>, James Iuliano<sup>3</sup>, Jinnette Tolentino Collado<sup>3</sup>, Agnieszka Gil<sup>3</sup>, Jozsef Orban<sup>1</sup>, Miklos Nyitrai<sup>1,2</sup>, Greg M. Greetham<sup>4</sup>, Marten H. Vos<sup>5</sup>, Peter J. Tonge<sup>3</sup>, Stephen R. Meech<sup>6</sup>, Andras Lukacs<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

<sup>2</sup> Szentagothai Research Center, University of Pecs, 7624 Pécs, Hungary

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Stony Brook University, Stony Brook, NY, 11794-3400, USA

<sup>4</sup> Central Laser Facility, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK.

<sup>5</sup> LOB, CNRS, INSERM, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, 91128 Palaiseau Cedex, France

<sup>6</sup> School of Chemistry, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK

*Calculation of distance R between Trp104 and flavin in the dark- and light-adapted states of 7aza-W64F/W104F.*

#### *I. From fluorescence lifetime measurements of Trp104:*

The FRET efficiency was calculated using equation (1):  $E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$  (1),

where  $\tau_{DA}$  is the fluorescence lifetime of the donor (tryptophan analogue) in the presence of the acceptor (FAD) and  $\tau_D$  is the fluorescence lifetime of the donor alone. Using the average lifetimes (Table 1), we obtain:

$$E_{dark} = 1 - \frac{6.79}{8.73} = 1 - 0.77 = 0.23, \text{ for the dark-adapted state and}$$

$$E_{light} = 1 - \frac{5.24}{8.73} = 1 - 0.6 = 0.4, \text{ for the light-adapted state}$$

The average distance between the tryptophan analogue and the flavin can be inferred from the FRET efficiency using equation (2):  $E = \frac{1}{1 + (\frac{R}{R_0})^6}$  (2), where  $R$  is the distance between the donor and the acceptor and  $R_0$  is the Förster radius, the distance between the two fluorophores in the case of 50% transfer efficiency.

$$R_0 \text{ is given from equation (3) } R_0 = 9.78 * 10^3 [J(\lambda)\kappa^2 n^{-4} \Phi_D]^{1/6} \text{ \AA} \text{ (3),}$$

where  $J(\lambda)$  is the integral of spectral overlap between donor emission and acceptor absorption at  $\lambda$  nm,  $n$  is the refractive index typically assumed to be 1.4 for biomolecules<sup>1</sup> and  $\Phi_D$  is the quantum yield of the donor ( $\Phi_{7azaTrp} = 0.01$  and  $\Phi_{Trp} = 0.13$ )<sup>2</sup>.  $\kappa^2$  is the orientation factor that can be calculated from equation (4),  $\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2$  (4)

where  $\theta_T$  is the angle between the transition dipole moments of the donor and the acceptor, and  $\theta_D$  and  $\theta_A$  are the angles between these dipole moments and the separation vector. A value of  $\kappa^2 = 2/3 = 0.66$  is assumed for randomized orientation and  $\kappa^2 = 0$  for perpendicular orientation.

Anisotropy decay of 7AW in dark-adapted state has shown that the tryptophan analogue is able to move freely, therefore we used  $\kappa^2 = 2/3$  for calculating  $R_0$  in this case. Slower rotational correlation time observed in the light adapted case indicated a restricted motion of 7AW, therefore we used the Trp<sub>in</sub> structure (pdb:1YRX) to calculate  $\kappa^2$  for the light-adapted state. Based on the structure (pdb:1YRX), the transition dipole moment of the tryptophan forms an  $\theta_A = 80^\circ$  angle with the intersection line of the planes containing the flavin and the tryptophan (Fig. S6). The two planes form a  $\phi \sim 63^\circ$  which results in a  $\kappa^2 = 0.02$ . We should note here that there is an uncertainty in the determination of  $\kappa^2$  as the dihedral angle varies between  $63^\circ$  and  $74^\circ$ .

$$\text{From equation (2) we obtain, } R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} \text{ (5).}$$

In the dark-adapted state  $R_0$  between 7AW and FAD is 16.8 Å [Förster distance calculator (version 1.0c, UMASS)] using the assumption that the tryptophan can freely rotate thus the value of  $\kappa^2$  is 2/3. The distance calculated is  $R = 16.8 * \sqrt[6]{\frac{1-0.23}{0.23}} = 20.5$  Å for the dark-adapted state.

For the light-adapted state we calculated  $\kappa^2 = 0.02$ , thus  $R_0 = 8.9$  Å and the distance calculated between the tryptophan and the flavin is  $R = 8.9 * \sqrt[6]{\frac{1-0.4}{0.4}} = 9.5$  Å.

## II. Acceptor enhancement method:

*Calculation of distance R between Trp104 and flavin in the dark state of 7aza-W104/W64F.*

Using the acceptor enhancement approach<sup>1,3</sup> the FRET efficiency is calculated by equation (2)

$$E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] \quad (2)$$

where  $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})$  and  $\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})$  are the extinction coefficients of the acceptor and donor at the donor excitation wavelength ( $\lambda_D^{ex} = 310$  nm), and  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  and  $I_A(\lambda_A^{em})$  are the acceptor intensity in the presence and the absence of the donor at the acceptor emission wavelength ( $\lambda_A^{em} = 505$  nm). In particular,  $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex}) = \varepsilon_{FAD}(310nm) = \varepsilon_{FAD}(450nm) * \left(\frac{OD_{310nm}}{OD_{450nm}}\right) = 8500 * 0.101 = 860.32$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. The absorption spectrum of flavin is shown in Figure S4.

$\varepsilon_D(\lambda_D^{ex}) = \varepsilon_{7azaTRP}(310nm) = \varepsilon_{7azaTRP}(max) * \left(\frac{OD_{310nm}}{OD_{max}}\right) = 1013$  cm<sup>-1</sup>. The absorption spectrum of 7-aza Trp is shown in Figure S1a.

The molar extinction coefficient of FAD is  $\varepsilon_{FAD} = 8500$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 450 nm<sup>4</sup>,

the molar extinction coefficient of tryptophan is  $\varepsilon_{TRP} = 6000$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> at 290 nm<sup>5</sup>.

For the 7aza-W104/W64F mutant,  $I_{AD}(\lambda_A^{em})$  is 78940 cps in the dark state (Figure 3f).

The emission intensity of the 7aza-W104/W64F mutant in the absence of the donor [ $I_A(\lambda_A^{em})$ ]

was calculated using the ratio with  $\frac{I_{350nm}(\lambda_{FAD}^{505nm})}{I_{310nm}(\lambda_{FAD}^{505nm})} = 4.71$  measured in the of W64F mutant.



Using 310 nm and 350 nm excitation, tryptophans are not excited the W64F mutant, so the fluorescence from the flavin is the fluorescence intensity of the acceptor in the absence of the donor. Calculating thus the fluorescence intensity of FAD in the dark adapted state for the 7aza-W104W64F mutant is

$$I_A(\lambda_A^{em}) = I_{\lambda_{exc}=310nm}(\lambda_{FAD}^{505nm}) = \frac{I_{\lambda_{exc}=350nm}}{4.71} = \frac{246978}{4.71} = 52437 \text{ cps}$$

Therefore the FRET efficiency for the 7aza-W104/W64F mutant,  $E_{dark}$  is

$$E_{dark} = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] = \frac{860.32}{1,013} \left[ \frac{78940}{52437} - 1 \right] = 0.42$$

Due to the distance dependence of FRET (equation 1) we can estimate a distance

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} = 16.8 \sqrt[6]{\frac{1-0.42}{0.42}} = 17.7 \text{ \AA} \text{ between Trp and FAD in the dark state.}$$

For the 7aza-W104/W64F,  $R_0=16.8 \text{ \AA}$

*Calculation of distance R between Trp104 and flavin in the light state of 7aza-W104/W64F mutant.*

Using the same methodology, we calculated a distance R between Trp104 and flavin in the light state,  $R= 9.7\text{\AA}$ . In detail, the FRET efficiency for the 7aza-W104/W64F mutant in the light state,  $E_{light}$  is calculated as

$$E_{light} = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left[ \frac{I_{AD}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right] = \frac{860.32}{1,013} \left[ \frac{66940}{39377} - 1 \right] = 0.59$$

Therefore, the distance between Trp104 and FAD in the light state is calculated to be:

$$R = R_0 \sqrt[6]{\frac{1-E}{E}} = 8.9 \sqrt[6]{\frac{1-0.59}{0.59}} = 8.3 \text{ \AA}.$$

Here we used  $\kappa^2=0.02$ . In this case  $R_0= 8.9 \text{ \AA}$  which results in a donor-acceptor distance equal to  $8.3 \text{ \AA}$ .

III. *Distance determination from electron transfer theory using transient fluorescence spectroscopy measurements*

Using the simple empirical expression known as the Dutton ruler (equation 4)<sup>6</sup>

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6R - 3.1 \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{\lambda} \quad (4)$$

that relates the electron transfer rate ( $k_{ET}$ ) with the edge-to-edge distance ( $R$  in Å) between two reaction centres, assuming a barrierless electron transfer ( $\Delta G = -\lambda$ ), where  $\Delta G$  is the driving force for the electron transfer between the electron donor and the excited flavin and  $\lambda$  is the reorganization energy, we estimated the distances between the flavin and the tryptophan for the dark-adapted state and the light-adapted state.

$$\text{Dark W64F: } k_{ET} = \frac{1}{504 \text{ ps}} = 1.98 * 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ and } R_{\text{dark}} = 9.5 \text{ \AA}$$

$$\text{Light W64F: } k_{ET} = \frac{1}{11 \text{ ps}} = 90 * 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ and } R_{\text{dark}} = 6.7 \text{ \AA}$$

$$\text{Y21FY56FW64F: } k_{ET1} = \frac{1}{200 \text{ ps}} = 5 * 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ and } R = 8.85 \text{ \AA}$$

$$k_{ET2} = \frac{1}{36.5 \text{ ps}} = 27.4 * 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ and } R = 7.6 \text{ \AA}$$

**Supplementary Table 1.** List of primers for generation of different AppA BLUF constructs.

W64F forward	GGGCGTCTTCTTCCAG <u>TTC</u> CTCGAAGGCCGCCCG
W64F reverse	CGGGGCGGCCTTCGAGGAACTGGAAGAAGACGCC
W104A forward	CGCCGCTTTGCGGGAG <u>GCG</u> CACATGCAGCTCTCC
W104 reverse	GGAGAGCTGCATGTGCGCTCCCGCAAAGCGGCG
Y21F forward	TCTGGTTTCCTGCTGCT <u>TTC</u> CGCAGCCTGGCGGCC
Y21F reverse	GGCCCGCCAGGCTGCGGAAGCAGCAGGAAACCAGA
Y56F forward	GACCGGCGCGCTCTTCT <u>TTC</u> AGCCAGGGCGTCTTCT
Y56F reverse	AGAAGACGCCCTGGCTGAAGAAGAGCGCGCCGGTC

## Figure legends

**Figure S1.** **A)** Absorption spectra of L-Tyrosine (red line), L-Trp (black line) and 7-aza Trp (blue line) in 50mM Tris, 10 mM NaCl, pH 8.00 and L-Tyrosine (green line) in glycine/NaOH, pH 11.0. **B)** Emission spectra of L-Tyrosine (pH=8.0,  $\lambda_{exc}$ =280 nm) (red line), L-Tyrosine (pH=11.0,  $\lambda_{exc}$ =295 nm) (green line), L-Tryptophan (pH=8.0,  $\lambda_{exc}$ =295 nm) (black line), and 7-aza Tryptophan (pH=8.0,  $\lambda_{exc}$ =310 nm). The emission spectra were scaled for visualization purposes. Note that the quantum yield ( $\phi$ ) is 0.13 for L-Trp, 0.01 for 7-aza Trp and 0.14 for L-Tyr

**Figure S2.** **A)** Absorption spectra of W64F AppA BLUF in the dark-adapted state (black) and light-adapted state (red). **B)** shows the recovery kinetics to the dark-adapted state monitored at 490 nm after illumination at 385 nm.

**Figure S3.** (A, B) Transient ps fluorescence spectra for the AppA W64F (dark- and light-adapted state) at 0.4 ps, 60 ps, 298 ps, 999 ps and 0.4 ps, 4.9 ps, 9.9 ps, 29.9 ps and 198 ps, respectively and (C) AppA Y21F/Y56F/W64F at 0.4 ps, 27.9 ps, 79.9 ps and 398 ps.

**Figure S4.** Absorption spectrum of FAD in PBS buffer.

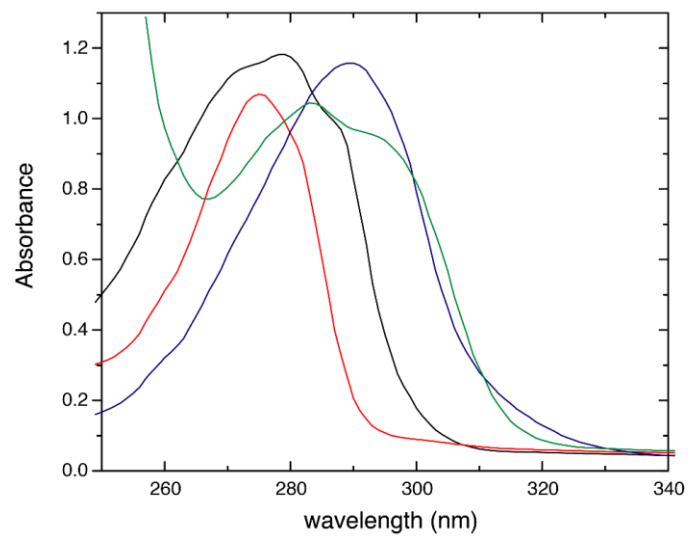
**Figure S5.** Fluorescence anisotropy decay of the Y21F/Y56F/W64F AppA BLUF mutant

**Figure S6.** Relative orientations of the transition dipole moments of FAD and Trp104 (pdb:1YRX)

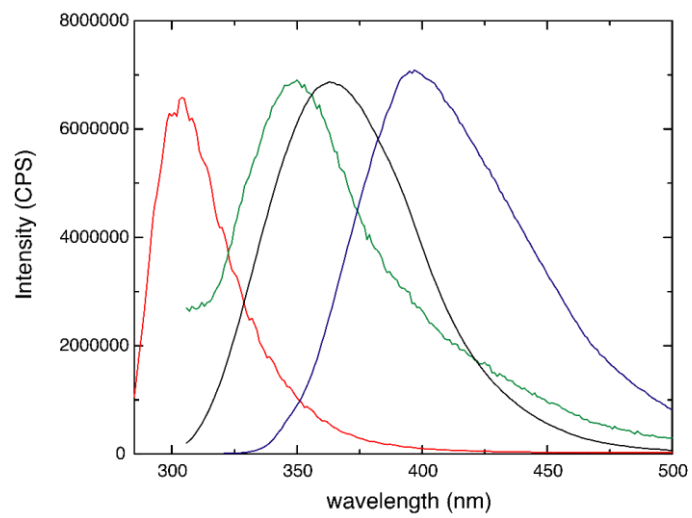
Figure S7. Absorption spectra of the Y21FY56FW64F and the Y21FY56FW64FW104F mutant.

**Fig. S1**

**A**

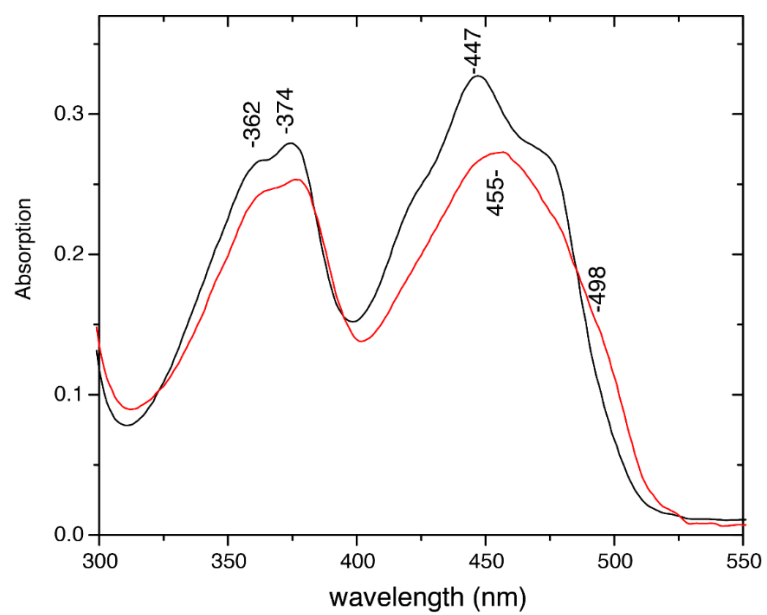


**B**

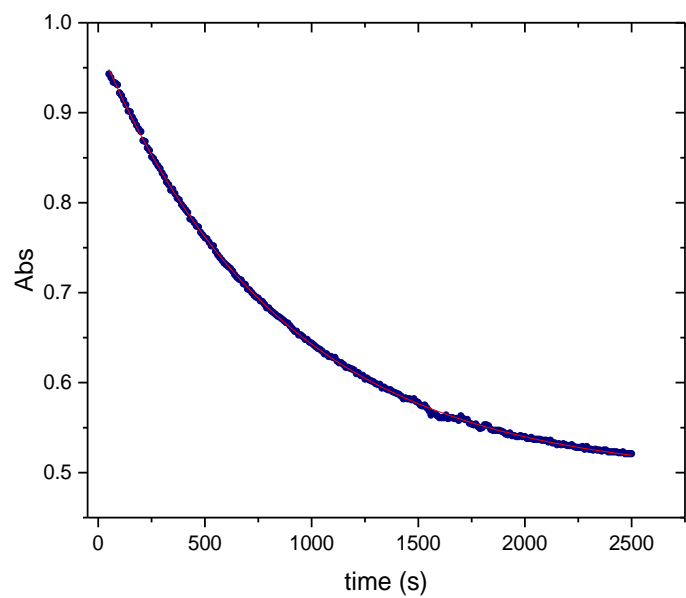


**Fig. S2**

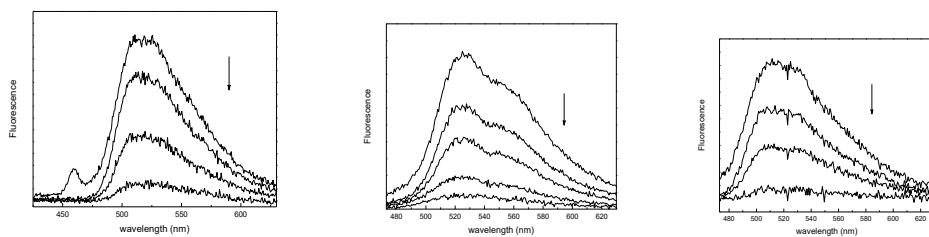
**A**



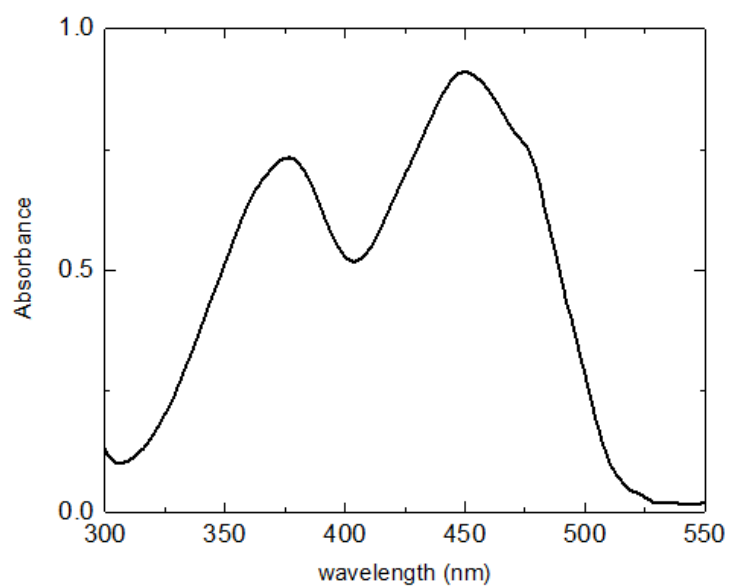
**B**



**Fig. S3**



**Fig. S4**



**Fig. S5**

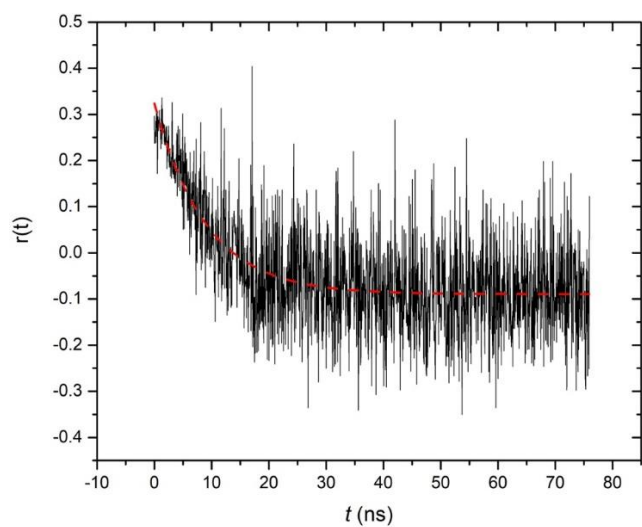


Fig S6.

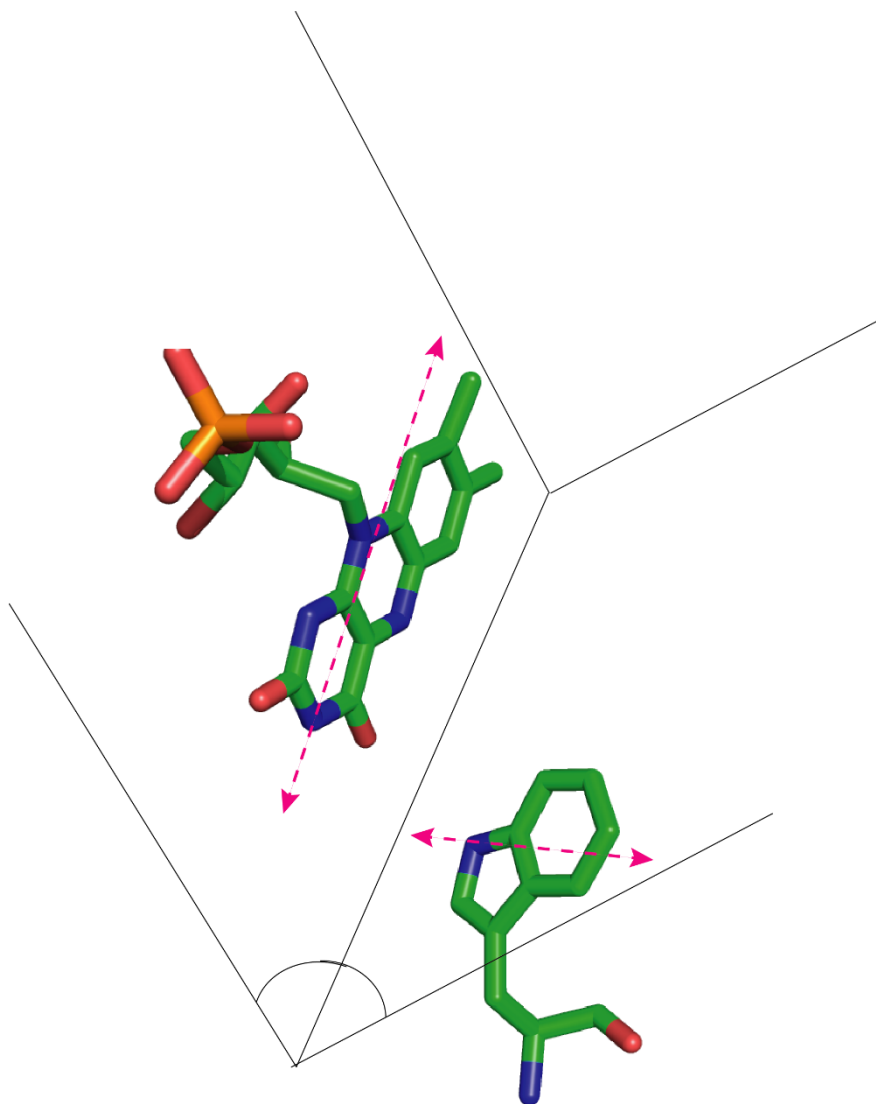
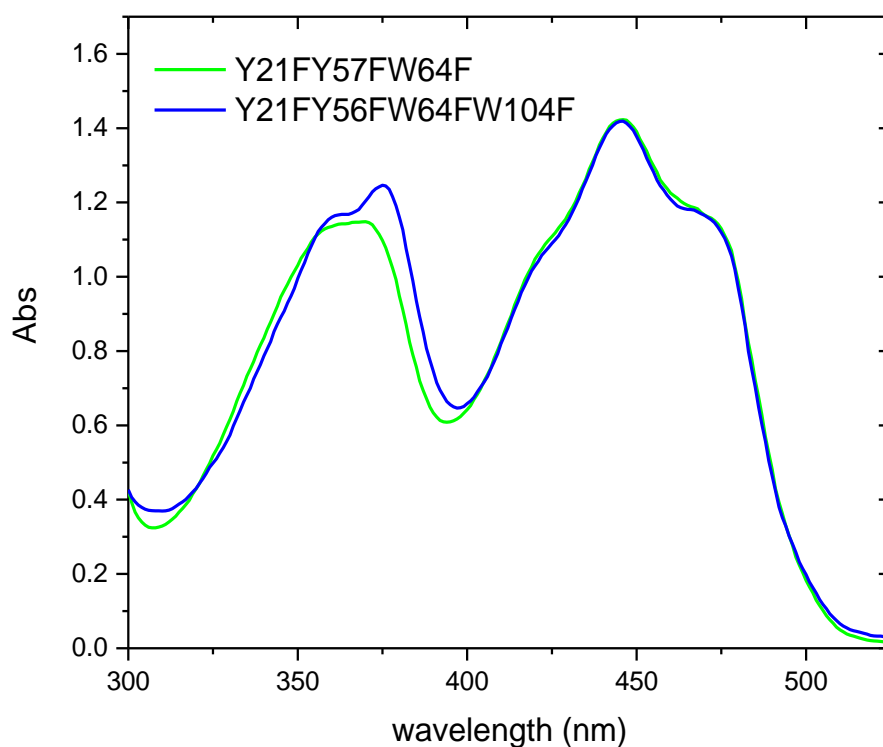




Fig S7.



## References

1. Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 2006).
2. Alexander Ross, J. B., Rusinova, E., Luck, L. A. & Rousslang, K. W. Spectral Enhancement of proteins in vivo incorporation of tryptophan analogues. in *Topics in Fluorescence, Protein fluorescence* **6**, 17–43 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
3. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001).
4. Kraft, B. J. *et al.* Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: A novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. *Biochemistry* **42**, 6726–6734 (2003).

5. Twine, S. M. & Szabo, A. G. Fluorescent amino acid analogs. *Methods Enzymol* **360**, 104–27 (2003).
6. Dutton, P. L., Page, C. C., Moser, C. C. & Chen, X. Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47–52 (1999).