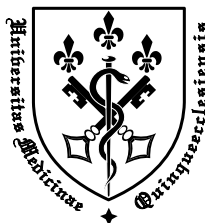


Ph.D. tézisfüzet

AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia és ultragyors spektroszkópiai eszközökkel

Karádi Kristóf Kálmán

Pécs, 2020



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Ph.D. tézisfüzet

AppA funkcionális dinamikájának vizsgálata fluoreszcencia és ultragyors spektroszkópai eszközökkel

Karádi Kristóf Kálmán

2020

Témavezető: Dr. Lukács András

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

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

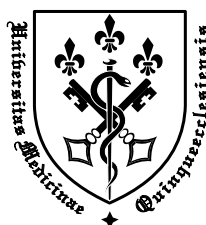
Program: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130/1993)

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Támogatás:

EFOP-3.6.1-16-2016-00004

EFOP-3.6.2-16-2017-00005



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Bevezetés

Flavint használó fotoreceptorok

Eddigi ismereteink alapján több száz enzim¹ tartalmaz flavint valamely formájában, azonban ezek közül az enzimek közül csak néhány fotoaktív^{2,3}. 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 fehérjékre⁴, jelen munka során utóbbi került előtérbe.

Flavin adenint használó kék-fény szenzorok (BLUF domain)

A BLUF-domén fehérjék számos algában és a szekvenált baktériumok mintegy tíz százalékában megtalálhatók^{5,6}. A BLUF-domén proteinek számos biológiai funkciót töltenek be: szerepet kapnak a fotoszintetikus gének bioszintézisében, biofilm képződésben és fényelkerülési válasz kialakulásában is^{7,8}. 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 történnek⁵. 2002-ben két egymástól teljesen független kutatócsoport egy időben fedezte fel őket. Az egyik csoport fotoszintetikus gének expressziójának szabályozását vizsgálta *Rhodobacter sphaeroideben*^{7,9}, míg a másik csoport *Euglena gracilis* alga fényelkerülési válaszát kutatta¹⁰. 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^{11,12}. 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^{5,13}.

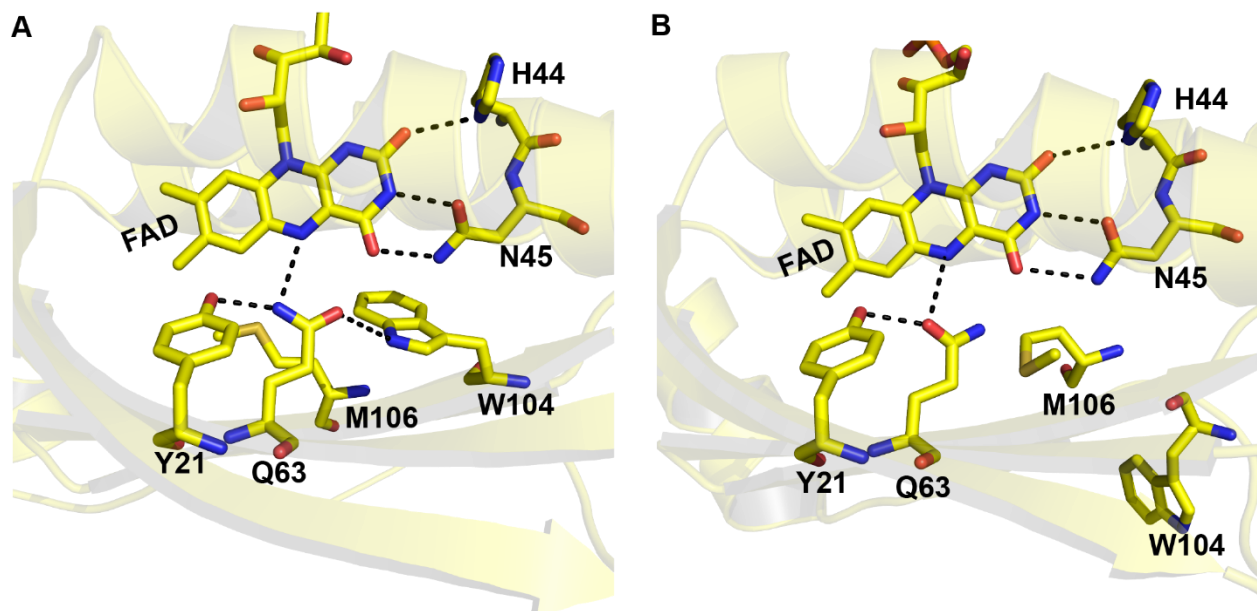
AppA

Az AppA-t 1995-ben fedezték fel¹⁴ 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 A⁵. A fehérje vizsgálata során kiderült, hogy a protein az N-

terminálisnál egy flavint köt, amely alapján feltételezték, hogy redox-folyamatokban játszik szerepet¹⁵. 2002-ben fedezték fel^{7,9}, 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 transzkripcióját⁵.

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 megvilágítás esetén^{16,17}. 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^{5,18–23}.

A BLUF-domén szerkezete



1. 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 alkot⁴. A kék-fény abszorpciója a tetrád hidrogén-kötés hálózatát rendezi át és ez

hozza 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.

A tetrád hidrogén-kötés rendszerében bekövetkezett változás jól megfigyelhető a fehérje IR spektrumában: az FAD $C_4 = O_4$ karbonil rezgéséhez rendelt hullámszám érték ²⁴ 20 cm^{-1} -rel csökken ^{25,26}. 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 ^{4,25-29}.

BLUF-domén W104

Az általunk vizsgált W104 szintén fontos tényező, mivel mutációja a fotoaktiváció folyamatának jelentős megváltozását eredményezi ^{4,30}. Azokban a mutációkban, ahol ezt a triptofánt alaninra cserélték AppA_{BLUF} 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 AppA_{BLUF} mutáns esetében ^{8, 31}. Egy másik vizsgálat során, ahol az említett triptofánt fenilalaninra cserélték AppA_{BLUF}-ben, 1.5-szeresére nőtt a fotoaktiváció kvantumhatásfoka, míg a világos állapotból sötét állapotba való visszatéréshez szükséges relaxációs sebesség enyhe növekedést mutatott ³². A W104A mutáció a teljes hosszúságú fehérje esetén gátolja a vörös eltolódást ³³, lényegében érzéketlenné téve a fehérjét a kék-fényre, ezzel gátolva annak megfelelő működését ³¹.

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 ³⁴. Ezzel szemben Ilme Schlichting csoportja úgy találta ³⁵, hogy a W104 a flavintól elfelé mutat mind sötét, mind világos állapotban. Más BLUF domén fehérjék kristályszerkezet alapján, úgymint a PixD ^{36,37}, a BlrB ³⁸ és az OaPAC ³⁹ esetén ugyanez a triptofán szintén elfelé mutatott. Sőt az Slr1694 protein szerkezeti modellje alapján csupán tizből egy kristallográfiai alegység triptofánja állt a flavin irányába, míg a többi kifelé mutatott ³⁷.

Udvarhelyi és társai ⁴⁰, valamint Collette és társai ⁴¹ egymástól függetlenül úgy vélték, hogy a triptofán a sötét állapotban a flavintól elfelé mutat, míg Goyal és Hammes-Schiffer ⁴² előzőektől

független energetikai számításuk alapján azt állították, hogy mindkét elhelyezkedés lehetséges, sőt a befele mutató a stabilabb. NMR szerkezeti kísérletek ⁴³, valamint UV rezonancia Raman kísérletek is a befele mutató állapotot erősítették meg a sötét állapot vizsgálata során ⁴⁴. Fluoreszcencia kísérletek szerint a triptofán nincs teljesen kitéve az oldószernek, ettől függetlenül a pozíciója továbbra is vitatott maradt ^{4,33,45}.

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.

Felhasznált anyagok és eszközök

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_{BLUF} 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 ⁴⁶. 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_{BLUF}-ből.

Az Y21F/Y56F/W64F/W104F AppA_{BLUF} 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_{BLUF}-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_{600 nm} 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 ⁴⁷. 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 ⁴⁶. Az apoprotein a protein expresszió során keletkezett, és méretkizáró kromatográfiával különítettük el.

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 küvetta segítségével.

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.

Nanoszekundomos 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 analízátor segítségével rendeztük, 55 ps-os csatornaszélesség mellett. A dekonvolúciós művelet elvégezhetősége érdekében az impulzusválasz függvényt vízben oldott glikogén segítségével vettük fel (félértékszélesség $\sim 1\text{ns}$).

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 $< 1\text{ ns}$ 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 μM -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.

Pikoszekundumos idő-felbontásos fluoreszcencia mérések

Idő-felbontásos pikoszekundumos tartományba eső méréseket spektrálisan felbontott Kerr-kapuzott femtoszekundumos fluoriméterrel végeztünk. Az elrendezés Kerr-zárat alkalmaz ^{48,49}, és lehetőséget kínál arra, hogy a fluoreszcens spektrumot közel 100 femtoszekundumos és maximum néhány nanoszekundumos időskálán vegyük fel ⁵⁰. 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 CS₂ 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 ⁵¹, a Glotaran szoftverrel végeztük el ⁵².

Tranziens infravörös spektroszkópia

Az infravörös tranziens abszorpciós (TRIR) mérések a Rutherford Appleton Laboratories Central Laser Facility 10 kHz ULTRA rendszerében készültek ⁵³. 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 cm^{-1} , így a méréseink tipikusan az $1300\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$ -es tartományba estek.

Eredmények

FRET mérések

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

A 7-aza-Trp analóg (7AW) használatának előnyei

A W104-en kívül az APPA_{BLUF} 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. Annak érdekében, hogy elkerüljük a két tirozin (Y21 és Y56) fluoreszcencia emisszióját, az APPA_{BLUF} vizsgálatokor a 295 nm-t választottuk gerjesztő hullámhossznak, ugyanis ebben az esetben a tirozin abszorpció minimális.

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

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

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^{54,55}. Ez általában 10.5-nél magasabb pH-n következik be, mely a szabad tirozin pKa értéke⁵⁶. 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 is⁵⁷⁻⁶⁰.

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.

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.

7-aza-triptofánt 50 évvel ezelőtt építettek először fehérjébe⁶¹, 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 rendelkezik a kanonikus triptofánhoz vagy más triptofán analógokhoz képest^{62,63}. 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 képest⁶³.

A 7-aza-triptofán 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.

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.

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

FRET: 7-aza-W104/W64F AppA_{BLUF} fluoreszcencia élettartam mérései

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a 7-aza-triptofán és a FAD közötti FRET hatásfokát (E) idő korrelált egy foton számlálásos (TCSPC) méréseket végeztük az apoproteinen és a proteinen sötét és világos állapotokban.

A FRET hatásfokot a következő egyenlettel számoltuk:

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

Ahol τ_{DA} a 7-aza-triptofán donor fluoreszcencia élettartama a FAD akceptor jelenlétében, τ_D pedig az önálló donor fluoreszcencia élettartama.

Kiszámolva a FRET hatásfokot az átlag élettartamokat használva, sötét állapot esetében 23%-os hatásfokot kaptunk, a világos állapot esetében pedig 40%-osat. A triptofán és a flavin átlagos távolságát ezen értékekből becsültük. Így sötét állapot esetén a 7-aza-triptofán és flavin távolságot 20.5 Å-nek becsültük, miközben a világos állapot esetén a triptofán és a flavin távolsága 9.5 Å-nek adódott.

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 ^{64,65}. A FRET hatásfokot a következő egyenlettel számolhatjuk:

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

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 ($\lambda_A^{em} = 505 \text{ nm}$).

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 hatásfokot

$E_{sötét} = 42\%$ 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 ^{25,66}.

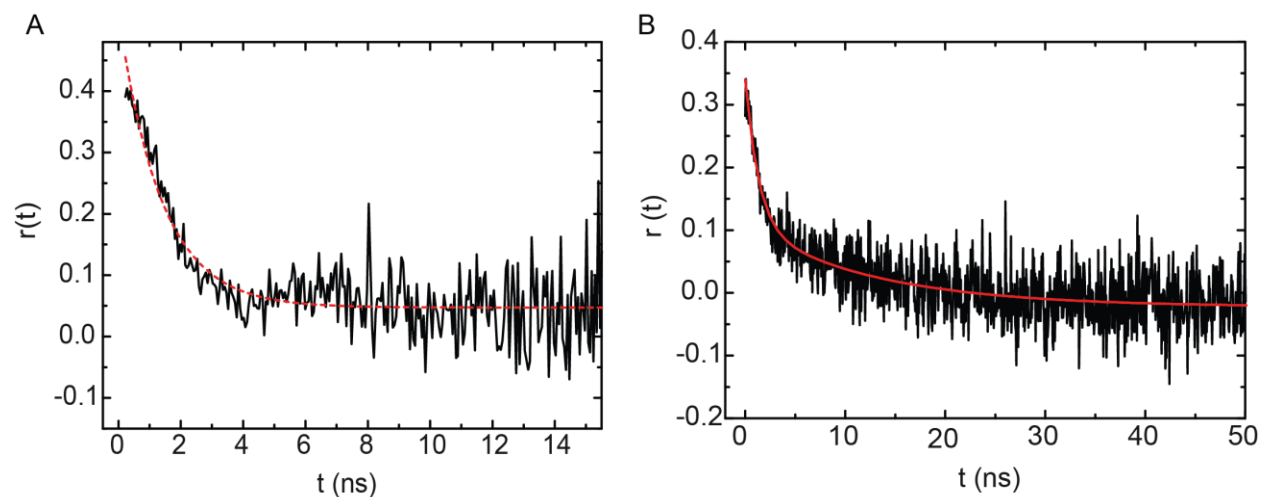
7-azaTrp-W64F akrilamid kioltási mérései

Annak érdekében, hogy a 104-es triptofán hozzáférhetőségéről képet kapjunk, fluoreszcencia kioltási méréseket is végeztünk, megismételve a szakirodalom egy korábbi kísérletét ³³. 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 kioltási 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_{kint} pozícióban van.

Anizotrópia mérések

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



2. ábra Fluoreszcencia anizotrópia lecsengése 7-aza-W104/W64F AppA_{BLUF} esetén sötét (A) és világos (B) állapotokban.

Egy exponenciális illesztése a következő lecsengési konstansokat szolgáltatja: $\theta_{sötét} = 1.5 \pm 0.06 \text{ ns}$ valamint $\theta_{világos} = 11.1 \pm 0.5 \text{ ns}$. 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 következik⁶⁷. 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.

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 esetében⁶⁸⁻⁷². 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 spektroszkópiát⁵⁰ alkalmaztunk, amivel a W104 helyzetéről és a fotoaktiváció során a kioltó mechanikára gyakorolt hatásairól kívántunk további információt nyerni.

A globális analízis a flavin kapcsán két domináns fluoreszcencia élettartamot talált. A 7-aza-W104/W64F esetén a sötét állapotban jelen van egy $\tau_{sötét} = 500$ ps-os lecsengési konstansú domináns fázis, amely körül-belül ötvénszer 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 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_{BLUF} emissziós spektruma a világos állapotban elveszíti az ~500 nm körüli karakterisztikus rezgési vállát. A változásokat a fluoreszcencia csökkenése kíséri és felerősödött elektron transzferre utalnak világos állapot esetén.

Tranziens infravörös mérések

Az AppA_{BLUF} protein kék fénnel történő megvilágításához kötődő dinamika tanulmányozása érdekében tranziens infravörös méréseket végeztünk a sötét és világos állapotokban az AppA_{BLUF} W64F mutánsan.

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 ($\sim 11 \text{ ns}$) mutatnak a W104 világos állapota esetén, annak rigidebb környezetét tükrözve.²⁶

Konklúziók

Az AppA_{BLUF} 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 ($\sim 11 \text{ ns}$), 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 anizotropia 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.

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 abszorpciók 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; Haßner, 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.

Referenciák

1. 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.
2. 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.
3. Conrad, K. S., Manahan, C. C. & Crane, B. R. Photochemistry of flavoprotein light sensors. *Nature Chemical Biology* (2014) doi:10.1038/nchembio.1633.
4. 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.
5. Masuda, S. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* (2013) doi:10.1093/pcp/pcs173.
6. Losi, A. & Gärtner, W. Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. in *Photochemical and Photobiological Sciences* (2008). doi:10.1039/b802472c.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Iseki, M. *et al.* A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* (2002) doi:10.1038/4151047a.
11. 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.
12. Giraud, E. & Verméglio, A. Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Photosynthesis Research* (2008) doi:10.1007/s11120-008-9323-0.
13. 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).
14. 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.
15. 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.
16. Yoshihara, S. & Ikeuchi, M. Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2004) doi:10.1039/b402320j.
17. 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.

18. 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.
19. 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.
20. Sato, S. *et al.* A large-scale protein-protein interaction analysis in *synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res.* (2007) doi:10.1093/dnares/dsm021.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Haigney, A. *et al.* Ultrafast infrared spectroscopy of an isotope-labeled photoactivatable flavoprotein. *Biochemistry* (2011) doi:10.1021/bi101589a.
25. 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.
26. Lukacs, A. *et al.* BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J. Am. Chem. Soc.* (2014) doi:10.1021/ja4121082.
27. Gauden, M. *et al.* Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* (2005) doi:10.1021/bi047359a.
28. 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.
29. 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.
30. Masuda, S., Hasegawa, K. & Ono, T. A. Tryptophan at position 104 is involved in transforming light signal into changes of β -sheet structure for the signaling state in the BLUF domain of AppA. *Plant Cell Physiol.* (2005) doi:10.1093/pcp/pci208.
31. 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.
32. Laan, W. *et al.* On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochemistry* (2006) doi:10.1021/bi051367p.
33. 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.
34. Anderson, S. *et al.* Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* (2005) doi:10.1021/bi0502691.

35. 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.
36. 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.
37. Yuan, H. *et al.* Crystal structures of the Synechocystis photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry* (2006) doi:10.1021/bi061435n.
38. 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.
39. 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.
40. Udvarhelyi, A. & Domratcheva, T. Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: A mechanistic reappraisal. *J. Phys. Chem. B* (2013) doi:10.1021/jp400437x.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Broos, J. Biosynthetic incorporation of tryptophan analogs in proteins. *Methods Mol. Biol.* (2014) doi:10.1007/978-1-62703-649-8_15.
48. Arzhantsev, S. & Maroncelli, M. Design and characterization of a femtosecond fluorescence spectrometer based on optical Kerr gating. *Appl. Spectrosc.* (2005) doi:10.1366/0003702053085007.
49. 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.
50. Laptinok, 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.
51. 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.

52. 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.
53. Greetham, G. M. *et al.* ULTRA: A unique instrument for time-resolved spectroscopy. in *Applied Spectroscopy* (2010). doi:10.1366/000370210793561673.
54. 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.
55. 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).
56. 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).
57. 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.
58. Prendergast, F. G., Hampton, P. D. & Jones, B. Characteristics of Tyrosinate Fluorescence Emission in α - and β -Purothionins. *Biochemistry* (1984) doi:10.1021/bi00321a063.
59. Pundak, S. & Roche, R. S. Tyrosine and Tyrosinate Fluorescence of Bovine Testes Calmodulin: Calcium and pH Dependence. *Biochemistry* (1984) doi:10.1021/bi00302a032.
60. 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.
61. 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).
62. 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.
63. Twine, S. M. & Szabo, A. G. Fluorescent amino acid analogs. *Methods Enzymol.* (2003) doi:10.1016/S0076-6879(03)60108-4.
64. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of Fluorescence Spectroscopy* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
65. Valeur, B. *Molecular Fluorescence - Principles and Applications. Methods* (2001). doi:10.1002/3527600248.
66. 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.
67. 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(mlt) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochemistry* (1997)

doi:10.1021/bi9629081.

68. Nag, L., Lukacs, A. & Vos, M. H. Short-Lived Radical Intermediates in the Photochemistry of Glucose Oxidase. *ChemPhysChem* (2019) doi:10.1002/cphc.201900329.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.