

PhD értekezés

**Funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia-
és ultragyors spektroszkópiai módszerekkel**

Kilián Balázsné Raics Katalin



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2024

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

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

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

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Dr. Lukács András, Dr. Bódis Emőke

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
Előszó.....	6
1. Fluoreszcencia spektroszkópia.....	7
1.1 A fluoreszcencia jelensége.....	7
1.2 Az abszorpciós spektrofotometria.....	10
1.3 A femtoszekundumos tranziens abszorpciós spektroszkópia.....	14
1.4 A fluoreszcencia emisszió mérése (spektrofluorimetria).....	17
1.5 A triptofán mint alkalmas fluorofór.....	18
1.6 A kvantumhatásfok.....	19
1.7 A fluoreszcencia élettartam és mérése.....	20
1.7.1 A fluoreszcencia élettartam (τ).....	20
1.7.2 Időkorrelált egyfoton számlálás.....	21
1.8 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia.....	25
1.9 Fluoreszcencia kioltás (quenching).....	27
1.10 A fluoreszcencia kioltás mérések kiértékelése.....	33
1.11 Fluoreszcencia anizotrópia.....	35
1.12 Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC).....	36
2. Fotoaktív fehérjék.....	37
2.1 A fotoaktív flavoproteinek.....	37
2.2 Flavin, a fényérzékeny kofaktor.....	40
2.3 A BLUF domén fehérjék.....	43
2.4 Az OaPAC szerkezete és rendeltetése.....	44
2.4.1 Az OaPac spektrális sajátosságai.....	47
2.4.2 A OaPAC fotofizikája.....	49
2.4.3 A D67N mutáns.....	50
2.5 Pirofoszfát esszé.....	51
2.5.1 Pirofoszfát keletkezése ATP hidrolízis során.....	51
2.5.2 Az eljárás.....	51
2.5.3 A pirofoszfát esszé kísérleti kivitelezése.....	53
Célkitűzések.....	55
3. EREDMÉNYEK.....	56
3.1 Fehérjék destabilizációjának fluoreszcencia élettartam eloszlása kioltási (quenching) kísérletekben.....	56
3.1.1 Bevezetés.....	56

3.1.2.	Anyagok és módszerek.....	57
3.1.2.1	Vegyszerek.....	57
3.1.2.2	A fehérjék előkészítése.....	58
3.1.2.3	Fluoreszcencia-élettartam mérések.....	58
3.1.2.4	Az adatok elemzése.....	59
3.1.2.5	Fluoreszcencia kioltási kísérletek.....	60
3.1.2.6	Kísérletek guanidin-hidrokloriddal.....	60
3.1.2.7	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai mérések.....	60
3.1.3	Következtetések.....	60
3.1.3.1	Fluoreszcencia kioltási kísérletek.....	60
3.1.3.2	A triptofán fluoreszcencia élettartam-eloszlásainak elemzése.....	63
3.1.3.3	A GuHCl denaturáló hatása.....	65
3.1.3.4	CD-spektroszkópiai kísérletek.....	67
3.1.3.5	Az adatok értelmezéséhez javasolt modell.....	68
3.1.4.	Konklúzió.....	72
3.2	Az elektron transzfer szerepe az OaPAC funkcionális dinamikájában.....	73
3.2.1	A vad típusú OaPAC és D76N mutáns expressziója és tisztítása.....	73
3.2.2	Tranziens abszorpciós mérések.....	74
3.2.3	Ultrarövid tranziens fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek.....	80
3.2.4	cAMP hozam mérések.....	84
3.2.5	Visszatérési kísérletek.....	86
3.2.6	Differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérések.....	87
3.2.7	Nukleotid-kötési vizsgálatok fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel.....	89
	Záró gondolatok, értelmezés.....	91
	Összefoglalás, következtetések.....	92
3.3	Elektrontranszfer és fluoreszcencia kioltás – kapcsolat a két projekt közt.....	94
	Irodalomjegyzék.....	97
	Közlemények.....	101
	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	101
	További publikációk.....	101
	Köszönetnyilvánítás.....	102

Rövidítések jegyzéke

AC – adenilát cikláz

AppA - Activation of Photopigment and Puc expression A

ATP – adenzin trifoszfát

BBO - β -bárium borát

BLUF domén – Blue Light Using Flavin domén – Kék fényt érzékelő flavint tartalmazó domén

cAMP – ciklikus adenzin monofoszfát

EAS – Evolution associated spectra

ET - elektrontranszfer

FAD – Flavin adenin dinukleotid

FAD_{OX} – Oxidált flavin

FAD^{•-} - a flavin anionos szemikín gyöke

FADH[•] - a flavin semleges szemikín gyöke

FADH₂ – a flavin semleges hidrokín gyöke

FADH⁻ - a flavin anionos hidrokín gyöke

FMN – Flavin mononukleotid

FWHM - Full Width at Half Maximum – félérték-szélesség

GOX – glükóz oxidáz

IP - inorganikus pirofoszfát

MESG - 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside

OaPAC – Fotoaktivált adenilát cikláz az *Oscillatoria acuminata* baktériumból

PAC – fotoaktivált adenilát cikláz

PCET – proton kapcsolt elektron transzfer

PMT - Photomultiplier Tube – fotoelektron sokszorozó

PNP - purine nucleoside phosphorylase

PPi – pirofoszfát

TA – tranziens abszorpció

WT - wild type - vad típus

Előszó

„Miért fordul a Nap felé a napraforgó? Honnan tudja a fecske, hogy merre van Afrika? Az UV fényben világító tonik fényét miért lehet egy másik oldattal megszüntetni?” Gyerekkorunk kérdéseit - ha mélyebben belegondolunk - nem is olyan kézenfekvő helyesen megválaszolni. Vagyis a válaszadásnak is léteznek fokozatai. Gyerekként nem is gondoltam volna, hogy milyen mélyre lehet ásni ezekből a kérdésekből kiindulva és hogy egyetlen picurka részlet beazonosítása mekkora előkészületet és végül micsoda örömet tud majd jelenteni.

A fény szerepe az élővilágban vitathatatlanul jelentős; így a kultúránk, vallásunk, a művészet egyik meghatározó szimbóluma is. Nem csoda, hogy a jelenléte vagy éppen a hiánya komoly befolyással van természetes és mesterséges rendszereinkre.

A fény makroszkopikus időskálán bekövetkező hatásait akár szemmel láthatjuk, bizonyos folyamatokat karórával mérhetünk. Ha azonban a fény hatására azonnal reagáló parányi molekulák első ébredőire és azok jeltovábbítási lépéseire vagyunk kíváncsiak, találcónynak kell lennünk. A legnagyobbat kell összegyűrnünk a legkisebbel: vagyis a fénysebességet használjuk, hogy aztán elképzelhetetlenül rövid időskálákon zajló lépésekre lassíthassunk. Az ultragyors lézerek szenzációs forradalmával és zseniális mérési módszerek kidolgozásával lehetővé vált a femtoszekundumos lézerimpulzussal meglepett biológiai rendszer pikoszekundumos időskálákon bekövetkező változásainak üldözése, követése – akár egyedi elektronok molekuláról molekulára való szökkenésének konzisztens spektroszkópiái válaszai. Lenyűgöző. Témavezetőm, Dr. Lukács András, molekuláris mozinak nevezi a tomográfszerű pumpa-próba rendszereket, amelyeknek építésében részt vehettem. Így nem csupán az élő rendszer működésének megértése tartott izgalomban, – másik témavezetőm, Dr. Bódis Emőke elragadó magyarázatai hatására – hanem a technológia megzabolázásának finomságai is.

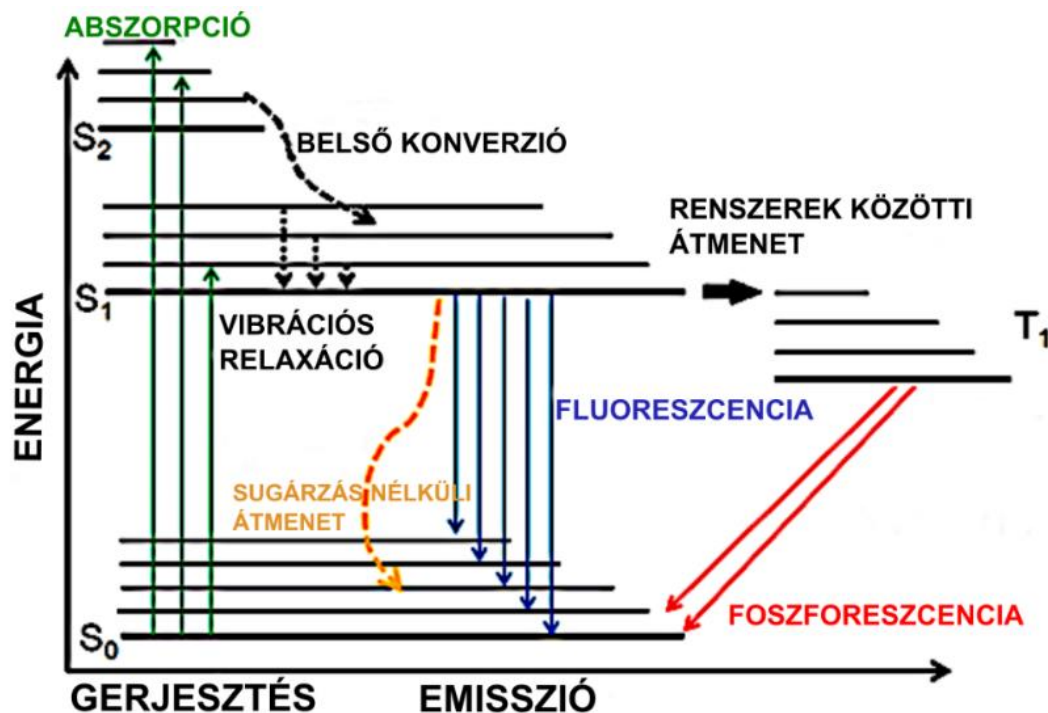
Dolgozatomban két (látszólag) független, fluoreszcencia spektroszkópiái módszerekkel vizsgált fehérjedinamikai projekt eredményeit mutatom be, amelyek között kapcsolatot teremtek az *Elektrontranszfer és fluoreszcencia kioltás* című fejezetben.

1. Fluoreszcencia spektroszkópia

1.1 A fluoreszcencia jelensége

A szentjánosbogár, a tonik és a rubinkristály közös tulajdonsága, hogy misztikus utóvilágításra képesek. A jelenség neve lumineszcencia, ami a hőmérsékleti sugárzáson felüli többletenergia fény formájában történő kibocsátását jelenti elektrongerjesztést követően.

Az anyagok atomi elektronjai sokféleképpen gerjeszthetők, többek között fény besugárzással is (fotolumineszcencia). Fotolumineszcencián belül két jelenséget különböztetünk meg aszerint, hogy az elektromágneses besugárzás hatására milyen gerjesztett állapot jön létre. Foszforeszcencia során a molekulák triplett (T_1) gerjesztett állapotból, míg fluoreszcenciánál szingulett (S_1) gerjesztett állapotból relaxálódnak az S_0 -al jelölt szingulett alapállapotba (1.1. ábra). Ez a magyarázata annak, hogy fluoreszcencia esetén az utóvilágítás időtartama nagyon rövid (10^{-8} s-on belül megszűnik), foszforeszcenciánál pedig hosszabb, a ms-tól az órák nagyságrendig tarthat.

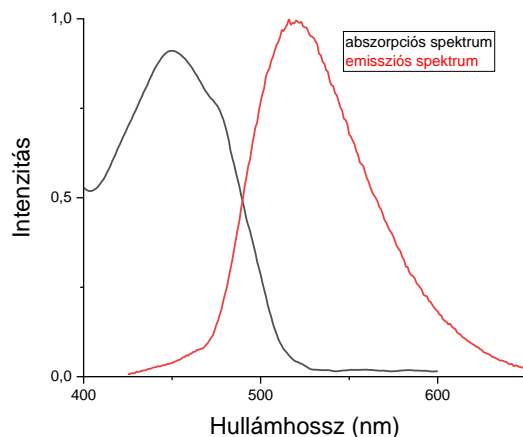


1.1 ábra Jablonski-diagram A vastagabb vízszintes vonalak a molekuláris elektronok energia-állapotait, a vékonyabb vízszintes vonalak az egyes vastag vonalak fölött a rezgési szubállapotokat jelölik. A felfelé mutató nyilak a fényenergia elnyelését jelzik, a lefelé mutató folytonos vonalak a fotonok emisszióját. Az ábrán balra a szingulett állapotok rendszere (S_0, S_1, \dots), jobbra a triplett állapotok rendszere (T_1) van. A szaggatott nyilak az egyes állapotrendszereken belüli sugárzásmentes átmeneteket jelzik. A jobbra mutató vastag és a piros folytonos nyilak a rendszerek közötti átmeneteket mutatják.

A Jablonski-diagramon a molekuláris elektronok energetikailag jól elkülöníthető állapotai, az azok közti átmenetek és a kapcsolódó jelenségek látszanak. Az egymásba ágyazott energianívó csoportok közül az S_0 alapállapot és az S_1 első gerjesztett állapotok a legfontosabbak a fluoreszcencia szempontjából. Az alap- és a gerjesztett állapotokra épített sűrű vonalak a molekulák szerkezete által meghatározott, kvantált energiaszintek, amelyeket tovább bonthatunk vibrációs energiaszintekre. Ezek még tovább bonthatók diszkrét rotációs energianívókra (ezeket már nem szokták ábrázolni). Az elektronok gerjesztési energiái a felfelé mutató nyilakkal vannak jelölve az 1.1 ábrán.

Az S_0 alapállapotbeli molekulák a környezetük hőmérséklete által meghatározott vibrációs és rotációs szintnek megfelelő szűk eloszlást képviselnek. A foton elnyelését (abszorpció) követően a molekula elektroneloszlása 10^{-15} s alatt átrendeződik és a molekula az első vagy magasabb sorszámú elektrongerjesztési állapotba kerül (S_1, S_2, \dots, S_n). A következő pikoszekundumok alatt (10^{-12} s) a gerjesztett molekula veszíti gerjesztési energiájából: közte és a környezete között hőcsere játszódik le. Ezt a folyamatot vibrációs vagy termikus relaxációnak nevezzük, ugyanis a molekula a termikus energiájának megfelelő vibrációs szintre kerül. A gerjesztett molekula gyors átmenetek eredményeképpen az S_1 elektronállapot alap vibrációs szintjére jut. A Kasha-szabály szerint a fényemisszió minden esetben ebből az állapotból történik, egyetlen lépésben, az alapállapot valamely rotációs vagy vibrációs szintjére. Ezt bizonyítják az emissziós spektrumok alakjai, amelyek a gerjesztő foton hullámhosszától függetlenül azonosak. Az emissziós színeképek vonalassá lennének, ha minden S_1 állapotból visszatérő molekula azonos szintre érkezne (egyenként tekintve vonalassá is, csak minden egyes vonal más-más energiájú helyen található a spektrumban). Mivel azonban különböző rotációs, illetve vibrációs szintek által meghatározott energiájú állapotba térnek vissza, az emissziós spektrum kiszélesedik, sávossá lesz. Tehát az emissziós spektrumok az alapállapot különböző szintjeit tükrözik, tapogattják le.

Egy fluoreszcens anyag abszorpciós és emissziós spektrumai tükörszimmetrikusak (1.2 ábra), spektrálisan átfednek és a csúcsaik el vannak tolódva egymáshoz képest. Az eltolódás (Stokes-féle eltolódás) az S_1 és az S_n állapotbeli vibrációs relaxáció miatti energiavesztéséből fakad. Az elnyelt fény hullámhosszához képest a kibocsátott fény rendszerint hosszabb (vöröseltolódás); kivételt képez a kétfotonos gerjesztés speciális esete.



1.2.ábra A 10 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH=8 pufferben oldott FAD (flavin-adenin-dinukleotid) tükröszimmetrikus abszorpciós és emissziós spektrumai

Míg a fluoreszcencia emissziós spektrum az S₀ alapállapot vibrációs szintrendszeréről, az abszorpciós színek az S₁, S₂, ... gerjesztett állapotok vibrációs szintjeiről informál. A két görbe tükröszimmetriája az átmenetek vertikális jellege következtében (Franck-Condon elv), illetve S₁ és S₀ igen hasonló vibrációs struktúrája miatt van. Ez a szimmetria bizonyos esetekben sérülhet, például gerjesztett állapotbeli reakció esetén, vagy ha az S₁ hosszú élettartama alatt megváltozik a molekula szerkezete.

A gerjesztési spektrum felvétele során egyetlen, rögzített emissziós hullámhossz mellett mérjük az intenzitást a gerjesztési hullámhosszak függvényében. A függvény alakja az abszorpciós spektrumával megegyező. A gerjesztési spektrum spektrális szélessége lehetővé teszi, hogy bizonyos molekulák a gerjesztési spektrum csúcsától távolabbi gerjesztő hullámhosszak hatására is magasabb energiájú állapotba kerüljenek. Ezért átfedő gerjesztési spektrumú fluoreszcens molekulák esetén lehetőség van a szelektív gerjesztésre. A fluoreszcens molekulák gerjesztési spektruma ujjlenyomatszerű. A molekulák legnagyobb valószínűséggel a spektrális csúcs-hullámhosszal történő megvilágítás hatására kerülnek gerjesztett állapotba.

A színek felvétele során alapvető feladat a gerjesztő és az általa okozott fluoreszcencia fény elkülönítése a gerjesztési és észlelési irányok helyes megválasztásával, szűrők, monokromátorok alkalmazásával. Az abszorpciós spektrumot abszorpciós fotométerrel, az emissziós és gerjesztési színeképeket spektrofluoriméterrel mérjük.

A fluoreszcencia mérhető mennyiségei: a gerjesztő és emittált fény intenzitása; a kibocsátott fény időbeli eloszlása, anizotrópiája.

1.2 Az abszorpciós spektrofotometria

Az abszorpciós spektrumok felvétele a vizsgált fehérjék koncentrációjának és a gerjesztési hullámhosszak megállapításának szempontjából elengedhetetlen a kísérletek kezdetekor. A vizsgálatok közben a fehérjében lejátszódó folyamatokra tudunk következtetni az abszorpciós csúcsok intenzitásának változásából, helyének eltolódásából. Az A-val jelölt abszorbancia a fényelnyelés mértékét jelenti logaritmikus skálán:

$$A = \lg \frac{I_0}{I}, \quad (1)$$

ahol I_0 a megvilágító fény, I pedig a mintán áthaladt fény intenzitását jelöli. (Intenzitás helyett pontosabb a spektrális sugárzási teljesítmény [W/nm] kifejezés.) A transzparens mintán áthaladó fény intenzitását befolyásolja a fény mintabeli x úthossza, a megvilágított anyag c koncentrációja és anyagi minősége (ε):

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x}. \quad (2)$$

A (2)–es Lambert-Beer-törvényben ε -nal jelölt moláris extinkciós koefficiens az egységnyi koncentrációjú konkrét anyag egységnyi vastagságán, adott hullámhosszon áthaladt fény elnyelését számszerűsíti. Az (1) egyenlet nevezőjébe a Lambert-Beer törvényt helyettesítve, egyszerűsítéseket és a logaritmus definícióját felhasználva kapjuk, hogy az optikai úthossz mellett a koncentráció is egyenesen arányos az abszorbanciával:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x, \quad (3)$$

így az könnyen számítható a fotométerrel való mérés eredményéből.

A Lambert-Beer-törvény levezetése és gyakorlati alkalmazásával kapcsolatos megjegyzések

A Lambert-Beer-törvény molekuláris megfontolások alapján történő levezetése sokkal érdekesebb, mint a klasszikus levezetés (amely szerint az oldat vékony rétege által elnyelt fény aránya arányos az elnyelő molekulák számával). Minden molekulához tartozik egy fotonfelvevő terület, az ún. σ molekuláris abszorpciós keresztmetszet, amely a hullámhossz

függvénye. A dl vastagságú vékony réteg dN molekulát tartalmaz. dN a következővel adható meg:

$$dN = N_a \cdot c \cdot S \cdot dl \quad , \quad (4)$$

ahol S a beeső sugár keresztmetszete, c az oldat koncentrációja és N_a az Avogadro-szám. A vékony réteg teljes abszorpciós keresztmetszete az összes molekuláris keresztmetszet összege, azaz $\sigma \cdot dN$. A foton befogásának valószínűsége tehát $\sigma dN/S$, és egyszerűen egyenlő a vékony réteg által elnyelt fény ($-dI/I$) hányadával:

$$-\frac{dI}{I} = \frac{\sigma dN}{S} = N_a \cdot \sigma \cdot c \cdot dl \quad (5)$$

Integrálást követően

$$\ln \frac{I_0}{I} = N_a \cdot \sigma \cdot c \cdot l \quad \text{vagy} \quad \log \frac{I_0}{I} = \frac{1}{2,303} N_a \cdot \sigma \cdot c \cdot l \quad , \quad (6)$$

ahol l az oldat vastagsága. Ez az egyenlet formailag megegyezik a (3) egyenlettel, $\varepsilon = \frac{N_a \cdot \sigma}{2,303}$ értékkel. A molekuláris abszorpciós keresztmetszetet ezután az ε kísérleti értékéből a következő összefüggés segítségével lehet kiszámítani:

$$\sigma = \frac{2,303\varepsilon}{N_a} = 3,825 \cdot 10^{-19} \varepsilon \quad (\text{cm}^2\text{-ben}).$$

I_0 az oldatba belépő sugár intenzitása, és nem a küvettára beeső I_i sugáré, illetve I az oldatot elhagyó sugár intenzitása, és nem a küvettát elhagyó I_s sugáré, mivel valójában a küvetta falain is vannak reflexiók, továbbá ezek a falak is elnyelhetik kissé a fényt. A küvetta falának és az oldószernek a hozzájárulása a következőképpen vehető figyelembe: a teljes minta abszorbanciája (beleértve a küvetta falait is) az alábbiak szerint határozható meg:

$$A_S(\lambda) = \log \frac{I_i}{I_s} \quad (7)$$

Ha az oldatot az oldószerrel helyettesítjük, akkor az áteresztett fény intenzitása I_R és az A abszorbancia

$$A_R(\lambda) = \log \frac{I_i}{I_R} \quad (8)$$

Az oldat valódi abszorbanciája ekkor a következő:

$$A(\lambda) = A_S - A_R = \log \frac{I_R}{I_S} \quad (9)$$

A kétfényutas spektrofotométerek (egyik küvettában az oldat, másikban az oldószer) automatikusan rögzítik $\log \frac{I_R}{I_S}$ mérésével a valódi abszorbanciát. Mivel a két küvetta soha nem tökéletesen egyforma, először az alapvonalát vesszük fel. Ezután a mintaküvettában lévő oldószert az oldattal helyettesítjük, és felvesszük a valódi abszorpciós spektrumot.

A transzmittancia, azaz átteresztőképesség is a fényelnyelés leírására használt mennyiség, ami azt mutatja meg lineáris skálán, hogy a beeső fény hány százalékát engedi át a megvilágított anyag:

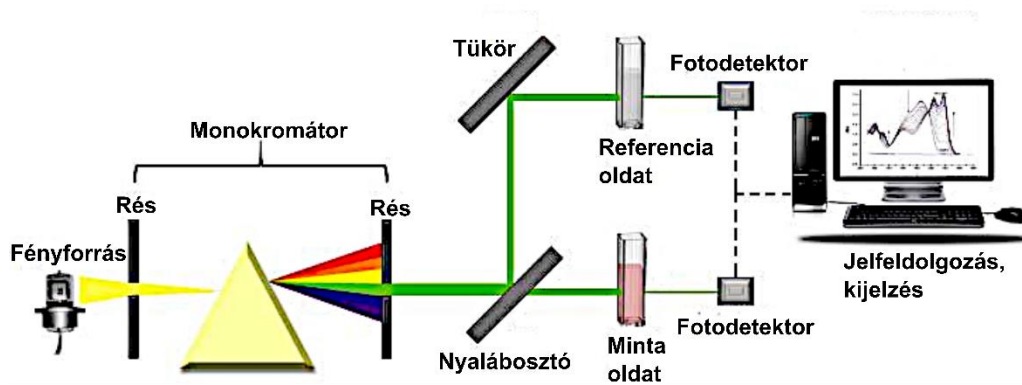
$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad (10)$$

Vagyis

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda). \quad (11)$$

Túl nagy intenzitású besugárzás (pl. lézerefény) esetén az abszorpció már nem csak az anyag, hanem a megvilágító fény tulajdonságaitól is függ. A nemlineáris abszorbancia jelensége során az abszorpcióra képes molekulák száma lecsökken, ugyanis az elnyelésre alkalmas molekulák sokasága nem képes alapállapotba kerülni, relaxálódni. Az abszorpció lecsökkenését kifehéredésnek, az anyagot, amiben végbemegy, telítődő abszorbensnek nevezzük, ami rövid lézerpulzusok előállítására is alkalmas.

Az 1.3 ábrán az UV-látható tartományon (200-700 nm) használatos kétfényutas spektrofotométer elrendezése látható az osztott nyalábbal, amely a minta és a referencia (pufferoldat) párhuzamos – és ezért az egyutas rendszereknél gyorsabb – vizsgálatát teszi lehetővé.



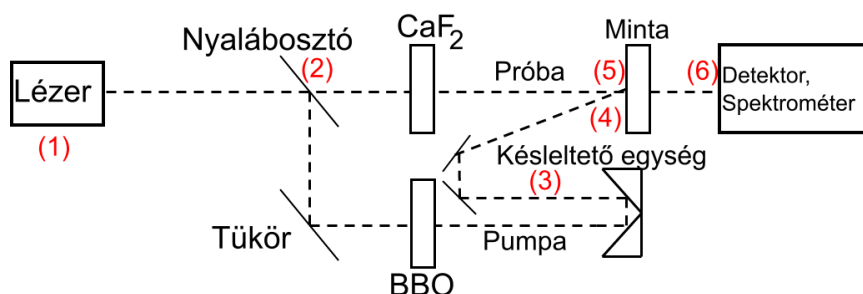
1.3 ábra A kétfényutas spektrofotométer elvi elrendezése Egy UV/látható fényforrás sugárnyalábja prizma vagy diffrakciós rács segítségével hullámhosszakra választható szét. Ezt a monokromatikus fényt egy nyalábosztó két azonos intenzitású sugárra osztja. A fény az egyik oldalon egy referencia küvetta (fehér), a másikon pedig a vizsgálandó mintán keresztül van irányítva, amin áthaladva annak egy része elnyelődik. Mindkét fénysugár a fotodetektorokra irányul, amelyek összehasonlítják intenzitásukat: a mintán és a referencia közegen áthaladó fényintenzitás aránya, vagyis a fény abszorbanciájának mértéke meghatározható. (Az ábra forrása: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-Law-of-Beer-Lambert-through-the-absorption-of-light-in_fig1_336637497)

Az abszorpciós fotométerrel a spektrális csúcsok eltolódása időfüggésben is mérhető; fix hullámhossz abszorbanciájának monitorozásával a fehérjék szerkezetének makroszkópikus (100 ms időfelbontású) időskálán bekövetkező változásai jól követhetők (pl. a világos állapotból a sötét állapotba való visszatérése az általam vizsgált fényérzékeny fehérjéknél).

1.3 A femtoszekundumos tranziens abszorpciós spektroszkópia

A nagyon rövid, pikoszekundumos-femtoszekundumos időskálán zajló abszorpciós spektrumbeli változások követésére – és ezen spektrális nagyítón keresztül a 10^{-13} - 10^{-10} s-os kémiai és szerkezeti események mechanikai és kinetikai részleteinek feltérképezésére – többek között a látható tranziens abszorpciós technikát használtuk. Mivel a tranziens abszorpciós spektroszkópia fotokémiai reakciók közbenső állapotainak nyomon követésére; energia-, töltés- vagy elektronátadási folyamatok; konformációs változások, termikus relaxáció, fluoreszcencia- vagy foszforeszcencia-folyamatok vizsgálatára alkalmas eljárás, kiválóan használható flavoproteinek elektronátviteli folyamatainak jellemzésére is. A számos fotoaktív fehérje (köztük az általam is vizsgált OaPAC fehérje) fotoantennájaként is működő flavin kromofór a fehérjekörnyezettől és a fotokémiától függően öt különböző „redoxállapotban” létezhet¹. Ezek a redoxállapotok jól elkülönülő abszorpciós spektrummal rendelkeznek, így jól mérhetők.

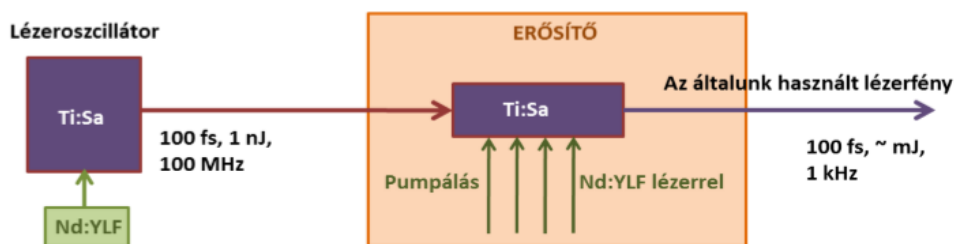
Az egyedi elektrontranszfer lépések követésére is alkalmas módszer pumpa-próba elven alapszik. A módszer kidolgozásáért és a femtokémiai kísérletek elvégzéséért *Ahmed Zewail* 1999-ben Nobel-díjat kapott. A mintát viszonylag nagy intenzitású lézerimpulzussal – az ún. pumpa nyalábbal – gerjesztjük. Az így kiváltott hatás időbeli nyomonkövetésére (meghatározott időközönként érkező) jóval kisebb energiájú próbaimpulzusok sorozata világítja át a mintát: a gerjesztett állapotbeli abszorpció vizsgálható. Azért fontos, hogy a próbaimpulzusok kisebb intenzitásúak legyenek, hogy a kiváltott folyamatot lehetőleg ne befolyásolják. Az időbeli felbontást a próbaimpulzus hossza határozza meg, ami a mi rendszerünk esetén 100 fs; tehát a 100 fs -100 ps tartományon lezajló folyamatok vizsgálatára alkalmas a mérőberendezés.



1.4 ábra A tranziens abszorpciós rendszer sémája 1. femtoszekundumos lézerforrás 2. szétválasztás próba és pumpa impulzusra nyalábosztóval 3. a próba impulzus a kékletető padnál „késlekedik”, hogy az abszorpcióváltozás egy következő szakaszát világíthassa át 4. a pumpa nyaláb eléri a mintát 5. a próba nyaláb átvilágítja a mintát 6. a mintán átmenő fény a detektorba ér

Az általunk alkalmazott pumpanyaláb a frekvenciakétszerező BBO (béta bárium borát) kristállal létrehozott 400 nm hullámhosszal rendelkező fénysugár, a próbanyaláb pedig egy széles spektrumú, a 800 nm-es impulzuslézereből CaF₂ lemezzel előállított 380-700 nm tartományú fehér fény kontinuum.

Az általunk használt fényforrás felépítése az 1.5 ábrán található. Ez egy Nd:YLF lézerral pumpált Spectra-Physics Mai Tai típusú Ti:Sa (100 fs impulzushosszú, 100 MHz ismétlési frekvenciájú, 1,5 W átlagos teljesítményű, 1nJ energiájú) lézer oszcillátor. Ez világítja meg a lézerezősítő (Spectra-Physics Spitfire Ace) Ti:Sa közegét, amit egy újabb Nd:YLF lézer (Spectra Physics Empower; Intracavity-Doubled, Diode-Pumped Nd:YLF Laser Systems) pumpál. A kijövő nyaláb hullámhossza 710 és 990 nm között hangolható, impulzushossza 800 nm-en 100 fs, ismétlési frekvenciája 1-5 kHz tartományban állítható, energiája erősítés után 1 mJ, ami már elegendően nagy nemlineáris jelenségek (pl. másodharmonikus) keltéséhez és a pumpáláshoz.



1.5. ábra: A lézer fényforrás sematikus ábrája A lézerrendszer részei: egy lézeroszillátor, egy pumpa lézer és egy lézer erősítő. Az oszcillátor egy Nd:YLF lézerral pumpált Ti:Sa lézer. Az előállított 100 fs impulzushosszú, 100 MHz ismétlési frekvenciájú, 1,5 W átlagos teljesítményű, 1nJ energiájú impulzusok az erősítőt (Nd:YLF lézerral pumpált Ti-Sa kristály) követően 1 mJ energiával, 1 kHz ismétlési frekvenciával, 800 nm-en 100 fs impulzushosszal rendelkeznek és 710 – 990 nm között hangolhatók.

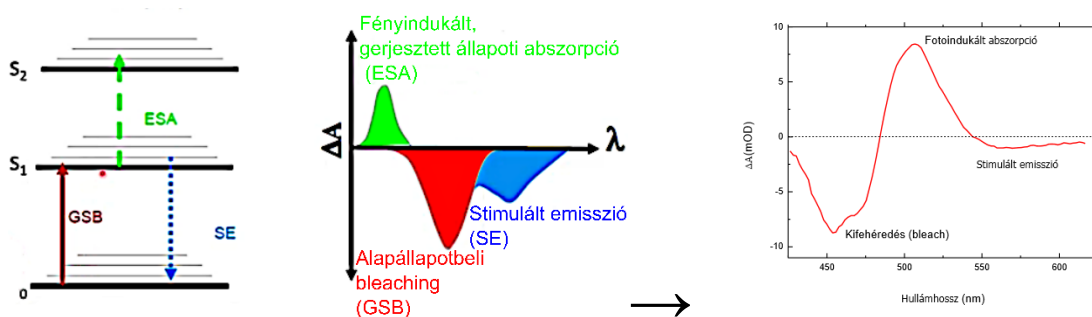
A lézerekből kijövő 800 nm-es nyaláb mellett az útjába helyezett BBO kristályon való áthaladást követően megjelenik a frekvenciakétszerezett 400 nm hullámhosszú fény, amiről dikroikus tükörrel leválasztható a másodharmonikus generáló 800 nm-es nyaláb. A kettéosztott lézernyaláb egyike tehát a BBO kristályt követően már 400 nm-es hullámhosszon halad a minta felé, hogy rendszeresen gerjessze azt, a másik nyaláb pedig a késleltető egység után a CaF₂ lemezen áthaladva fehér fényű próbaimpulzusként világítja át a mintát. A késleltető egység kulcsfontosságú a gyorsan változó abszorpció egymás utáni parányi időtartományairól történő gyors adatgyűjtésben. A késleltető pad sebessége 100 mm/s, 1,5 µm-es mozgással (oda-vissza

3 μm fényúthossz növekedéssel a $3 \cdot 10^8$ m/s sebességű fény $t = \frac{s}{v} = \frac{3 \cdot 10^{-6} \text{m}}{3 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}} = 10^{-14} \text{s}$, azaz)

10 fs időbeli felbontást tesz lehetővé, amit az impulzus 100 fs-os hossza felülír. A két nyaláb tehát a mintában találkozik (1.4 ábra): a 400 nm-es pumpa impulzus által keltett hatást az időben lépésenként késleltetett fehér fénnel „tapogatjuk le”. Míg az abszorpciós fotometriánál a minta széles spektrumú átvilágítását végezzük, a fluoreszcencia emisszió mérésekor a meghatározott hullámhosszon való gerjesztést követően detektálunk, addig a tranziens abszorpciós technika esetén ez a kettő szimultán történik és nagyon gyors változások követésére optimalizáltan. Az abszorpciós spektrumokat egy -80°C -on működő Andor Newton CCD rögzíti.

Az abszorpciós adatmátrixokat, a saját fejlesztésű NI LabVIEW (<https://www.ni.com/hu-hu/shop/labview.html>) (vizuális programozási nyelv) szoftverrel írt saját program számolta ki. A kapott adatmátrixot a Glotaran nevű² szoftverrel elemeztük, szekvenciális sémát ($A \rightarrow B \rightarrow C$) feltételezve, a kapott időállandókhöz EAS-t (Evolution Associated Spectra) rendelve. A szekvenciális séma feltételezésekor kapott EAS spektrumok a spektrumok időbeli fejlődését mutatják³. Az EAS spektrumok lecsengési állandói azokat az időket adják meg, amelyek az egyes állapotok egymásba való átalakulásához szükségesek. Például a legegyszerűbb ($A \rightarrow B \rightarrow C$) átalakulási séma EAS1 lecsengési állandója az az időtartam, amely alatt az A állapotból létrejön a B állapot. Az EAS1 spektrum az A állapotban jelen lévő járulékok (gyökök) spektrumainak összege. Ezek egyesével azonosíthatók például a FluorTools szoftver spektrális illesztésével.

A tranziens abszorpciós spektrum három hatás szuperpozíciójaként áll elő: a kifehéredés, a stimulált emisszió és a fotoindukált abszorpció (1.6 ábra).



1.6 ábra: Az abszorpcióváltozás a hullámhossz függvényében (középen) és a változást keltő jelenségek

(Forrás: <https://gobertpartners.com/by-transient-absorption-spectroscopy>)

A bleaching (kifehéredés) az alapállapotbeli populáció lecsökkenése miatt az abszorpció nullához közeli értékével jár. Stimulált emisszió esetén a gerjesztett állapotú minta újabb

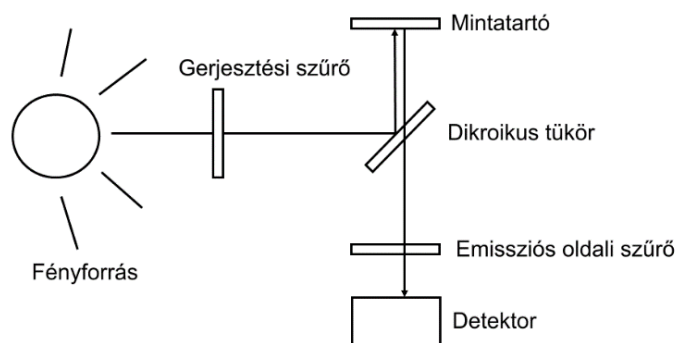
fotonokat bocsát ki, ami negatív abszorpcióváltozásként jelenik meg. A gerjesztett állapotbeli (fotoindukált) abszorpció a gerjesztett állapotbeli minta további fotonelnyelését jelenti, azaz gyengülő próbaimpulzust: pozitív abszorpcióváltozást (1.6 ábra).

A gerjesztett állapotbeli spektrum (pumpanyaláb hiányában) alapállapotú spektrumából való kivonását követően kapjuk meg az abszorpció változást (ΔA). $\Delta A = A_2 - A_1$, ahol A_1 az alapállapotú, A_2 a pumpa indukált abszorbancia. $\Delta A < 0$ azokban az esetekben, amikor a gerjesztett állapotú abszorbancia kisebb az alapállapotúé. Ilyen két esetben fordulhat elő: az 1.6 ábrán pirossal jelölt kifakuláskor (a próbanyalábbal való átvilágítás során kisebb az elnyelődés, mivel a gerjesztett állapotban nagyobb arányú populáció található, mint alapállapotban) és a kézzel jelölt stimulált emisszióknál (a gerjesztett állapotban kibocsátott, stimuláló foton a magasabb energiaállapotban lévő elektronokat emissziót okozva „lelöki” a helyükről), ahol - mivel az emisszió mértéke nő -, a próbanyaláb elnyelődése kisebb. $\Delta A > 0$, vagyis pozitív az abszorpcióváltozás, amikor gyengül a próbasugár intenzitása. Gerjesztett állapotbeli abszorpció esetén a minta további fotonokat nyel el. A csúcsok (ΔA) változásának hullámhossz szerinti, illetve időbeli dinamikáját elemezzük, időállandót számítunk. A spektrum változása különböző készletetéseknél a fotokémiai folyamat (pl. a flavoproteinek elektronátviteli lépései) időbeli lépéseinek kirajzolása, mivel pl. a flavin redoxállapotainak határozottan elkülöníthető abszorpciós spektrumai vannak.

1.4 A fluoreszcencia emisszió mérése (spektrofluorimetria)

A fluorofórok emissziós színeket fluoriméterrel vesszük fel. A fluoriméter elvi elrendezésén jól látható (1.7 ábra), hogy a gerjesztés fényútjához képest merőlegesen történik az emisszió detektálása.

A fluoriméter feladata, hogy a vizsgált kromofórt megvilágítsa meghatározott hullámhosszú fényel, majd elkülönítve a gerjesztő fénytől, mérje a minta által kibocsátott fény intenzitását, hullámhossz szerinti eloszlásban. A fluoreszcencia intenzitása a megvilágító fény intenzitásának a töredéke. A fluoriméter merőleges elrendezése azért lényeges, mert a gerjesztő fényhez képest kis intenzitású emissziót így lehet alacsony háttérintenzitással és jobb jel/zaj viszonytal mérni, a szórt fény jelentős része ugyanis kiszűrhető ezzel az elrendezéssel.

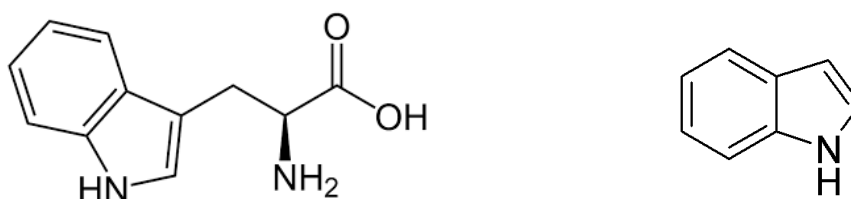


1.7 ábra: A fluoriméter sémája A széles spektrumú fényforrásból monokromátorral vagy színszűrővel kiválasztott gerjesztő fény a minta irányába halad, ahonnan az emittált fény hullámhosszát dikroikus tükör és a merőleges elrendezés választja szét a gerjesztőtől. Az emissziós oldali színszűrővel vagy monokromátorral kiválasztott fluoreszcens fényt detektáljuk.

A gerjesztés általában széles spektrumú fényforrással történik, monokromátor segít a szükséges megvilágítási hullámhossz kiválasztásában és az emissziós oldalon is a gerjesztési spektrum felvételekor. Steady-state fluoreszcencia spektrumok felvételekor nem vizsgáljuk a fluoreszcencia időbeli megváltozását, hanem állandósult állapotúnak tekintjük.

1.5 A triptofán mint alkalmas fluorofór

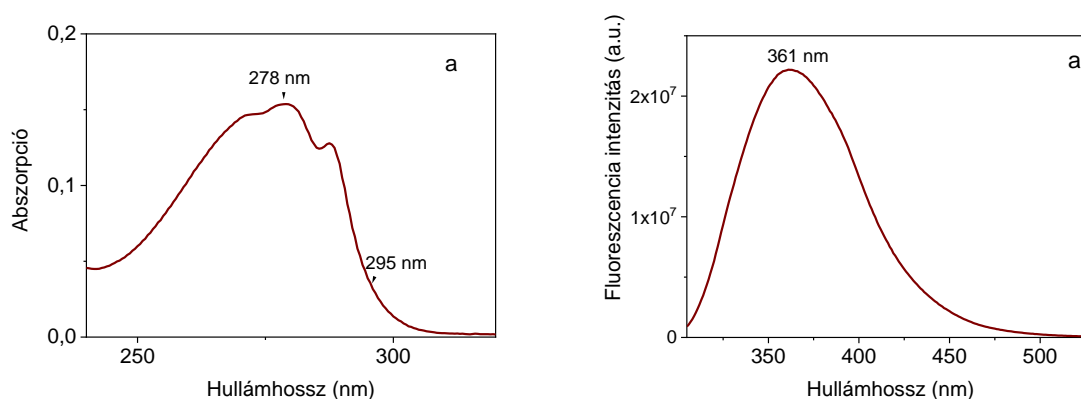
A fluoreszcencia emisszióra képes molekulák (fluorofórok) delokalizált elektronokat (konjugált kettős kötések vagy aromás gyűrűket) tartalmaznak. Belső és külső fluorofórokat különböztetünk meg aszerint, hogy azok kívülről a molekuláris rendszerhez csatoltan vagy természetesen vannak jelen, mint például a fehérjékben megtalálható három aminosav: a triptofán (1.8 ábra), a tirozin és a fenilalanin. A három, delokalizált elektronokat tartalmazó aminosav közül a triptofán kvantumhatásfoka a legmagasabb és spektrális tulajdonságai miatt szelektíven vizsgálható akkor is, ha a másik két emisszióra képes aminosav szintén jelen van.



1.8 ábra a.) A triptofán szerkezeti képlete (L-izomer). b.) A fluoreszcenciáért felelős triptofán oldallánc, az indol

A triptofán intenzitása, emissziója, élettartama nagyon érzékeny a környezetének változásaira. Ezt az előnyös tulajdonságát lehet a kioltási kísérleteknél jól használni.

A triptofán tehát fluoreszcens tulajdonságai és a környezetének körülményeire való érzékenysége miatt a fluoreszcencia spektroszkópiában alkalmas és gyakran használt belső fluorofór. A triptofán – s vele szoros egységben a fehérje – működése (kis intenzitású) UV fényvel történő gerjesztés hatására nem változik, nem sérül. Képes elnyelni az UV fény energiáját, elektronjai gerjesztett állapotukból kisugárzás révén relaxálódnak. A triptofán gerjesztése 295 nm körül lehetséges, míg fluoreszcencia emissziója a 310 - 400 nm-es tartományba (1.9 ábra), fluoreszcencia élettartama általában 1-6 ns közé esik⁴.



1.9 ábra. Az L-triptofán abszorpciós (a) és emissziós spektruma (b) a 200-600 nm tartományban Puffer: 10 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8. Gerjesztő hullámhossz: 295 nm.

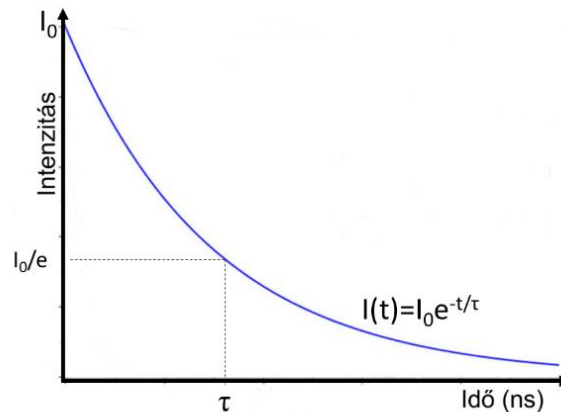
1.6 A kvantumhatásfok

A fluoreszcens energia hatásfoka egyenlő a mintából minden irányba kisugárzó fény és a megvilágító fény energiájának hányadosával. A kvantumhatásfokot (Q) az elnyelt és kibocsátott fotonok számával $Q = N_{\text{emittált}}/N_{\text{abszorbeált}}$ vagy a sebességi állandókkal $Q=k_f/k_{\text{összes}}$ fejezhetjük ki, ahol k_f a fluoreszcens átmenet valószínűségét, a „ $k_{\text{összes}}$ ” pedig a fluoreszcens és a nonradiatív (vibrációs és rotációs) átmenetek valószínűségét jelenti.

1.7 A fluoreszcencia élettartam és mérése

1.7.1 A fluoreszcencia élettartam (τ)

A gerjesztett állapotú molekula fotonemisszióval kerülhet vissza alapállapotba. A gerjesztett állapotban levő molekulák száma – így intenzitása is – az idő függvényében a radioaktív bomláshoz hasonlóan exponenciálisan csökken (1.10 ábra).



1.10 ábra: A gerjesztés megszűnését követően a fluoreszcencia intenzitás exponenciálisan csökken az idővel

Az intenzitás arányos tehát a gerjesztett atomok számának időbeli változásával ilyen formában:

$$I = dN/dt = -k_f \cdot N, \quad (12)$$

ahol I az emisszió intenzitása, k_f az emisszió sebességi állandója, N a gerjesztett atomok száma.

A differenciálegyenletből integrálással jutunk az

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (13)$$

egyenlethez, amelyben N_0 a $t=0$ időpillanatban, a gerjesztés megszűnéskor a gerjesztett atomok száma, $k_f = \tau^{-1}$, ahol τ az az élettartam, amely alatt a gerjesztett állapotban levő molekulák száma e -ad részére csökken, vagyis a gerjesztett állapot átlagos időtartama. Ez tulajdonképpen a lumineszcencia csillapodását jellemző idő, azaz maga a fluoreszcencia/foszforeszcencia élettartam.

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-(k_f + k_{nr})t}, \quad (14)$$

ahol $N(t)$ a gerjesztett molekulák száma bármely t időpillanatban, N_0 a $t=0$ időpillanatban gerjesztett állapotban levő elektronok száma. Ebből következik, hogy a fluoreszcencia-élettartam:

$$\tau = 1/(k_f + k_{ic} + k_{isc}) = 1/(k_f + k_{nr}), \quad (15)$$

ahol $k_{nr} = k_{ic} + k_{isc}$ és k_f a fluoreszcencia átmenet valószínűsége, ic a belső átmenet (internal conversion), isc a rendszerek közti átmenet (intersystem crossing), nr a sugárzás nélküli (nonradiatív) átmenet.

Általában a fluorofórok több populációban lehetnek jelen egyidejűleg, amely több élettartam megjelenésével monitorozható – ezeket az illesztéseknél kell figyelembe venni. Az illesztett élettartam görbe az alábbi alakban felírható exponenciális függvények lineáris kombinációjából áll elő:

$$I(t) = \sum \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}. \quad (16)$$

Az α_i preexponenciális faktorok az egyes élettartam komponensekhez tartozó populációk arányát, τ_i az egyes élettartamokat jelöli.

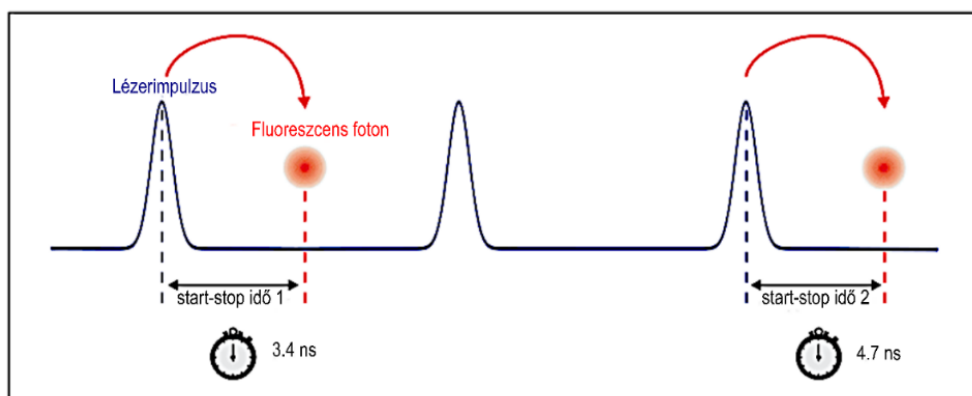
Számos eljárás ismert a fluoreszcencia élettartamok mérésére, azok nagyságrendjétől függően. A továbbiakban a méréseim során alkalmazott eljárásokat részletezem.

1.7.2 Időkorrelált egyfoton számlálás

Az időkorrelált egyfoton számlálás (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) a fluoreszcencia időbeli relaxációjának a mérésére alkalmas technika az 50 ps – 200 ns időtartományban. A fluoreszcens jel detektálása megtörténhet egy fotodiódával, gyors oszcilloszkóppal vagy valamilyen gyors elektronikus tranziensrögzítővel. A szükséges időbeli felbontás és a gyenge jel miatt azonban ezek a megoldások nem célravezetők. Az időkorrelált egyfoton számlálásnál a minta periodikus gerjesztése lehetővé teszi a gerjesztés és emisszió több ciklusából történő adatgyűjtést a photobleaching elkerülésével. Továbbá elfogadható a

begyűjtött fotonok ritkasága és a sok cikluson keresztül gyűjtött egyedi fotonesemények sokaságából rekonstruálható a fluoreszcencia bomlási profilja.

A módszer alapja az egyes fotonok (fluoreszcens jelek) ismétlődő, pontosan időzített regisztrálása. Az időzítés referenciája a következő gerjesztő impulzus⁴. Egyetlen fotonra is érzékeny detektorként fotoelektronsokszorozó (PMT: Photomultiplier Tube), többcsatornás lemez (MCP: Multi Channel Plate), egyfotonos lavinadióda (SPAD: Single Photon Avalanche Diode), vagy hibrid PMT használható. Feltéve, hogy alacsony a valószínűsége annak, hogy a detektorok ciklusonként egynél több foton regisztrálnak, a fotonérkezések időtartományonkénti hisztogramja azt az időbeli csökkenést mutatja, amelyet egy "egyszeri felvétel" időfelbontású analóg rögzítés esetén kapnánk. Az egyetlen foton valószínűségének előfeltétele teljesíthető (és teljesítendő) a mintából érkező fény intenzitásának egyszerű csökkentésével, ha szükséges.

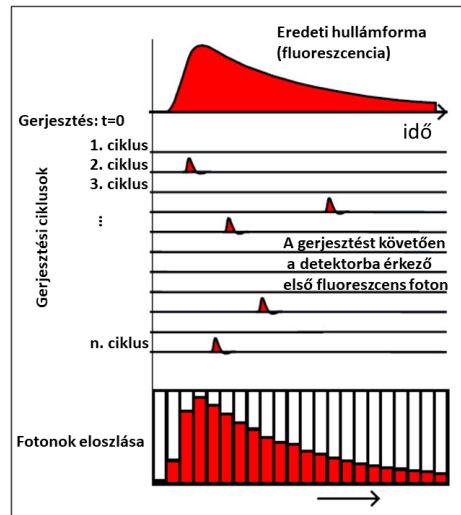


1.11 ábra A start-stop idők mérése időkorrelált egyfoton számlálással (Time-Correlated Single Photon Counting). (Forrás: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf)

Az 1.11 ábrán jól látható, ahogyan a fluoreszcenciát a rövid lézer vagy LED-impulzusok ismétlődően gerjesztik. A gerjesztés és az emisszió közötti időkülönbséget stopperóráként működő elektronika méri (TCSPC: Time-Correlated Single Photon Counting). Ezen időkülönbségek több cikluson keresztül történő előfordulási valószínűségeiből épül fel a lecsengést mutató hisztogram (1.12 ábra).

Ha egy foton kibocsátásának és detektálásának valószínűsége 100%, akkor megjelenik egy impulzus a hisztogramban, amint azt az 1.11 ábra 1. és 3. eseménye mutatja. Ám sok ciklusban egyáltalán nem lesznek fotonok vagy általuk keltett impulzusok. Az ábrán ez a helyzet a második lézerimpulzusnál látható. Meg kell jegyezni, hogy (a kvantumfizika törvényei szerint) egy foton vagy egy üres ciklus teljesen véletlenszerű, és csak

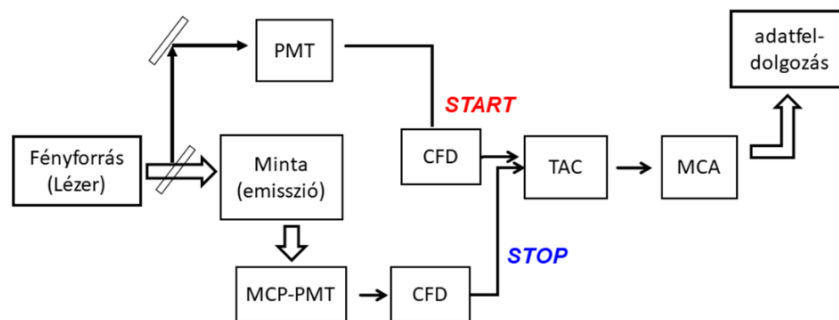
valószínűségekkel lehet leírni. Következésképpen ugyanez érvényes az egyes stopperórák leolvasásaira is. A fluoreszcencia intenzitásának folyamatos mérése helyett tehát a gerjesztő és a detektált impulzus közötti időtartam mérése történik. A fluoreszcencia lecsengési görbét (1.12 ábra) nagyon sok mérés statisztikája adja (~10000 beütésszám).



1.12 ábra A fluoreszcencia lecsengési görbe létrejötte. Az egymás utáni mérések során az emittált fotonok megfelelő időablakba való érkezésének regisztrálása történik, azaz az egyes időcsatornába érkezett fotonok számlálása a fotodetektorban kiváltott, a fotonok számával arányos áram rögzítésével. A sokszor ismételt mérések hisztogramja alapján rekonstruálható a fényintenzitás időbeli csökkenése. (Forrás: Becker&Hickl)

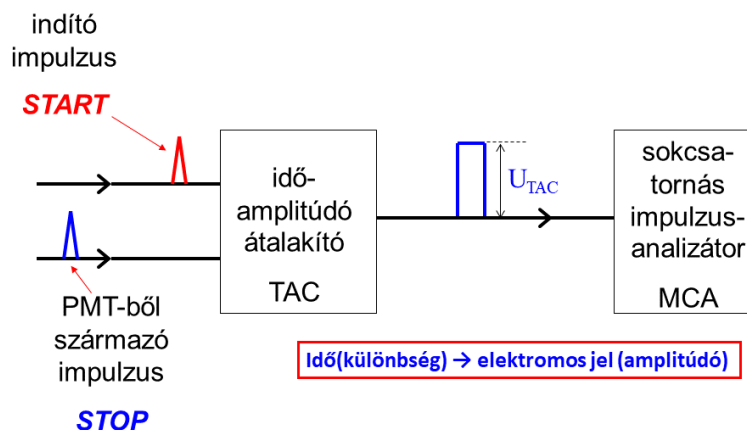
A gerjesztést impulzus-lézer vagy impulzus-LED fényforrás végzi, amelyek impulzushossza összemérhető a fluoreszcencia élettartamával (dekonvolúciót igényel, amikor nem tud pillanatszerű/femtosekundumos lenni a gerjesztés). Az impulzus egy része fényosztóval van kicsatolva, ez referencianyálbként akadály nélkül jut a fotodetektorba (1.13 A ábra).

A mintát átvilágító nyaláb okozta fluoreszcens fényimpulzus adja a start jelet a nagy erősítésű fotodetektorba, míg a referencia nyaláb a stop jelet. Az indítóimpulzus feszültségnövekedést indít el az idő-amplitúdó átalakítón (Time-to-Amplitude Converter, TAC). A gerjesztő fény intenzitását úgy kell beállítani, hogy egyetlen foton áramot váltson ki a fotokatódon. Amikor a stop jel eléri az idő-amplitúdó átalakítót, a TAC jel feszültségének növekedése megáll. Ez a feszültség arányos tehát az eltelt idővel, vagyis a fluoreszcencia időkéésével (1.13 B ábra).



1.13 A ábra A fluoreszcencia élettartam TCSPC-vel való mérésének kísérleti elrendezése. A TCSPC elektronika fő alkotóelemei: foto-elektron sokszorozó (PMT: photomultiplier tube), MCP-PMT (micro channel plate PMT), konstans arányú diszkriminátor (CFD: Constant Fraction Discriminator), idő-amplitúdó átalakító (TAC: Time-to-Amplitude Converter), többcsatornás impulzus-analizátor (Multi Channel Array, MCA) és az adatfeldolgozó egység.

A start és stop jeleket a konstans arányú diszkriminátor (CFD: Constant Fraction Discriminator) fogadja, ahol az impulzusnak meg kell haladnia a küszöbeshet. Ez megakadályozza, hogy az alacsony amplitúdójú zaj valódi jelnek számíton. Így egy amplitúdótól független elektronikus impulzus továbbítódik a TAC-nak. A nagy számú impulzusból beérkező sok TAC jelet a többcsatornás impulzus-analizátor (Multi Channel Array, MCA) dolgozza fel. A csatornák legkisebb szélessége (és a gerjesztő impulzus időbeli kiszélesedése) határozza meg az időbeli felbontást. Fontos, hogy csatornánként egyszerre 1-nél több foton ne érkezzon be (kb. 100 start jelre 1 stop jel érkezzen) a jelalaktorulás elkerülése miatt.



1.13 B ábra Az időkorrelált egyfoton számlálás időmérési mechanizmusa

1.8 Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcencia emissziós spektroszkópiai jel gyors lekövetésére a TCSPC technikával elérhető nanoszekundumos időbeli felbontásnál is finomabb érhető el a polariméteréhez hasonló logikával kigondolt Kerr-kapus spektroszkópiával⁵.

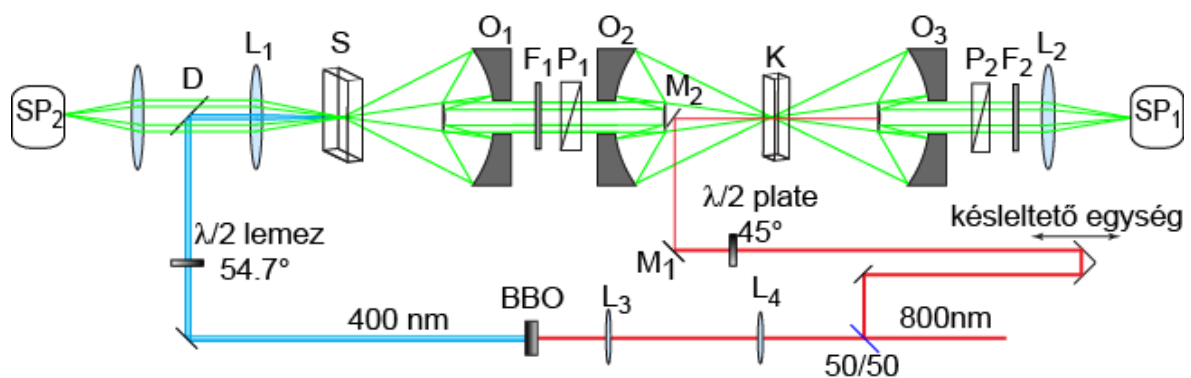
A fehérjékben lejátszódó néhány 10 pikoszekundumos, fényel indítható ultragyors jelenségek vizsgálatára alkalmas technika a femtoszekundumos impulzushosszú gerjesztő lézerek által lehetséges, így 100 fs-os nagyságrendűre szűkíthető az időablak.

A spektrálisan szélesebb tartománybeli mérés lehetősége miatt a Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia az élettartamhoz képest további többletinformációval szolgál a tranziens folyamatokról: az intenzitás és az idő mellé a hullámhossz dimenziót is tartalmazza a spektrum. Ez a több fluorofórt tartalmazó rendszerekben különösen fontos.

Az ilyen rövid időtartományban megbízható eredményre vezető mérési eljárások többsége a pumpa-próba elven alapszik. Ennek során a lézerimpulzusok késleltetését az optikai úthosszak finom változtatásával lehet elérni. A pumpaimpulzus elindítja a mintában a vizsgálni kívánt reakciót. A próbaimpulzus időben késleltetve indul. Minden mérésnél lépésről lépésre változik a próbaimpulzus időbeli késleltetése a vezérelhető és mozgatható késleltető padnak köszönhetően. Tehát az időbeli késés távolságnöveléssel valósul meg. A próbaimpulzus ennél a technikánál nem a mintában találkozik a pumpával, hanem az ún. Kerr-közegben. Szerepe a mintabeli fluoreszcens folyamat megfelelő időablakának kinyitása, amely után az emittált fotonok intenzitása és hullámhossza mérhető. A megfelelő időablak lézerimpulzus hatására történő megnyitása egy speciális anyag anizotrópiájának megváltozása miatt lehetséges. Az optikai Kerr-effektus során a speciális közeg (ún. Kerr-anyag) akkor válik a lézerfény által keltett elektromos mező hatására „átlátszóvá”, ha a törésmutatója irányfüggő módon megváltozik; ekkor a rá eső fény polarizációs síkját elforgatja. Ilyen anyag például a CS₂, a benzol vagy kis mértékben az üveg is. Az elforgatás mértéke függ az anyag vastagságától és a kettőtörés mértékétől. Kettőtörés esetén a különböző irányokban más-más az anyag törésmutatója. Legalább két, de tipikusan inkább három fő (főtengely menti) törésmutató alakul ki a közegben. Ezt másik fényel megvilágítva – ami már nem befolyásolja az anyag törésmutatóját – annak polarizációs vektorát elforgatja.

A próbaimpulzus nagy intenzitásának hatására a kettőtörővé vált Kerr-közegen áthaladó, síkban poláros (jelen esetben fluoreszcens) fény polarizációs síkja elfordul, (elliptikusan polárossá válik). Az 1.14 ábrán látható elrendezés mutatja, hogy a mintából kijövő fluoreszcens fény a P1-es polarizátoron áthaladva válik síkban polárossá. A P2-es polarizátor

erre merőlegesen van beállítva, tehát fény csak akkor juthat át a második polarizációs szűrőn, ha a Kerr-effektus miatt a nagyenergiájú próbaimpulzus a Kerr-közeget kinyitja. Ekkor a fluoreszcens fény síkja elfordul, és máris nem lesz keresztirányú a polarizációja a P₂-höz képest, tehát a fény egy része átjut. A fényáteresztés pontos idejének vezérlésével a fluoreszcencia intenzitásának mérése által a lecsengés menete rekonstruálható. A „kapunyitás” hossza nem minden Kerr-közeg esetén azonos, tehát a vizsgált fluoreszcencia élettartamának megfelelőt érdemes választani. Olyan anyagot, amely például egy gyors lecsengés esetén ugyanolyan nagyságrendű időtartam alatt kerül vissza izotróp (a polarizációt nem befolyásoló) állapotba.



1. 14 ábra A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiai elrendezés vázlatja.⁵

A lézerből kijövő fény kettéosztása után a pumpa impulzus ($\lambda = 400 \text{ nm}$) az S mintát gerjeszti. Az ennek hatására létrejövő fluoreszcencia emissziót nagy térszögből begyűjtő és továbbirányító O₁-O₂ Cassegrain-objektíveken áthaladó fény a P₁ polarizációs szűrő miatt síkban polárossá válik és halad a Kerr-cella felé. Ezzel párhuzamos úton a próbaimpulzus a késleltető egységen áthaladva jut a Kerr cellába, ahol létrehozza a közeg változását; megnyitja az utat a fluoreszcens fénynek. A fluoreszcens fény egy része, a polarizációs síkjának elfordulása miatt a második (P₂) polarizációs szűrőn átjut és így az SP₁-es spektrométerrel egybekötött detektorral felfogható lesz. SP₂ a referencia spektrométer. F₁ szűrő a pumpa, F₂ a kapunyitó nyalábot blokkolja.

A hullámhosszat és a gerjesztés időpontjához viszonyított időadatokat tartalmazó fluoreszcencia-adatok $F(\lambda, t)$ mátrixokként gyűlnek össze a detektálás során. A globális- és célanalízis nevű eljárással (global and target analysis) történik a kiértékelés, amellyel lehetséges a több adatsor kombinálása³. A globális elemzési eljárások gyakran exponenciális átviteli függvények formájában veszik figyelembe az ilyen összetett adatsorokat. Az elemzés célja,

hogy az időfelbontású adatok rendszerspecifikus-modell alapú leírását kapjuk meg számos sebességállandó és fluoreszcencia-spektrum formájában.

A globális elemzés alapja a szuperpozíció elve, amely feltételezi, hogy a mért adatok a különböző komponensek lineáris kombinációjából származnak, amelyek mindegyike külön időállandóval és spektrummal rendelkezik. Tehát a rendszert spektrálisan különböző komponensekből állónak felételezi; súlyozottan összegzi a spektrumokat. Mivel tranziens folyamatokat vizsgálunk a fehérjékben, a koncentráció és a komponensek aránya is időfüggő:

$$F(\lambda,t)=\sum_{i=1}^{n_{komp}} c_i(t)a_i(\lambda) \quad (17)$$

ahol F az n komponensből álló teljes spektrum, $c_i(t)$ a komponensek arányát is mutató időfüggő koncentráció és $a_i(\lambda)$ a komponensek spektruma.

Instrumentáció

A saját építésű berendezés lehetővé teszi a fluoreszcencia-spektrumok mérését 100 fs-ig terjedő időbeli felbontással és akár nanoszekundumos időskálán is. A 390 nm-es gerjesztő impulzust egy béta-bárium-borát kristály segítségével a 780 nm-es lézerimpulzus egy részének frekvenciakettőzésével kapjuk, amely 1 kHz-en működik. A fennmaradó 780 nm-es sugárnyalábot egy motoros késleltető vonalon keresztül vezetjük és a Kerr-médiumba fókuszáljuk, ahol térbeli átfedésben van a minta fluoreszcenciájával. Az alkalmazott Kerr-médium a CS₂ volt (válaszfüggvény szélessége 1,2 ps). A mintát perisztaltikus pumpa segítségével áramoltattuk át az 1 mm-es úthosszúságú optikai cellán. A tranziens fluoreszcencia-spektrumokat minden minta esetében 1500 ps-ig terjedő időkéssel mértük. Az idő- és spektrális felbontású adatsorok globális elemzését a Glotaran segítségével végeztük.

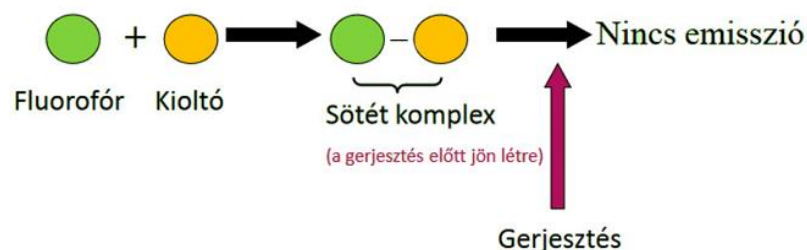
1.9 Fluoreszcencia kioltás (quenching)

A fluoreszcencia kioltás során a fluoreszcencia emisszió megakadályozása történik speciális, ún. kioltó molekulák által; a folyamat tehát a minta fluoreszcencia-intenzitásának csökkenésével jár. Olyan különböző molekuláris kölcsönhatások eredményezhetnek kioltást, mint például a gerjesztett állapotú reakciók, molekuláris átrendeződések, energiaátvitel, alapállapotú komplexképződés és ütközéses kioltás⁴. Látszólagos kioltás is bekövetkezhet a

minta optikai tulajdonságai miatt (a fluorofór túlzott koncentrációja, nagy optikai sűrűség vagy zavarosság csökkentheti a fluoreszcencia intenzitást). Ez a triviális típusú kioltás kevés molekuláris információt tartalmaz. Ebben a fejezetben azt feltételezzük, hogy nem az ilyen triviális hatások okozzák a fluoreszcencia-intenzitás csökkenését.

A fluoreszcenciára képes anyag gerjesztett állapotú elektronja többféleképpen relaxálódhat (1.1 ábra). A kioltás során a gerjesztési energia átvétele történik olyan elektronszerkezetű molekulák által, amelyek ütközések során az energiát átveszik, majd azt pl. hő formájában képesek leadni a környezetüknek, így a fluoreszcencia intenzitása csökken, ami mérhető.

A fluoreszcencia kioltás jelenségén alapuló molekuláris szintű folyamatok eltérése miatt két típus ismert: a statikus és a dinamikus kioltás. A diffúzió által nem befolyásolt statikus kioltás során – a szó mozdulatlanságra utaló jelentéséből fakadóan – már a gerjesztést megelőzően blokkolja a kioltó molekula a fluorofórt, mégpedig azzal komplexet alkotva (1.15 ábra). A sötét komplex nevű egység nem képes fénykibocsátásra. A statikus kioltás kimutatására a fluoreszcencia élettartam nem érzékeny (1.18 ábra), mert amelyik fluorofór nem hoz létre komplexet a kioltóval, az továbbra is emittál fényt adott élettartammal. A fluoreszcencia emisszió intenzitása azonban csökken, mivel lecsökken a sikeresen gerjeszthető fluorofórok száma a populációban.



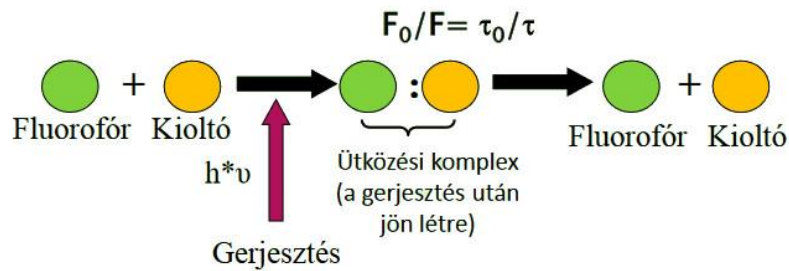
1.15 ábra A statikus kioltás sémája (Forrás:

http://www.biofizika.aok.pte.hu/data/2014/0507/373/Anizotr%C3%B3pia-FRET-Kiolt%C3%A1s_2014.pdf)

A statikus kioltás értékes információforrás lehet a fluoreszcens minta és a fluoreszcens anyag közötti kötődésről (pl. Purin és pirimidin között tipikus), továbbá jelenléte az adatok elemzését is megnehezítő tényező.

Dinamikus kioltáskor a gerjesztést követően, diffúziós folyamatok révén jön létre a tranziens, ún. ütközési komplex a kioltó és a fluorofór molekulából (1.16 ábra). Az ütközési komplex molekulái olyan közel kerülnek egymáshoz, hogy a gerjesztést követő és a kibocsátást megelőző rövid idő alatt lezajló 10^3 - 10^4 ütközés révén átveszi a gerjesztési energia egy részét a

kioltó a fluorofórtól, így az intenzitás és az élettartam is lecsökken (1.18 ábra). A mért paraméterek alapján a fluorofór megközelíthetőségéről, a vizsgált objektum (fehérje) szerkezetéről kapunk információt, hiszen az ütközéses kioltás esetén a kioltószerek a fluorofórhoz kell diffundálnia a gerjesztett állapot (a fluorofór) élettartama alatt. Az ütközéses kioltás sebességi állandója felhasználható a kioltóanyag diffúziós együtthatójának meghatározására.

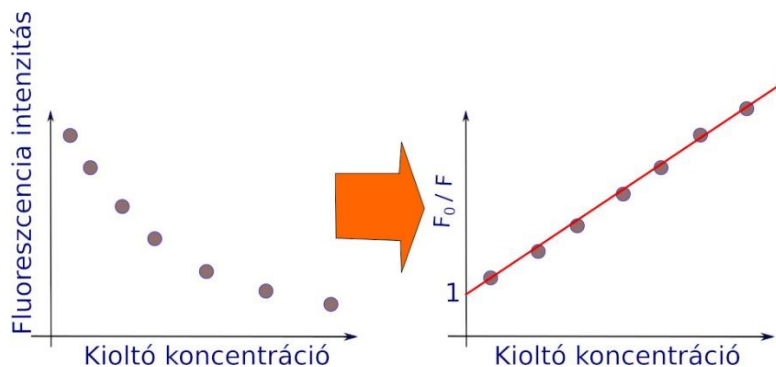


1.16 ábra: A dinamikus kioltás részletei (Forrás:

http://www.biofizika.aok.pte.hu/data/2014/0507/373/Anizotr%C3%B3pia-FRET-Kiolt%C3%A1s_2014.pdf)

A kutatásaimban felhasznált fehérjék instabilitását vizsgáló kísérletsorozat a dinamikus kioltás esetében vet fel módszertani kérdéseket, ezért ezt a módszert részletezem.

A dinamikus kioltási kísérleteknél a kioltó koncentrációjának fokozatos növelése során a mért emissziós intenzitás csökken. Az egyes kioltó koncentrációk mellett mért emissziós intenzitás (fluoreszcencia élettartam) értékeket a kioltó hiányában mért intenzitással (élettartammal) elosztva, majd a koncentráció függvényében ábrázolva, pozitív meredekségű görbét kapunk, amelynek tengelymetszete 1. A görbe meredeksége megadja a K_{SV} –vel jelölt Stern-Volmer állandót (1.17 ábra).



1.17 ábra: A Stern Volmer állandó meghatározása

A Stern-Volmer egyenlet mutatja meg a kioltó hatás mértékét:

$$F_0/F=1+ K_{SV}[Q], \quad (18)$$

ahol F_0 a vizsgált fluorofór emissziós intenzitása kioltó anyag nélkül, F pedig annak jelenlétében, Q a kioltó koncentrációja.

A kioltás hatékonysága fluoreszcencia élettartammal leírva:

$$\tau_0/\tau=1+ K_{SV}[Q], \quad (19)$$

ahol τ_0 a kioltó anyag nélküli, τ pedig annak jelenlétében mért élettartama a fluorofórnak.

$$K_{SV}=k_+ \cdot \tau_0 \quad (20)$$

jellemzi a fluorofór és a kioltó relatív transzportját és a hozzáférhetőséget. k_+ neve: bimolekuláris kioltási állandó.

A (19) egyenlet sötét komplex jelenlétében is alkalmazható, hiszen annak kialakulása nem befolyásolja az élettartamot, tehát az esetleges statikus komponensnek nincsen hatása a dinamikus mérésre.

Érdeemes megjegyezni, hogy K_{SV}^{-1} az a kioltó-koncentráció, amelynél az $F_0/F=2$, vagyis az intenzitás 50%-a kioltódik. A lineáris Stern-Volmer görbe általában egyetlen fluorofór-osztályra utal, amelyek mindegyike egyformán hozzáférhető a kioltó számára. Ha két fluorofór populáció van jelen, és az egyik nem hozzáférhető a kioltó számára, akkor a Stern-Volmer-diagramok elhajlanak a lineáristól az x-tengely felé. Ez történik például abban az esetben, ha a kioltó nem, vagy csak részben képes bejutni a fehérjében elfedetten levő fluorofórhoz, tehát csak a felszínen levő fluorofór kioltása történik meg (pl. több triptofánt tartalmazó fehérje esetén az egyik nem, vagy csak kis mértékben hozzáférhető a kioltó számára). A konformáció változás következtében fellépő fluorofór árnyékolási hatás a Stern-Volmer görbe nagyobb meredekségében mutatkozik meg.

Csupán a lineáris Stern-Volmer-diagram megfigyelése nem bizonyítja, hogy a fluoreszcencia dinamikus kioltása megtörtént. A statikus kioltás is lineáris Stern-Volmer-diagramot eredményez. A statikus és a dinamikus kioltás megkülönböztethető a hőmérséklettől

és a viszkozitástól való eltérő függés, illetve leginkább élettartam-mérések alapján. A magasabb hőmérséklet gyorsabb diffúziót és ezáltal nagyobb mennyiségű ütközéses kioltást eredményez. A magasabb hőmérséklet jellemzően a gyengén kötött komplexek disszociációját, és így a kisebb mértékű statikus kioltást eredményezi. Tisztán dinamikus a kioltás, ha az intenzitásra és az élettartamra vonatkozó Stern-Volmer görbék is lineárisak.

A kioltó számára nem egyformán hozzáférhető fluorofóroknál a hozzáférhető és a kevésbé hozzáférhető által emittált intenzitások hányadának felírásával a fluoreszcencia így csökken:

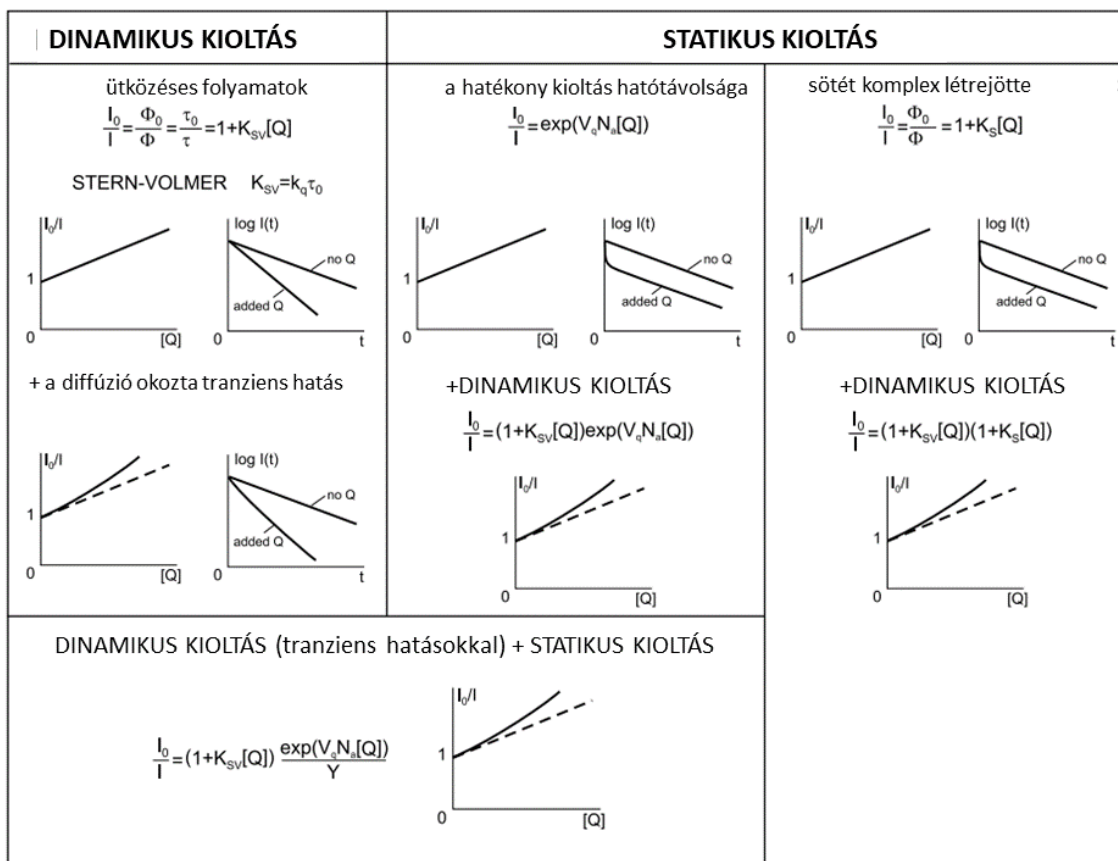
$$\Delta F = F_0 - F = \alpha F_0 + (1 - \alpha) F_0 - \alpha F_0 \frac{1}{1 + K_{SV}[Q]} - (1 - \alpha) F_0 = \alpha F_0 \frac{K_{SV}[Q]}{1 + K_{SV}[Q]}, \quad (21)$$

ahol F_0 intenzitás α hányada hozzáférhető, így kioltható, míg a maradék $(1 - \alpha)$ hányad nem. A fenti egyenlet linearizált formája a módosított Stern-Volmer egyenlet, másik nevén Lehrer egyenlet:

$$\frac{F_0}{\Delta F} - \frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\alpha} \frac{1}{K_{SV}[Q]}. \quad (22)$$

A koncentráció függvényében $\frac{F_0}{\Delta F}$ ábrázolásból kapott egyenes paramétereiből α és K_{SV} meghatározható.

Ugyanaz a kioltó viselkedhet statikus és dinamikus kioltóként is. Ezek arányát meghatározhatjuk, ha az élettartam mérések eredményeként előálló K_{SV} érték meredekségének és az intenzitás-mérésekből adódó K_{SV} meredekségének különbségét képezzük. Mivel az élettartam mérés csak a dinamikus kioltás jelenségére érzékeny, a két meredekség különbségéből a statikusan kioltott fluorofórok mennyiségére következtethetünk. Amikor a fluorofór kioltható statikusan és dinamikusan is ugyanazzal a kioltóval, az intenzitás mérésekből adódó Stern-Volmer-diagramok jellegzetes vonása a felfelé irányuló görbület (F_0/F), azaz konkáv formájú az y-tengely felé.



1.18 ábra Intermolekuláris fotofizikai folyamatok hatásai a fluoreszcencia emisszióra: a statikus és dinamikus kioltás különbözőségei

(Forrás: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Bernard Valeur, 2001)

Ha ugyanazzal a mintával és kioltó koncentrációkkal magasabb hőmérsékleten ismételve a mérést nagyobb meredekségű görbét kapunk, mint az eredeti hőmérséklet esetén, a kioltás dinamikus. A statikus kioltásnál kisebb a meredekség hőmérséklet növelés hatására.

A fluoreszcencia kioltás módszerével a fluorofór környezetének hozzáférhetőségén keresztül a fehérjék szerkezetéről, annak megváltozásáról, a fluorofór mikrokörnyezetének változásáról kaphatunk információt; továbbá alkalmas a fehérjék konformációs állapotának és töltés-viszonyainak feltérképezésére, membránok permeabilitásának és a diffúziós állandóknak a meghatározására.

A kioltók semlegesek és töltéssel rendelkezők lehetnek. A semleges kioltók (pl. akrilamid) a szférikus viszonyok feltérképezésére, a töltéssel rendelkezők (pl. kálium-jodid) a töltésviszonyok meghatározására alkalmasak.

1.10 A fluoreszcencia kioltás mérések kiértékelése

A fluoreszcencia élettartam adatok kiértékelésére diszkrét vagy folytonos függvények alkalmazhatók. Diszkrét függvények esetén egy vagy több exponenciális komponenszt feltételezünk. Bizonyos fluorofórok egyszerre több élettartammal rendelkeznek, amit akkor érdemes az illesztésnél is figyelembe venni, ha ténylegesen többféle populációban (pl. natív és denaturált állapotokban egyszerre) vannak jelen, nem csak matematikailag mutatkoznak meg. Ezekben az esetekben az illesztett görbe az exponenciális függvények lineáris kombinációjából áll elő:

$$I(t) = \sum \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (23)$$

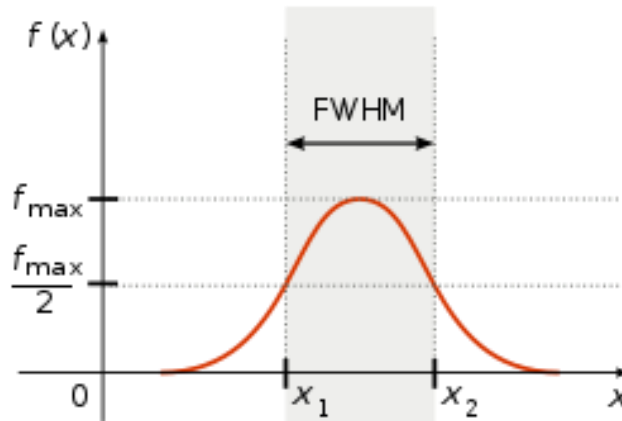
ahol τ_i jelöli a fluoreszcencia élettartam komponenseket, α_i a komponensek amplitúdóját. Mivel az exponenciális függvények nem alkotnak ortogonális rendszert, ezért teljesen önkényes az, hogy hány ilyen függvényt illesztünk a mért eloszlásokra.

A legtöbb fluorofór élettartama leírható két exponenciális komponenssel, ami nem utal egyértelműen a fluorofór heterogén voltára. A különböző élettartam értékekből számított átlagos élettartamnak inkább van fizikai jelentése:

$$\tau_{\text{átlag}} = \frac{\sum \tau_i^2 \cdot \alpha_i}{\sum \tau_i \cdot \alpha_i}. \quad (24)$$

Mivel egyszerre több folyamat megy végbe a relaxáció folyamán (a különböző vibrációs, rotációs szintek miatt sokféle elektron energiaállapot van, innen különböző élettartamú átmenetek lehetségesek; felhasadt állapotok vannak) a fluoreszcencia élettartam görbék kiszélesednek. Ezért indokolt a sok exponenciális függvénnyel való illesztés helyett a Gauss-eloszlás szélességével történő jellemzés.

A folytonos eloszlások közül a Gauss-, Lorentz-, és az egyenletes eloszlásokat alkalmazzák leggyakrabban a fluoreszcencia élettartam adatok kiértékeléséhez. A diszkrét eloszlásokhoz képest a folytonos eloszlásoknál megjelenő paraméter az eloszlás félértékszélessége (1.19 ábra), amely alkalmas a fluorofórok heterogenitásának kimutatására. A félérték-szélesség (Full Width at Half Maximum, FWHM) a félmagasságban mért csúcshélesség, a mi esetünkben idő dimenziójú (ns). A folytonos függvények közül a legjobb jósági paraméterrel rendelkezőnek a Gauss-eloszlás bizonyult, így ezt választottuk.



1.19 ábra A félérték szélesség (Full Width at Half Maximum, FWHM), vagyis a félmagasságban mért csúcshélesség értelmezése, ami a mi esetünkben idő dimenziójú (ns)

Minden energiaállapotnak/nívónak van élettartama (τ) és energia bizonytalansága (kiszélesedése, ΔE). A Heisenberg-féle határozatlansági reláció értelmében ezek kapcsolata:

$$\Delta E \cdot \tau \geq \hbar/2, \quad (25)$$

ahol \hbar a redukált Planck-állandó, vagy másik nevén Dirac-állandó; értéke a Planck állandóból (h): $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,055 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$.

A Gauss-eloszlás sűrűségfüggvénye:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}, \quad (26)$$

ami egy σ szélesség-paraméterű, μ középpontú görbe. A félmagasságnál vett szélesség:

$$\text{FWHM} = 2 \cdot \sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \ln 2} = 2.3548 \cdot \sigma \quad (27)$$

A természetben a centrális határeloszlás tétel értelmében általában a mérhető mennyiségeknek Gauss-eloszlása van, vagyis, ha egy mérhető mennyiség várható értéke μ , akkor a mért értékek eloszlása egy μ körüli Gauss-görbe lesz. Ennek a $+\sigma$ közötti területe a teljes görbe 68%-a (standard deviáció). A (27) szerinti, az élettartam mérésekre jellemző FWHM értékhez tartozó valószínűség a teljes Gauss-függvény területének 76,1 %-át adja.

1.11 Fluoreszcencia anizotrópia

Steady-state fluoreszcencia anizotrópia

A mintában levő molekulák (Brown-mozgáson felüli) orientációs, forgási, diffúziós tulajdonságairól és az ezeket befolyásoló folyamatokról szerezhetünk információt az anizotrópia mérésével (pl. rotációs diffúzió meghatározása), amelyből a fluorofór molekulákon keresztül a vizsgálni kívánt molekulák közötti interakciókra, konformációs változásokra, molekuláris orientációra és mobilitásra következtethetünk.

Izotróp rendszereknek nevezzük, amelyekben nincsenek, anizotrópnak, amelyekben vannak kitüntetett irányok. A fluoreszcencia anizotrópia fogalmánál az „irány” a fénypolarizáció szempontjából lényeges. A síkban polarizált fény elektromos térerősség vektorának síkja a terjedés során állandó. A poláros fényrel gerjesztett izotróp fluorofór populáció a megvilágítást követően anizotróppá válik, de síkban poláros fényt emittál.

Azok a molekulák élveznek előnyt a gerjesztés szempontjából, amelyek szerkezete által meghatározott abszorpciós átmeneti momentuma (abszorpciós átmeneti momentum vektora) a gerjesztés polarizációs síkjához igazodik. Ezt nevezzük fotoszelekciónak. A gerjesztés polarizációs síkjára merőlegesen tájolt abszorpciós átmeneti momentummal rendelkező molekulák nem gerjesztődnek, alapállapotban maradnak. A kibocsátott fluoreszcens foton polarizációs síkját a molekula emissziós átmeneti momentumának orientációja határozza meg, ez maga a molekula orientációja az emisszió pillanatában.

A fluoreszcencia polarizáció mértéke anizotrópiában kifejezve dimenzió nélküli szám, amely a rendszer mozgékonyaságától függ: minél mozgékonyabb, „forgékonyabb” a fénykibocsátás időtartama alatt, annál kevésbé lesz polarizált a fluorofór populáció által emittált fény. Az anizotrópia nem függ a fluorofór koncentrációjától.

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad (28)$$

ahol I az intenzitást jelöli, V és H alsó indexek a vertikális és horizontális polarizátor állásokat a gerjesztés és emisszió sorrendjében, G pedig a műszerre vonatkozó G -faktor, amely I_{HH}/I_{HV} hányadossal számolható. A teljes emisszióhoz képesti eltérés az informatív a két szélsőséges (vertikális és horizontális) helyzetben. Teljes rendezetlenség és kötöttség nélküli elfordulás esetén közel azonos lenne az eltérés a két iránybeli emissziós intenzitásban, ami a képlet alapján

nullára csökkent anizotrópiát jelent. Fehérjékhez kötött fluorofórok esetén az anizotrópia érték a -0,2 és 0,4 közötti tartományban van.

A méréseim során alkalmazott steady-state anizotrópia időben átlagolt értéket közöl. Az anizotrópia változásait a fluorofór mozgékonyságának változása okozza. A méréshez a gerjesztési és emissziós oldalon polarizátorral ellátott fluoriméter alkalmas. A gerjesztési oldalon levő polarizátor állandó állásban van a mérés során, a megvilágító fény vertikális polarizációját biztosítja. Az emissziós oldalon levő polarizátor a mérés során folyamatosan forog vertikális és horizontális állásokba a detektálás idejére. A mérés időtartama alatt a megfelelő polarizátor állásokban felvett intenzitás értékekből számol a műszer anizotrópiát, majd átlagolja.

1.12 Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A differenciális kalorimetria olyan termikus analitikai módszer, amely során a közel azonos hőkapacitású vizsgálandó és referencia minták hőmérsékleteit iker elrendezésben monitorozzuk. A cellákban levő anyagok egyforma, lassú melegítése közben (0,3 K/perc) a köztük levő hőmérsékletkülönbség 0 értéken tartása a cél, amelyet hőkompenzációval (a minta vagy a referencia fűtése által) lehet elérni. Amennyiben a minta és a referencia termikus tulajdonságai különböznek, a köztük mérhető különbség zérustól eltér. A minta endoterm szerkezeti változása esetén a hőmérséklet adott ütemű emeléséhez és a hőmérsékletkülönbség 0-n tartásához több hőre van szükség, mint a referencia esetén. Exoterm változás esetén a referencia cella igényel több hőt. Az időegység alatt befektetett hőáram (mW egységben) közvetlenül mérhető a hőmérséklet függvényében. A módszer érzékeny a makromolekuláris rendszerekben zajló kicsiny termodinamikai változásokra azok hőkapacitásának megváltozásán keresztül. Mivel a hőmérséklet emelése/csökkentése a fehérjék szerkezetének rendszerspecifikus módosulásával jár (jellegzetes DSC görbe), bármilyen környezeti vagy strukturális eltérés kimutatható a tipikus görbétől különböző kalorimetriás méréssel. A termogram (dQ/dt a T függvényében) alapvonala alatti értékeket kapunk exoterm, és felettieket endoterm esetben.

2 Fotoaktív fehérjék

A fény számos fehérje biológiai működésében játszik fontos szerepet. A fotoaktív (másnéven fotoreceptor) fehérjék széles körben elterjedtek a természetben; lehetővé teszik a biológiai fotoreceptorokban a jelátvitelt, amelyet egy adott hullámhosszúságú foton elnyelése vált ki. A jelátviteli kaszkád végeredménye rendkívül változatos lehet: látás, a fény energiájának felhasználása, a fény követése vagy éppen elkerülése.

Míg a "fotoreceptor" kifejezés a zoológiában fényre reagáló sejtet (mint például a pálcikák és a csapok a szemünkben), a növénytudósok számára olyan pigmentmolekulát jelent (mint például a rodopszin vagy a fitokróm), amely elnyeli a fényt és a fényérzékeléshez vagy egy fiziológiai folyamat fény általi szabályozásához vezető események láncolatának kezdetén áll. A fotoreceptor fehérjék nagy változatosságot mutatnak funkciójuk, fényérzékelő és jelátviteli mechanizmusuk, fényérzékelő egységük szerint.

A fényfüggő enzimeknek folyamatosan fényre van szükségük a funkcióik ellátásához. Ebbe a csoportba tartoznak a DNS-fotoliázok, az OaPAC, a NADPH-protoklorofilid-oxidoreduktáz és az aszpartát-transzamináz. A fényaktivált enzimek, ha egyszer megvilágítás hatására aktiválódnak, sötétben is képesek katalitikusan aktívak maradni és gyakran inaktíválhatók az aktiváló fénytől eltérő hullámhosszúságú fény hatására (pl. Dronpa). A fényszabályozott ionpumpák (pl. rodopszinok) ionokat pumpálnak ki a sejtéből a membránon keresztül, ezáltal a fényt kémiai energiává alakítják, a fényvezérelt ioncsatornák (pl. channelrodopszinok) fény által szabályozott kationcsatornáként a sejt belsejébe szállítanak kationokat.

A fotoreceptor fehérjék legismertebb családjai közül a rodopszinok, xantofinok és fitokrómok esetén a fény hatására jelentős, míg a flavoproteinek esetén csekélyebb szerkezeti változások mennek végbe a fehérjében.

2.1 A fotoaktív flavoproteinek

A fotoaktív flavoproteinek tudományban való megfigyelése hosszú múltra tekint vissza; a flavinhoz kötődő kék/UVA fényérzékelők tanulmányozása azonban az elmúlt évtizedekben élénkült fel. *Winslow Briggs* 2006-ban lenyűgöző történeti áttekintést írt többek között arról, hogy csaknem 200 éve számoltak be a tudósok a fény színének a növények növekedésére és morfogenezisére gyakorolt hatásáról, de a titokzatos kriptokróm és a régóta keresett fototropinok azonosítása csak az elmúlt húsz évben történt meg. Világossá vált, hogy a növényi kék fényt érzékelő fotoreceptorok riboflavin származékokat kötnek; a fotoizomerizáció

dogmája megdőlt. A kék fényt érzékelő flavoproteinek világa 2002-ben lépett új kutatási korszakba, amikor az egysejtű ostoros *Euglena gracilis*-ben található fotoaktivált adenil-cikláz (PAC) úgy karakterizálták, mint a BLUF (Blue-Light sensing Using Flavin) nevű új típusú, FAD-ot kötő domént tartalmazó fehérjét. Ugyanebben a 2002-es évben egy további BLUF és egy LOV (Light Oxygen Voltage) fehérjét írtak le baktériumokban: az előbbit, az AppA-t a fotoszintetizáló cianobaktérium *Rhodobacter sphaeroides* fotoszintézis génjeinek szabályozásában részt vevő fény- és redoxszenzor keresése során izolálták, az utóbbit, a *Bacillus subtilis* YtvA-t egy kombinált *in silico* és molekuláris biológiai megközelítéssel fedezték fel. Azóta az azonosított prokarióta LOV és BLUF fehérjék száma folyamatosan növekszik és fényérzékelő mechanizmusukról is egyre többet tudunk.

1. táblázat: A fotoaktív flavoproteinek csoportjai, fotokémiája és funkciói
(A táblázat forrása: A. Lukacs, P.J Tonge, S. Meech, *Acc. of Chem. Res.*, 2022.)

Flavoprotein	Fotokémia	Funkció
Fotoliáz/kriptokrómok	elektron transzfer	DNS javítás, cirkadián ritmus szabályozása, mágneses tér érzékelése
Light Oxygen Voltage (LOV)	kovalens kötés a flavin és egy közeli cisztein között	Fototropizmus és fototaxis szabályozása növényekben és baktériumokban
Blue Light Using FAD (BLUF)	Hidrogén kötés rendszer átalakulása, elektron/protontranszfer (?)	Szabályozás 1) cAMP – termelés szabályozása Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) 2) A fotoszintetikus gének bioszintézisének szabályozása

A fotoaktív flavoproteinek olyan fehérjék, amelyek flavin segítségével reagálnak a megvilágításra. A flavint tartalmazó fehérjék töredéke fotoaktív; három csoportba soroljuk őket aszerint, hogyan reagálnak a fényre (1. táblázat). A három flavoprotein csoport: a fotoliázok/kriptokrómok, a Light Oxygen Voltage (LOV) fehérjék és a Blue Light sensing Using FAD (BLUF) domén fehérjék. Míg a legismertebb fotoreceptor családokban (pl. rodopszin, fitokróm, és xantofin) a fény érzékelése a kromofórbeli cisz-transz izomerizációt

követően jön létre, a flavoproteinek esetén a megvilágítást követő elsődleges lépés elektron/proton transzfer, cisztein addukt kialakulása vagy a hidrogénkötés rendszer átalakulása lehet (1. táblázat).

A kriptokrómok és a fotoliázok két kromofórral rendelkező fehérjék, 55-70 kDa tömegűek, amelyek két nem-kovalens módon kötött prosztetikus csoportot tartalmaznak: egy foto-redox aktív FAD-ot és egy antenna kromofórt (MTHF). A fotoliáz feladata az UV-indukált léziók javítása a DNS szálban. UV-fény hatására ugyanis a DNS szálban ciklobután pirimidin dimerek (CPD) alakulnak ki. Az enzim megköti a hibás DNS szakaszt, majd fény hatására a flavinról egy elektron kerül a CPD-re, aminek következtében ez felbomlik. DNS javítására a flavin csak a kétszeresen redukált – $FADH^-$ – állapotában alkalmas. A kriptokrómok nagyfokú szekvenciális homológiát mutatnak a fotoliázokkal, de nem képesek DNS javításra. Kék fény hatására aktiválódó enzim funkcióval rendelkeznek, a növények növekedésének szabályozásában, a cirkadián ritmus szabályozásában vesznek részt. Mindkét fehérjecsoport elektrontranszferen keresztül képes a fény érzékelését követően szerepét ellátni. A gerjesztett flavinhoz elektron kerül egy közeli triptofánról, majd továbbítódik több lépésben. A LOV fehérjékben a fényabszorpció hatására a flavin triplett állapotba kerülését követően létrejövő kovalens kötés (a flavin C4-es atomja és egy közeli cisztein között) indítja el a konformációs változást. Számos magasabb rendű növény, alga, gomba és baktérium használja a PAS (PerArntSims) szupercsaládba tartozó LOV fehérjét a környezeti feltételek érzékelésére. Magasabb rendű növényekben a fototropizmus, a kloroplasztiszok áthelyeződésének és a sztómányitásnak a szabályozására, míg gombáknál a sejtek cirkadián időbeli szerveződésének a napi és szezonális időszakokhoz való igazítására szolgál.

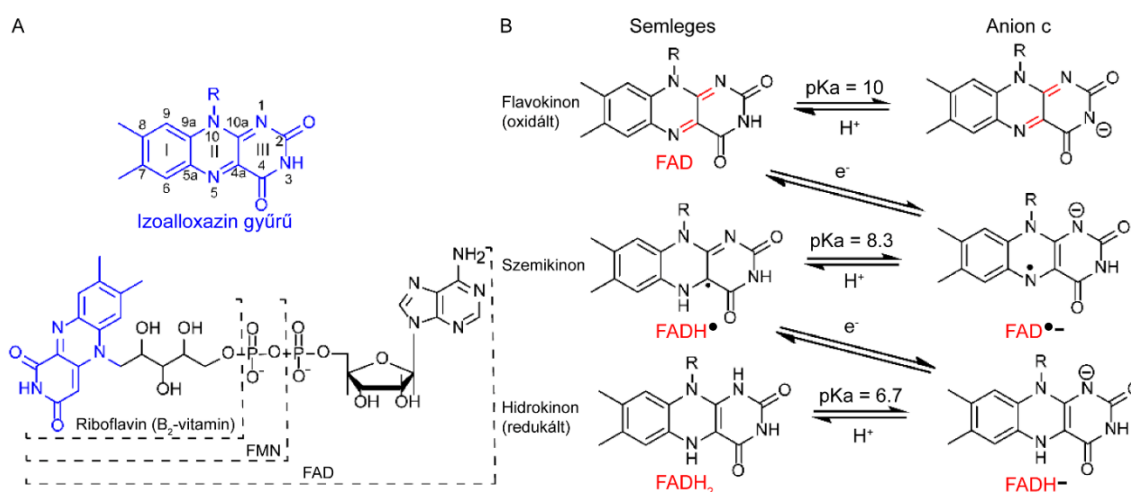
Míg a kriptokrómok és fotoliázok esetében az elektrontranszfer játszik kulcsszerepet a funkcióban⁶⁻¹², a BLUF domén fehérjék esetén annyi tisztázott, hogy a flavin körüli hidrogénkötés rendszer fény hatására történő átrendeződését követően válnak funkcionálissá¹³⁻¹⁵ (pl. AppA). A szerkezetváltozást keltő mechanizmus azonban nem minden esetben teljesen világos, ugyanis az ismert BLUF domén fehérjék mintegy felénél fényindukált elektrontranszfer (valójában proton kapcsolt elektron transzfer) folyamatok jelenléte is igazolt a hidrogénkötés rendszer átalakulásával párhuzamosan vagy azt megelőzően. Az elektron/proton transzfer szerepe az OaPAC funkciójában is nyitott kérdés.

A LOV és BLUF domének kicsi (kb. 100-110 aminosav; „rövid szenzoroknak” is nevezik őket), kompakt és moduláris fényérzékelő egységek. A LOV vagy BLUF domének különféle enzimatikus tartományokhoz kapcsolódnak, amelyek a legtöbb esetben meghatározzák a fehérje funkcióját (pl. kinázok, foszfodiészterázok, DNS-kötő fehérjék). A LOV-

fotofunkcionalitásának egyetlen kritériuma a flavin-cisztein-addukt létrejötte, a LOV és BLUF esetén pedig egy hosszabb hullámhosszak felé tolódó abszorpciós spektrumú átmeneti állapot képződésének képessége.

2.2 Flavín, a fényérzékelő kofaktor

Számos kék fényt érzékelő fotoreceptor kromofórként flavint (a „flavus” szó latinul sárgát jelent) használ, ahol a fényelnyelés a flavin (izoalloxazin) gyűrűben lokalizálódik. A flavin FMN (flavin mononukleotid) vagy FAD (flavin dinukleotid) formája jelenik meg a flavoproteinekben (2.1 ábra) prosztetikus csoportként. Az izoalloxazin gyűrű három gyűrűt tartalmazó heterociklusos vegyület, ami egy pteridin magra épül; ribitil-foszfát és ribitil-adenin difoszfáttal egészül ki flavinná.



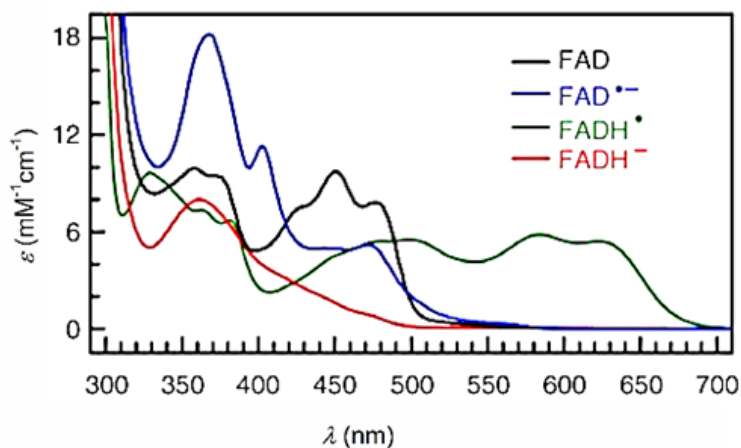
2.1 ábra: A flavin szerkezete (A) és redox állapotai (B) (forrás: Miura, 2001)

A semleges vagy anionos formában előforduló flavinok három különböző redoxállapot között képesek váltani: a teljesen oxidált (FAD_{ox}), az egy elektronnal redukált vagy félkinonikus/szemikinon (FADH•) forma és a hidrokinon (FADH₂), a két elektronnal teljesen redukált forma között. A FAD ezen állapotok között elektronok felvételével vagy leadásával alakul át. Redukciójukat hidrogénatomok hozzáadásával hajtják végre az izoalloxazin gyűrű bizonyos nitrogénatomjaihoz. Fiziológias pH-n vizes oldatban a szemikinon és a hidrokinon további ionos egyensúlyban is jelen lehet, a pK_a értékük 8,3, illetve 6,7.

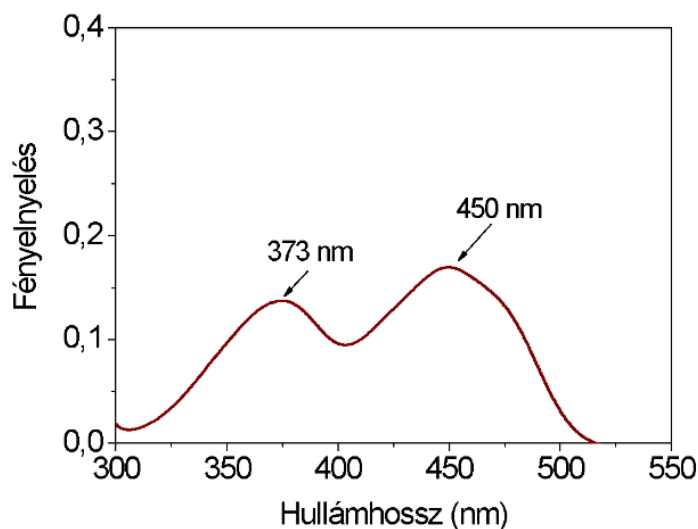
A FAD teljesen oxidált formájában, azaz kinon formájában két elektron és két proton

felvételével alakul FADH₂-vé (hidrokinon formává). A félkinon (FADH•) a FAD redukciójával vagy a FADH₂ oxidációjával képződhet egy elektron és egy proton felvételével vagy leadásával. A különböző oxidációs állapotú flavinok vizes oldatban más-más színűek. A FAD_{ox} sárga (2.2 A ábra), a FADH (félíg redukált) a pH-tól függően kék vagy vörös, a teljesen redukált forma pedig színtelen. Az öt redoxállapot közül két redoxpár, az oxidált flavin/anionos szemikinin (FAD_{ox} és FAD•⁻) és a semleges szemikinin/anionos hidrokinon (FADH• és FADH⁻) gyakran vesz részt elektronátviteli folyamatokban.

A FAD különböző oxidált állapotainak spektroszkópiai tulajdonságai lehetővé teszik az oxidációs állapot változásával járó reakciók nyomon követését UV-látható abszorpciós- és fluoreszcencia spektroszkópiával. A FAD minden egyes formája eltérő abszorpciós spektrummal rendelkezik (2.2 B ábra), így könnyen megfigyelhető az oxidációs állapot változása. Az UVB-látható tartományban a FAD_{ox} abszorpciós spektruma (2.2 C ábra) három fő ππ* sávból áll, amelynek csúcsai kb. 446, 370 és 265 nm-en vannak, (ε⁴⁴⁶=11300 M⁻¹cm⁻¹). A szemikinin forma abszorpciós maximuma a magasabb hullámhosszak felé erősen eltol, kb. 650 nm-nél található. A hidrokinon strukturálatlan spektrumot mutat, amelynek maximuma az UVB tartományban van.



2.2 A ábra A semleges flavin gyök kékes színű, az oxidált FAD citromságra. 2.2 B ábra A FAD abszorpciós spektrumai oxidált, anionos szemikinin gyök, semleges szemikinin gyök és anionos hidrokinon gyök állapotában (Az ábra forrása: https://www.researchgate.net/figure/Absorption-spectra-of-FAD-in-various-oxidation-and-protonation-states-Adapted-from-52_fig1_260132167)



2.2 C ábra Az FMN abszorpciós spektruma (10 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 8 pufferben oldva)

A flavinok általában fluoreszcens aktivitással is rendelkeznek. Ezt a tulajdonságot ki lehet használni a fehérjék kötődésének vizsgálatakor, megfigyelve a fluoreszcencia intenzitás megváltozását, amikor kötött állapotba kerülnek. Az oxidált flavinok legnagyobb elnyelése 450 nm körül van, és körülbelül 515-520 nm-en fluoreszkálnak. A flavinok fotokémiájának megértéséhez alapvető paraméter a fotogerjesztés hatására bekövetkező redoxpotenciál-változás (kb. -0,3 V-ról kb. +1,9 V-ra), ami azt jelzi, hogy a flavinok a gerjesztett állapotban sokkal erősebb oxidálószer, mint alapállapotban. A második fontos tulajdonságuk a meglehetősen magas fluoreszcencia kvantumhatásfokuk (0,25-0,3), az oldatban levő FAD kivételével. A flavinok a fehérjékben és még oldatban is elektron akceptorként viselkednek, vagyis gerjesztett állapotban a környezetükből (közeli molekuláktól) elektront vesznek fel. Továbbá jellemző rájuk a molekuláris oxigénre történő hatékony energiaátadás.

A flavin molekula két aromás gyűrűjéből az izoalloxazin csoport képes fluoreszcenciára, az ADP csoport nem. Amikor a két csoport távol van egymástól (nyitott állapot), a FAD fluoreszcencia élettartama a nanoszekundumos tartományba esik (~3 ns). Az ADP csoport az izoalloxazin gyűrű közelébe kerülve (összehajtott konformáció) kioltja annak fluoreszcenciáját, így az élettartam ps-os nagyságrendre csökken (~9 ps). Zárt konformáció esetén a rövid lecsengés oka a gyors intramolekuláris elektron transzfer az adenin és a gerjesztett izoalloxazin csoportok között: a gerjesztést követően a ribitil lánc végén található

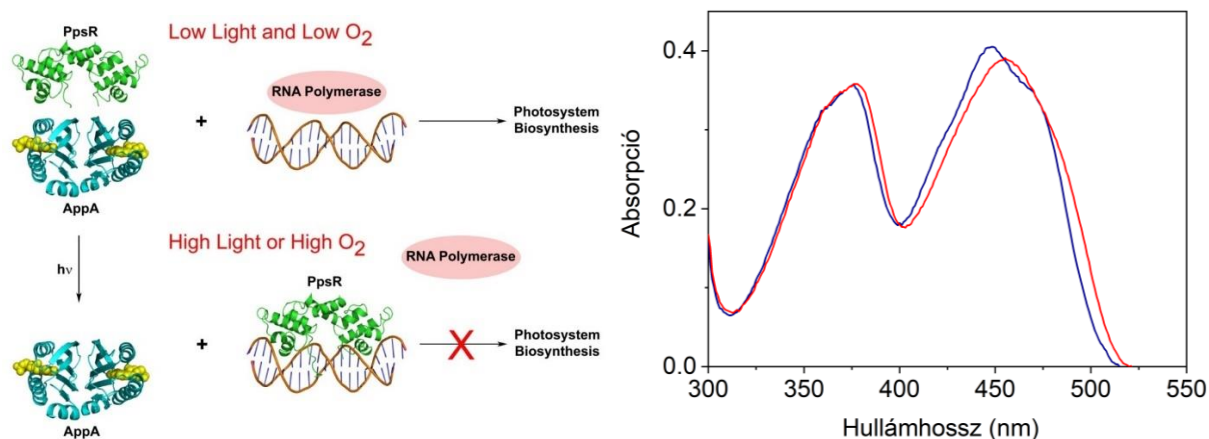
adenin gyűrűről egy elektron „ugrik” az izoalloxazin gyűrűre¹⁶. Az izoalloxazin körüli környezet változására a fluoreszcencia élettartam érzékeny¹⁷⁻¹⁹.

A flavin kémiai sokoldalúsága miatt a flavoproteinek széles körben elterjedtek és a biológiai tevékenységek széles spektrumában vesznek részt, például a sejtek apoptózisában, méregtelenítésében, metabolitok dehidrogénezésében, oxigénaktiválásban, redoxireakciókban, aromás szubsztrátok halogénezésében, fényvezérelt DNS-javításban és kék fény fotoreceptorokban.

2.3 A BLUF domén fehérjék

A 2002-ben felfedezett BLUF-domén különösen érdekes, mivel ez egy olyan moduláris egység, amely számos kék fényt érzékelő fehérjében megtalálható; a baktériumok tizede rendelkezik BLUF fehérjékkel. A kék fény érzékeléséhez flavint használó fehérjecsaládba (BLUF: **B**lue **L**ight sensing **U**sing **F**AD rövidítése) tartozók funkciója lehet az enzim aktivitás (pl. OaPAC-ben a cAMP szintjének szabályozása), a fototaxis, a fotofób válasz (*Euglena gracilis*, PixD /*Synechocystis* sp. PCC6803), vagy a génexpresszió szabályozása (pl. AppA/*Rhodobacter sphaerooides* – fotoszintetikus gének expressziójának a szabályozása)^{15,20-24}.

A kutatócsoportunk által is régóta vizsgált AppA (Activation of Photopigment and puc expression A) fehérje a fotoszintetikus gének bioszintézisét szabályozza a fény és az oxigénszint függvényében. A fehérje két doménből áll: egy N-terminális kék fényt hasznosító flavin (BLUF) doménből, amely a flavin adenin-dinukleotid (FAD) kromofórt köti és egy C-terminális doménből, amely a transzkripció faktor, a PpsR kötőhelye. Alacsony fény- és oxigénszegény környezetben az AppA hozzákapcsolódik a PpsR-hez, de kék fény megvilágításakor konformációs változáson megy keresztül, ami a transzkripció faktor felszabadulását eredményezi, amely aztán a DNS-hez kötődve gátolja a fotoszisztéma bioszintézisét (2.3 bal oldali ábra)²⁵. A konformáció változáshoz a FAD körüli aminosavak hidrogénkötés hálózatának pikoszekundumok alatt bekövetkező átrendeződése vezet. (A fehérje világos állapota mikro- vagy milliszekundumok alatt jön létre.)



2.3 ábra: Bal oldali ábra: kék fény hatására az AppA-PpsR komplex disszociálódik (forrás: Peter J. Tonge). Jobb oldali ábra: az AppA abszorpciós spektruma sötét (kék) és világos (vörös) állapotban, ahol a flavin 450 nm körüli csúcsa 10 nm-rel a hosszabb hullámhosszak fele tolódik.

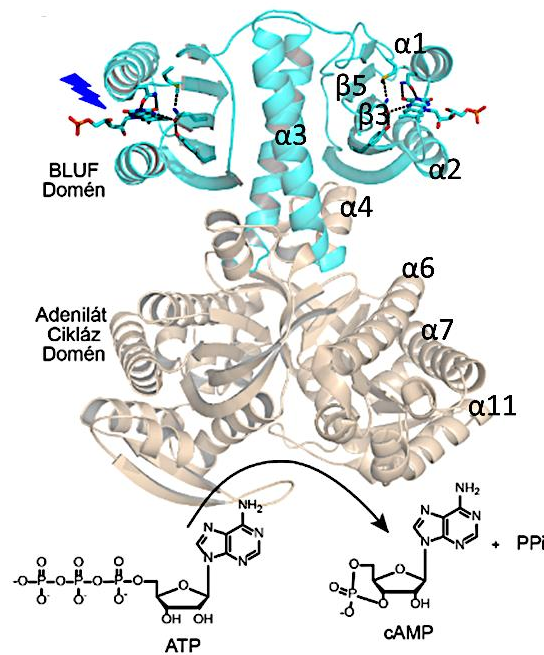
A kórházi környezetben tenyésztő és fertőzéseket okozó, multirezisztens *Acetivobacter baumannii*-ban található BLUF domén fehérje, a BlsA fényérzékelése révén a baktérium motilitása és biofilmképzése leáll, a virulenciája fokozódik²⁶.

Mindegyik BLUF esetében megfigyelhető a flavin 450 nm körüli abszorpciós csúcsának 10-15 nm-es eltolódása (2.3 jobb oldali ábra) a megvilágítás hatására a FAD körüli hidrogénkötés rendszer átrendeződése miatt. Az összes BLUF domén szerkezetében megtalálható egy flavinhoz közeli tirozin, glutamin és egy kivétellel egy triptofán.

2.4 Az OaPAC szerkezete és rendeltetése

A fényel aktiválható adenilát-ciklázok (Photoactivated Adenylyl Cyclase, PAC) olyan fotoaktív flavoenzimek, amelyekben az ATP-t cAMP-vé és szervesen pirofoszfáttá történő átalakításának funkciója a kék fényt érzékelő képességgel társul. A PAC-ok esetén az ATP-cAMP konverzió G-protein jelenléte nélkül megy végbe. A fotoaktivált adenilát-ciklázok (PAC) családjába tartozó OaPAC (az „Oa” a fotoszintetizáló cianobaktériumból, az *Oscillatoria acuminatá*ból való származásra utal) egy 366 aminosavból álló, 87,02 kDa tömegű homodimer fehérje, amely egy N-terminális BLUF doménből és egy C-terminális III. típusú adenil-cikláz (AC) doménből áll (2.4 ábra)^{27,28}. A fehérjét monomerenként 12 β -lemez és 11 α -hélix építi fel. Az, hogy mindkét domén egyszerre vizsgálható objektumban van jelen, a teljes folyamat megfigyelését teszi lehetővé, vagyis a fényérzékeléstől a cAMP termelésig történő

változások teljes sorozatát. Az Appa BLUF domén fehérje esetén a Ppsr komplex nélküli domén vizsgálatai a folyamatnak csak egy részére korlátoznak.

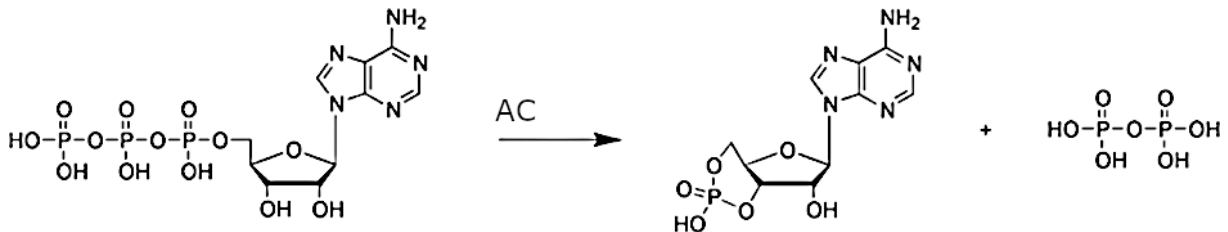


2.4 ábra: Az OaPAC (PDB 5X4T) szerkezete a fényérzékelésben részt vevő BLUF doménnel és az ATP-cAMP konverzió felelőse, az AC domén (Az ábra forrása: Lukács et al 2022.)

A fotoaktiválást az enzim N-terminális végén található BLUF domén vezérli. A katalitikus domén az adenilát-cikláz (AC), amelyben ATP-kötő hely található. Az OaPAC két BLUF doménje közel van egymáshoz; egymásba fonódó coiled-coil struktúrát alkot egy pár alfa-hélixen ($\alpha 3$ és szimmetriatársa) keresztül, amelyek az AC doménhez kapcsolódnak. A BLUF doménon található $\beta 5$ -lemez egy rövid hurokrégióval kapcsolódik a központi $\alpha 3$ hélix N-terminális végéhez. A BLUF domének nem érintkeznek közvetlenül az AC doménnel, de az $\alpha 3$ hélix C-terminális vége érintkezik a partner alegység AC doménjével. A dimer ellentétes oldalán levő két flavin mononukleotid (FMN) kötőhely több mint 45Å távolságra található egymástól; az ATP kötő zseb is hasonló távolságra van a fényérzékelő csoportoktól, egyenlő oldalú háromszög módjára.

A számos fényérzékes fehérjében megtalálható BLUF egységek FMN vagy FAD közvetítésével reagálnak a kék fényre és ezáltal szabályozzák a hozzájuk kapcsolt enzim aktivitását (vagy megváltoztatják annak aktivitását egy represszor fehérjéhez). Így a fehérjének sötét (inaktív) és világos (aktív) állapotát különböztethetjük és nevezhetjük meg. A sötét és

világos állapotbeli szerkezeti különbségek - kristályosított fehérjék esetén vizsgálva - nagyon kicsik, de olyan összehangolt eltolódások, amelyek (akár 20-szoros) enzimaktivitást váltanak ki több tíz ångströmnyire a kromofórtól.



2.5 ábra Az aktivált adenilát-cikláz ATP-ből cAMP konverziója. A reakció Mg-ionokat igénylő folyamat.

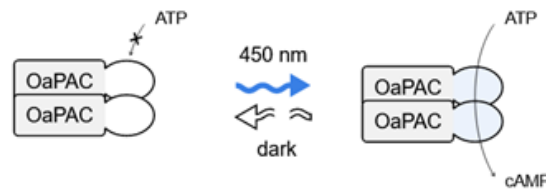
(Az ábra forrása: <https://hu.wikipedia.org/wiki/Adenil%C3%A1t-cikl%C3%A1z>)

A BLUF doménhez kapcsolt adenilát-cikláz ATP-ből ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfátot (cAMP) képez, amely molekula másodlagos hírvivőként különböző jelátviteli folyamatokban vesz részt, temérdek sejtfunkciót szabályoz. Mivel az OaPAC mutatja az eddig leírt PAC fehérjék közül a legalacsonyabb aktivitást sötétben, a kék fény hatására azonnal megindul a cAMP termelés, azaz hirtelen nő meg az ATP cAMP-vé történő átalakulásának sebessége. A cAMP termelés fényel történő finomhangolt vezérlésének lehetősége miatt tehát az OaPAC az optogenetikai kutatásokban kiemelt jelentőségű modellrendszer. Előremutató, hogy az *Euglena gracilis* nevű csillós ostoros egysejtűből izolált EuPAC a tengeri haslábú *Aplysia* neuronjaiban kifejezve lehetővé tette a neuronok stimulációjának fotokontrollját²⁹; a szulfidoxidáló baktériumban (*Beggiatoa*) található bPAC enzimet pedig transzgenikus egerekben használták a spermiumok fényvezérelt flagelláris ostorszerű mozgatása során³⁰. Ez utóbbi 300-szorosára növeli a cAMP átalakító aktivitását az OaPAC-hez képest.

Az ATP cAMP-vé való átalakulása úgy történik, hogy az enzim ciklikus foszfodiészter kötést hoz létre az ATP α -foszfát csoportja és a ribózban levő 3' C atom OH csoportja között. Eközben pirofoszfát szabadul fel (2.5 ábra). A foszfátcsoportok közötti kötésekben energia raktározódik, amely hasításával átlagosan 30 kJ energia szabadul fel mólonként.

Az OaPAC fehérjében a fénygerjesztés aktiválta adenilát-cikláz hirtelen megnöveli az ATP cAMP-vé való átalakulásának sebességét, amely intracelluláris cAMP szint növekedéséhez vezet (2.6 ábra). Az OaPAC AC-aktivitását a fény akár 20-szorosára is serkentheti a sötétben mért alapszinthez képest. (Az optimális optogenetikai eszköznek "csendesnek" kell lennie a sötétben, fény hatására azonban nagymértékben kell reagálnia.)

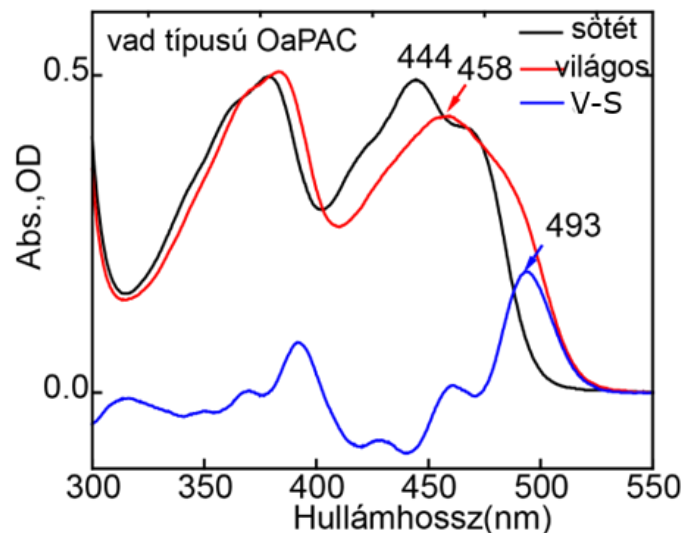
OaPAC



2.6 ábra Az OaPAC fehérjében fénygerjesztés aktiválja az adenilát-cikláz (Forrás: <https://www.optobase.org/switches/BLUF-domains/OaPAC/>)

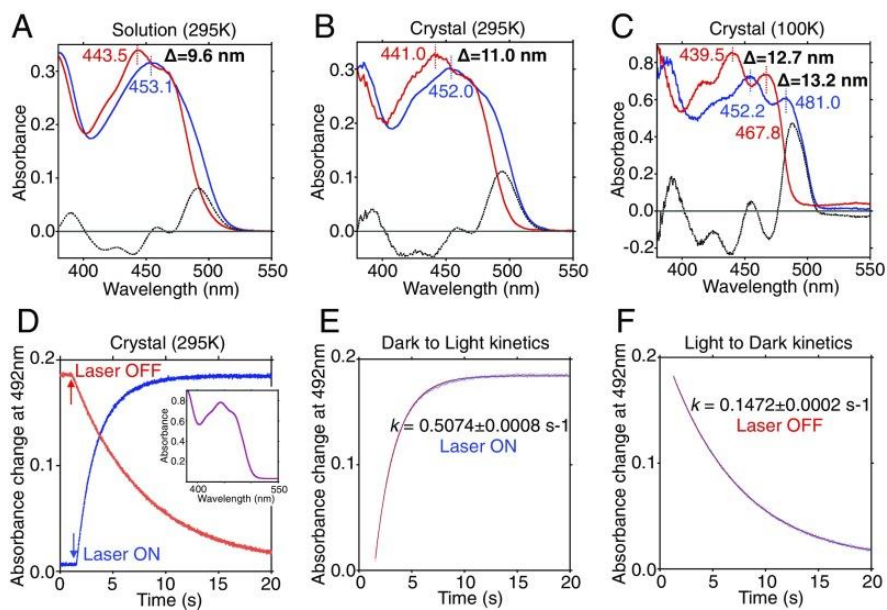
2.4.1 Az OaPac spektrális sajátosságai

A BLUF-doménben a kék fény flavin általi abszorpcióját a hidrogénkötés-hálózat átrendeződése jellemzi, amit a $\pi \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$) flavin átmenet (444 nm-es csúcs) ~ 10 nm-es vörös eltolódása tükröz. Az $S_0 \rightarrow S_2$ átmenetnek a 360 nm körüli csúcs felel meg. Az OaPAC abszorpciós spektruma tehát nagyon informatív: a sötét és világos állapotok jelentősen elkülönülnek; könnyen megkülönböztethetők a spektrum alakja (ún. váll megléte vagy hiánya) és a 450 nm körüli abszorpciós maximum elhelyezkedése miatt (2.7 ábra).

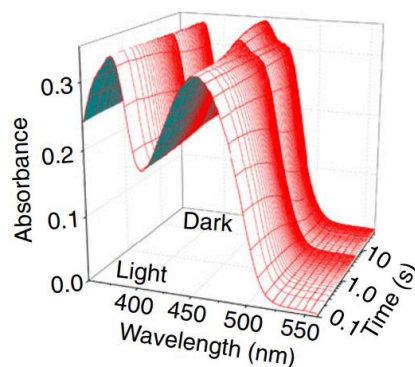


2.7 ábra A vad típusú OaPAC abszorpciós spektruma sötét (fekete vonal) és világos (piros vonal) állapotban. Kékkel látható a különbség spektrum. (Forrás: Collado et al., 2022)

A sötét állapot (fekete vonal) látható spektrumának nagyjából 10 nm-es vöröseltolódása látható a világos állapotban (piros vonal); ezt tekintjük a fotoaktivitásra való képesség markerének. A különbséget az ábrán a kék vonal jelzi. Az OaPAC legnagyobb abszorpciós különbsége (világos állapot mínusz sötét állapot) 493 nm hullámhosszon látható. Ezért ezen a hullámhosszon érdemes leginkább olyan időfüggő abszorpció-méréseket végezni, amely a sötét és világos állapotok közötti átmeneteket vizsgálja (2.8 ábra). Látványosan demonstrálja a spektrális változásokat a 2.9 ábrán bemutatott teljes spektrum valós idejű visszatérése a világos állapotból a sötét állapotba.



2.8 ábra Az OaPAC világos állapotának kialakulási és bomlási kinetikája. Az aktiválódás a 492 nm-en mért abszorbancia-változással van nyomonkövetve. A kék vonal a 405 nm-es lézerral történő besugárzás alatti fotoaktiválást, a piros vonal a stimuláció megszűntetése utáni relaxációt jelzi. (Okhi, 2017)

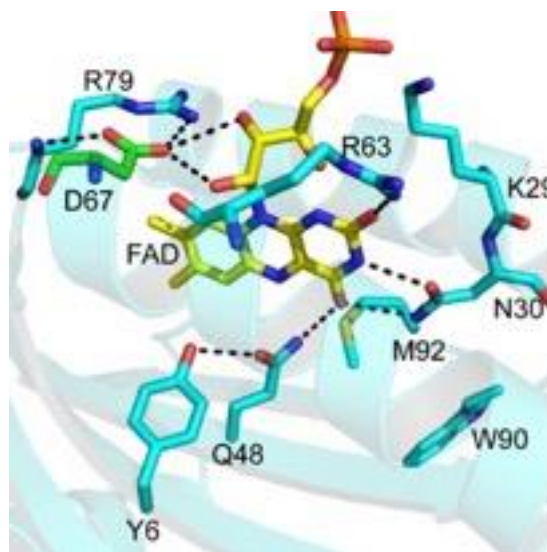


2.9. ábra Gyors pásztázó spektrofotometriás felvétel a világos állapotból a sötét állapotba való átváltozásról (az idő logaritmikus skálán mutatva). (forrás: Okhi, 2016.)

Az OaPAC aktiválódási és deaktiválódási folyamatait - hibán belül - egyetlen exponenciális függvény írja le (2.8. ábra E és F). Az időskálát követve egyik folyamat sem történik köztes állapotokon keresztül. Ez nem egyértelmű, hiszen például az AppA BLUF domén a fényaktiválás határozott kétfázisú kinetikáját mutatja, a gyors fázis szubmikroszekundumban, a lassú fázis pedig milliszekundumokban következik be.

2.4.2 A OaPAC fotofizikája

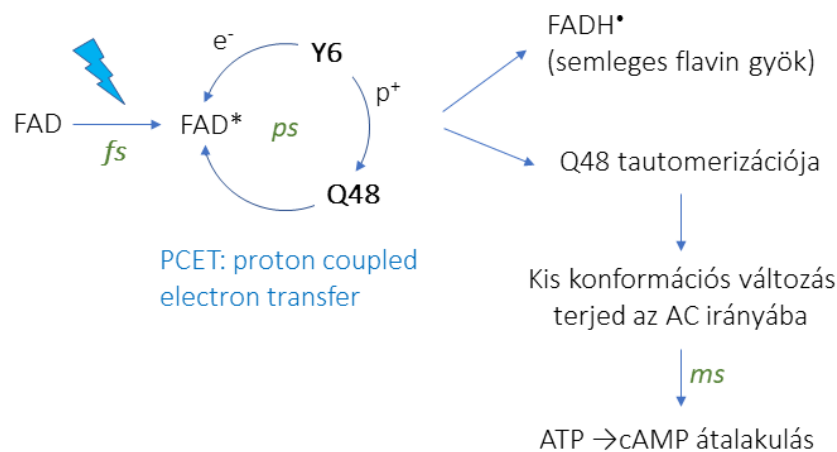
A kék fény hatására bekövetkező változások az OaPAC fehérjében az FMN izoalloxazin gyűrűje és a $\beta 3$ redőn levő közeli aminosavak közötti kölcsönhatásokon múlnak. Az OaPAC BLUF-doménjének kékfény-gerjesztése protonhoz kapcsolt elektrontranszfer-folyamatot eredményez, ahol az elsődleges elektron- és proton-donor a flavin közelében lévő tirozin (Y6)^{28,31,32}. A flavinra történő elektronátvitelt a hidrogénkötés-hálózat átrendeződése kíséri. Az indukált szerkezeti változások feltehetően az AC-domén felé terjednek, lehetővé téve az ATP cAMP-vé történő átalakulását.



2.10 ábra Az izoalloxazin gyűrű környezete az OaPAC-ben: az OaPAC fotofizikájában kiemelt szerepet játszó Y6, D67 és W90 aminosavakkal (PDB: 4yus[22]).

Az OaPAC elsődleges fotokémiáját tehát egy protonhoz kapcsolt elektrontranszfer folyamat (PCET: proton coupled electron transfer)³³ határozza meg (2.10 ábra): a kék fény fotonjának elnyelésekor egy elektron a közeli tirozinról (Y6) átkerül a flavinra - az

elektronátadási lépés után a flavin környezetétől függően anionos (FAD^-) vagy semleges (FADH^\bullet) flavin gyök keletkezik (2.11 ábra) - és ezzel egyidőben az Y6-ról egy proton a szomszédos glutaminra (Q48). Ez a proton később a flavinra kerül, stabilizálva a flavin semleges félkinon állapotát (a flavingyök félkinon formává protonálódik)[3]. A PCET-folyamat során a Q48 glutamin elfordul vagy tautomerizálódik, ami feltehetően fontos a jel továbbításában a fehérje C-terminális részéhez, ahol az $\text{ATP} \rightarrow \text{cAMP}$ átalakulás zajlik.



2.11 ábra A kék fény elnyelését követő lépések az OaPAC fehérjében, amíg az AC doménben bekövetkezik az ATP-cAMP konverzió

Az elektronátvitel szerepe a BLUF domén fehérjékben még mindig vita tárgya, mivel az AppA³⁴, BlsA²⁶ vagy BlrB^{35,36} esetében nem volt megfigyelhető, de a PixD^{37,38} és PapB³⁹ esetében kulcsfontosságúnak bizonyult.

2.4.3 A D67N mutáns

Az OaPAC BLUF doménjével jelentős homológiát mutató BLUF domént tartalmazó másik fehérjén, az Slr1694-en (más néven PixD) végzett adiabatikus kvantummechanikai/molekulamechanikai (QM) szimulációk alapján a szerzők azt vetették fel⁴⁰, hogy a negatív töltésű D69-es aszparaginsav semleges vagy pozitív töltésű aminosavra való cseréje komoly hatással lehet az elektronátviteli folyamatra. Mivel a 69-es pozícióban lévő negatív töltésű aszparaginsav semleges aszparaginra történő cseréje a PixD-ben az

előrejelzések szerint fokozza az elektronátviteli folyamatot, érdekelt bennünket, hogy az OaPAC-ban egy analóg mutációnak (a 67-es pozícióban lévő negatív töltésű aszparaginsav semleges aszparaginra való cseréjének (D67N)) milyen hatása lehet a fehérje funkcionális dinamikájára. Mivel a modellszámítások alapján úgy tűnik, hogy a H-kötések megbontása hatással van a PCET-re és az enzimatis tulajdonságokra, a D67N kiváló jelöltnek tűnik hatékonyabb optogenetikai rendszerek előállítására, annak ellenére, hogy a Y6-tól messze van a D67.

2.5 Pirofoszfát esszé

Az OaPAC vad típusában és a D67N mutánsban zajló ATP-cAMP konverzió sebességének számszerűsítésére az EnzChek® pirofoszfát esszét használtuk. Az eljárás a 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin 360 nm-en történő fényelnyelésének pirofoszfát függő emelkedésén alapszik.

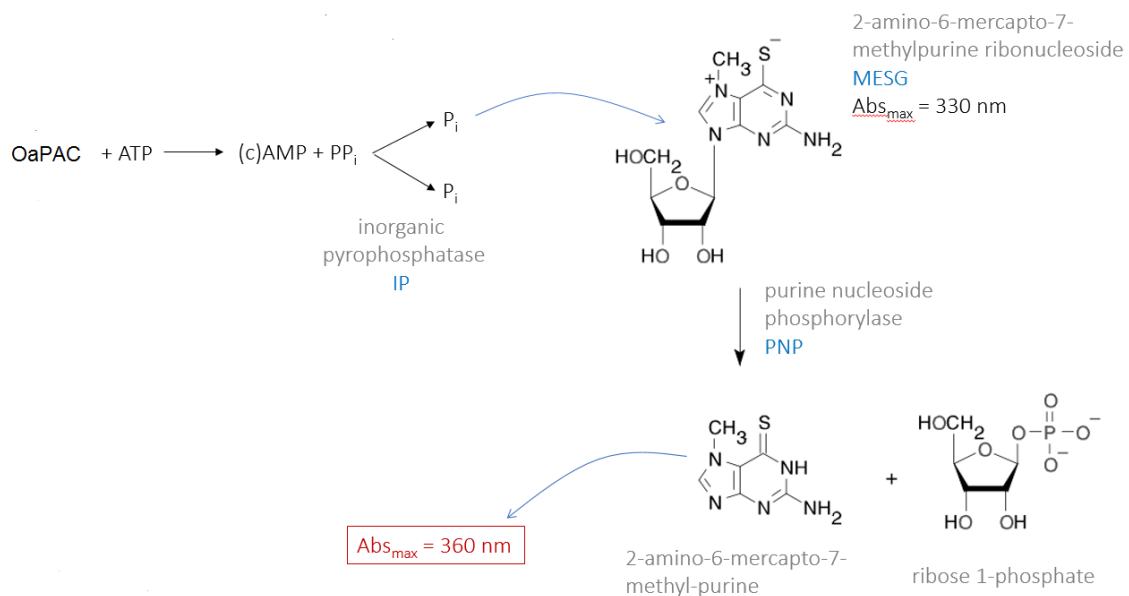
2.5.1 Pirofoszfát keletkezése ATP hidrolízis során

Pirofoszfát keletkezhet DNS, RNS polimerizáció során az új nukleotidok beépülésekor illetve adenilát-cikláz (AC) hatására. Az ATP-t kötni képes aktivált AC enzim az ATP-ből úgy szintetizál cAMP-t, hogy ciklikus foszfodiészter kötést hoz létre az ATP α -foszfát csoportja és a 3' C atom OH csoportja között. Eközben pirofoszfát (difoszfát) szabadul fel (2.5 ábra).

2.5.2 Az eljárás

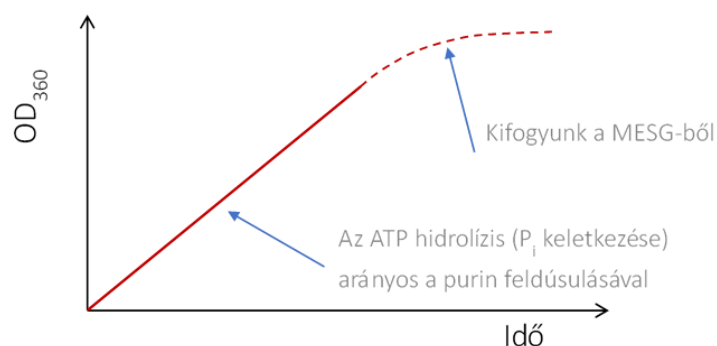
Az ATP hidrolízis során elengedett difoszfát nagyenergiájú kötése inorganikus pirofoszfát (IP) hozzáadásával, annak katalizáló hatására kettéválasztható: a konverzió eredményeként két egyforma P_i keletkezik. A mintához adott MESG (2-amino-6-merkaptó-7-methylpurine ribonucleoside) a foszfor által foszforilálódik. A MESG abszorpciós maximuma 330 nm-en van. A foszforiláció egy olyan jelzés a MESG molekulán, ami miatt a MESG-t a továbbiakban hozzáadott PNP (purine nucleoside phosphorylase) képes ribózra és purinra (2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin) bontani. A keletkezett purin molekula abszorpciós maximuma 360 nm-en van, ami jól elválik a MESG 330 nm-es csúcsától. Tehát akkor látjuk a 360 nm-es hullámhosszon való abszorpció növekedését (2.13 ábra), ha a MESG foszforilálódik, ami akkor

tud bekövetkezni, ha a pirofoszfát szervesen foszfátként van jelen, ami akkor áll rendelkezésre, ha az enzim az ATP-t hidrolizálja (2.12 ábra).

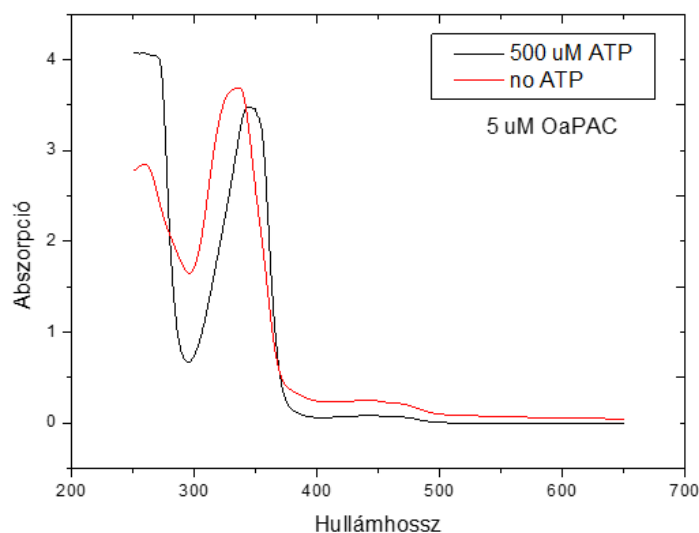


2.12 ábra: A pirofoszfát közvetett detektálása (Ábra forrása: Dr. Bódis Emőke, Referátum, PTE ÁOK Biofizikai Intézet, 2022. 12. 02.)

A 360 nm a fehérjék abszorpciós tartományától is messze van, jól különvlik a MESG 330 nm-es csúcsától, tehát tisztán detektálható az idő függvényében (2.14 ábra). A reakciósebességet a lineáris illesztéssel kapott egyenes meredekségéből ($\Delta OD/s$) úgy fejezhetjük ki mM/percben, hogy az $OD_{360} = \epsilon \cdot c \cdot x$ összefüggésből a koncentráció kiszámítható (a purin extinkciós koefficiense 360 nm-en $11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).



2.13 ábra: A feldúsuló purin látványa az idő múlásával az abszorpciós spektrumon (ábra forrása: Dr. Bódis Emőke, Referátum, PTE ÁOK Biofizikai Intézet, 2022. 12. 02.)



2.14 ábra Szervetlen foszfát jelenlétében a MESG-t a purin-nukleozid-foszforiláz 2-amino-6-merkaptó-7-metilpurinná alakítja át. Az abszorpciós csúcs vöröseltolódásával, vagyis ATP nélkül a MESG abszorpciós maximuma 330 nm, ATP jelenlétében 360 nm-re tolódik.

Számításaink során korrekcióval éltünk az ATP hidrolízisből keletkező 2 foszfát miatt (2 MESG 1 ATP bomlást jelent, tehát 2-vel kellett osztani a mM-ban kifejezett koncentrációt). Így számszerűsítve is összehasonlítható, hogy a vizsgált fehérje (az OaPAC vad típusa és a D67N mutáns sötét és világos állapotában) percenként hány mM ATP-t bont. A módszer nagy érzékenységgű: 1 nM PP_i már detektálható.

2.5.3 A pirofoszfát esszé kísérleti kivitelezése

Az 1 μ M koncentrációban kimért OaPAC vad típus és D67N mutáns ATP-áz aktivitását sötétben és folyamatos, 473 nm-es, 9 mW-os lézervény megvilágítás mellett mértük 500 μ M ATP jelenlétében. A fehérjéhez hozzámértük a reakciópuffert (20x: 10 mL 1.0 M Tris-HCl, 20 mM $MgCl_2$, pH 7.5, 2 mM Na azid), az IP-t (3 μ M/ml), 1 mM MESG-t (20 μ M), PNP-t (100 μ M/ml), 1-2 percig inkubáltuk 22°C-on, majd az ATP hozzáadásával indult a reakció. A 360 nm-en mért abszorbancia változásának meredekségéből meghatároztuk a purin bázisú molekula (2-amino-6-merkaptó-7-metilpurin) reakciósebességét (μ M/s-ban), amely pontosan megegyezik az ATP-ből származó pirofoszfát reakciósebességével.

A Michaelis-Menten-állandó meghatározásához a vizsgálatot 1 μ M vad típuson és a D67N mutánsan végeztük el 0-500 μ M ATP-koncentráció jelenlétében, kilenc különböző

koncentráció értéken, a folyamatos megvilágítás azonos feltételei (a fényforrás magassága, teljesítménye, nyalábméret, ami a mintát éri) mellett. Az így kapott sebességállandókat az ATP koncentráció függvényében ábrázoltuk. Az enzimreakció Michaelis-Menten telítési görbéjének illesztésével meghatároztuk a maximális reakciósebességet (v_{\max}) és a megfelelő K_M -et, ami a maximális reakciósebesség feléhez tartozó ATP koncentráció. A korrigált reakciósebesség számításánál figyelembe vettük, hogy egy ATP-hidrolízisből két foszfát keletkezik.

Célkitűzések

1.) A fluoreszcencia quenching kísérletekben a fehérje-kioltó interakció a fehérjemátrix és az akrilamid molekula közötti kölcsönhatás lehetséges következményeként esetleges destabilizáló, denaturáló hatása konformációváltozást eredményezhet, amely jelentősen torzíthatja a kísérletek végkifejletét, az eredmények félremagyarázásához vezethet. Az **esetleges akrilamid-fehérje kölcsönhatások torzító hatásait** vizsgáljuk meg fluoreszcencia élettartam mérések segítségével. Célunk ezen **mellékhatások azonosítása** olyan informatív és érzékeny **paraméter leírásával**, amely a fluoreszcencia élettartam-kioltási kísérletek során kinyerhető további kísérletek elvégzése nélkül.

2.) Másik kiemelt célunk az *Oscillatoria acuminata* nevű fotoszintetikus cianobaktériumból származó fotoaktivált adenil-cikláz, az **OaPAC enzimaktivitásának mutagenézissel történő növelése** volt a BLUF doménben zajló elektrontranszfer folyamat optimalizálásával. Korábbi QM-számítások alapján feltételezhető volt, hogy a flavin kromofór kötőhelyéhez közeli aminosavat érintő mutáció (egy aszparaginsav aszparaginra történő cseréje ebben a régióban) oly módon befolyásolja a rendszer fotokémiai tulajdonságait, amely hasznos lehet optogenetikai célokra. Kíváncsiak voltunk, hogyan hat a mutáció a fehérjében lezajló elektrontranszfer folyamatra és az ATP-cAMP átalakulásra. Ennek vizsgálatához célul tűztük ki az OaPAC **D67N mutánsának fotofizikai jellemzését** tranziens abszorpciós és időfüggő fluoreszcencia spektroszkópiával, amelyet enzimaktivitási mérésekkel, valamint fluoreszcencia anizotrópia és differenciális kalorimetriai módszerekkel egészítettünk ki. Célunk volt a D67N mutánsban a reakció első lépésében az elektrontranszfer jellegének és az aktív állapot élettartamának kísérleti vizsgálata, valamint az elektrontranszfer szerepének megértése az OaPAC funkciójában.

3 EREDMÉNYEK

3.1 Fehérjék destabilizációjának fluoreszcencia élettartam eloszlása kioltási (quenching) kísérletekben

3.1.1 Bevezetés

Vizsgálati objektumaink a sejt folyamatok elengedhetetlen résztvevői, a fehérjék. Többek között katalizátorként, stabilizáló, mozgató szerepben, transzportfolyamatok irányítóiként működnek. Biológiai rendeltetésük jelentősen függ közvetlen környezetüktől, az őket övező közeg fizikai és kémiai paramétereitől. A fehérjék szerkezetének, funkcióinak vizsgálata során használatos technikák alkalmazásakor fontos a környezeti tulajdonságok pontos ismerete, szükség esetén stabilan tartása oly módon, hogy lehetőleg minimális legyen a hatásuk a vizsgált mennyiségre. Tehát alapvető, hogy maga a módszer, a használt anyag, műszer ne befolyásolja a mérést.

A fluorofór fluoreszcencia-emissziójának kioltására ('quenching') eredményes módszerként tekint a szakirodalom⁴¹⁻⁴⁸ a fehérjék dinamikájának és konformációs változásainak vizsgálatában, továbbá a környezet töltésviszonyainak megismerésében a fluorofór mikrokörnyezete révén. Az akrilamid gyakran alkalmazott kioltószer ezekben a kísérletekben. A jól kidolgozott kísérleti protokollok ellenére azonban kevesebb figyelem fordult a fehérjemátrix és az akrilamid molekula közötti kölcsönhatás lehetséges következményeire. A fehérje-kioltó interakció esetleges destabilizáló, denaturáló hatása konformációváltozást eredményezhet, amely jelentősen torzíthatja a kísérletek végkifejletét, az eredmények félremagyarázásához vezethet. Az oldat környezeti paramétereinek – például a viszkozitásnak – a kioltó által kiváltott változásai is okozhatnak hibákat a mérésekben.

Az esetleges akrilamid-fehérje kölcsönhatások torzító hatásait vizsgáltuk meg fluoreszcencia élettartam mérések segítségével; célunk ezen mellékhatások azonosítása volt. Tehát egy olyan informatív és érzékeny paraméter leírása, amely kényelmesen használható abban az értelemben, hogy a fluoreszcencia élettartam-kioltási kísérletek során mindig kinyerhető legyen további kísérletek elvégzése nélkül. Így fluoreszcencia élettartam-kioltási és cirkuláris dichroizmus-kísérletek (CD) sorozatát végeztük el, hiszen ezek egyszerű és gyakran használt technikák a fehérjék konformációs változásainak vizsgálatára. Mindkét módszer érzékeny az aromás aminosavak, pl. a triptofán csoportok helyi környezetére^{49,50}. Ha a fehérje több triptofánnal rendelkezik, akkor a mért fluoreszcencia- és CD-jelek az egyes triptofán-jelek szuperpozíciójaként adódnak. Továbbá ahhoz, hogy a fehérjék denaturációjára vonatkozó

referencia adatokat kapjunk az akrilamid hatás értelmezéséhez, a fluoreszcencia élettartamokat különböző koncentrációjú guanidin-hidroklorid (GuHCl) jelenlétében is lemértük. A GuHCl hatása jól jellemezhető különböző kísérleti módszerekkel^{51,52}, amelyek konklúziója az, hogy a GuHCl még a viszonylag stabil fehérjéket is képes denaturálni. A hét, triptofán tartalmú fehérje vizsgálata során a kapott fluoreszcencia élettartam adatokból képzett Gauss-eloszlás relatív félérték-szélességének (FWHM) megváltozását tekintettük hipotézisünk szerint a legalkalmasabb paraméternek az akrilamid fehérjékre gyakorolt nemkívánatos hatásának nyomkövetésére.

Az akrilamid és a fehérjemátrix többféleképpen is kölcsönhatásba léphet egymással: a^{43,45}-beli modell szerint az akrilamid a fehérjemátrixba való diffundálással fejtheti ki hatását. Egyensúlyi dialízis mérések viszont azt bizonyították, hogy a fehérjék képesek az akrilamidot megkötni⁵³⁻⁵⁶. Az irodalomban leírt fehérjékhez történő akrilamid kötődés is azt erősíti, hogy az eredmények értelmezésénél figyelembe kell venni a kioltási folyamatok összetett voltát: az egyszerű ütközéses kioltástól eltérő mechanizmusok megjelenését.

Az oldatbeli fehérjék számos konformációs állapotot képesek felvenni⁵⁷⁻⁵⁹. A vizsgált fehérjék konformációs heterogenitásának jellemzésére fluoreszcencia élettartam eloszlásokat használtunk a korábban leírtak szerint^{60,61}. A folytonos élettartam-eloszlást feltételező analízis során kapott paraméterek és a fehérjék tulajdonságai közötti összefüggés elméleti alapját a *landscape* modell adja, amelyet először Frauenfelder és munkatársai javasoltak⁵⁸. Kimutatták, hogy a fluoreszcencia élettartam-eloszlások félérték-szélessége (FWHM) összefügg a fehérje-alállapotok eloszlásával és az alállapotok között zajló egymásba való átalakulás dinamikájával⁶⁰⁻⁶⁴. Ezen eloszlások szélessége a fluorofór populáció heterogenitását méri, azaz a különböző fluoreszcencia-élettartamokkal jellemezhető több alállapot jelenlétét mutatja. Mivel azonban még egyetlen triptofán aminosav is rendelkezik élettartam-eloszlásokkal, a fluoreszcencia-paraméterek értelmezéséhez magának a fluorofórnak az alapvető jellemzőit is figyelembe kell venni.

3.1.2. Anyagok és módszerek

3.1.2.1 Vegyszerek

A vizsgált fehérjék mindegyike triptofán tartalmú: HSA, BSA, lizozim, hexokináz, RnázT₁, foszforiláz b, aktin. A használt anyagok közül a HSA, BSA, lizozim (csirke tojásfehérjéből), hexokináz (III. típus, Baker Yeast), foszforiláz b (nyúl izomból), glikogén (III.

típus, nyúl májából), tris-(hidroxi-metil)amino-metán (Tris), akrilamid, l-tripthofán a SIGMA Chem. Co. –tól (St. Louis, MO), az RNase T1 a Thermo Scientific-től származik. Az adenzin-5'-trifoszfátot (ATP) és a β -merkaptoetanolt (MEA) a MERCK-től (Darmstadt, Németország), a nátrium-azidot (NaN_3) pedig a FLUKA-tól (Svájc) szereztük be.

3.1.2.2 A fehérjék előkészítése

A SIGMA Chem. Co. és a Thermo Scientific cégektől vásárolt fehérjét további tisztítás nélkül használtuk fel. A fluoreszcenciakísérletek előtt a liofilizált HSA-t, BSA-t, lizozimet, RNáz T1-et, foszforiláz b-t és hexokinázt 4 mM TRIS-t pufferben, pH 7,4-ben oldottuk fel. Az aktint Spudich és Watt [34] protokollja szerint tisztítottuk, és 4 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MEA és 0,005% NaN_3 (puffer A) oldatban tároltuk. A glikogént mint referenciafehérjét közvetlenül a felhasználás előtt desztillált vízben oldottuk fel, hogy kihasználjuk triptofán-mentes jellegét a triptofán fluoreszcencia-élettartam mérésekben. A fehérjék koncentrációja 25-30 μM volt a mintákban.

3.1.2.3 Fluoreszcencia-élettartam mérések

A fluoreszcencia-élettartamokat 20 °C-on mértük az akrilamid- vagy guanidin-hidroklorid-koncentráció függvényében. A méréseket egy Horiba Jobin-Yvon Nanolog FL3-2Ihr spektrofluorométeren végeztük, amely TCSPC (time correlated single photon counting) üzemmódban működött R928P Hamamatsu típusú fotoelektron-sokszorozóval. A detektor feszültségét 950 V-ra állítottuk be. A fehérjeminta gerjesztéséhez 295 nm-es csúcshullámhosszúságú impulzus-LED-et (NanoLED 295, Horiba Jobin-Yvon) használtunk, amely ~ 1 ns hosszú impulzusokat generált. A gerjesztés ismétlési frekvenciája 1 MHz volt. A triptofán gerjesztését követően 340 nm-en, 10 nm-es résszélesség mellett detektáltuk a fluoreszcencia emissziót. A műszer válaszfüggvényének (instrument response function; IRF) félértékszélessége ~ 1 ns volt, amelyet frissen készített glikogénoldat felhasználásával mértünk. Ez a dekonvolúciós művelet elvégzéséhez kellett. A lecsengési görbék pontjai 4096 darab 55 ps-os szélességű csatornába akkumulálódtak sokcsatornás analizátorokban. A méréseket akkor fejeztük be, amikor a csúcscsatornában 10 000 beütést gyűjtöttünk. A küvettatartó hőmérsékletét Thermo Scientific AC200-A25 fürdő keringtető rendszerrel szabályoztuk. A kvarcküvetták mérete 10 mm x 3 mm.

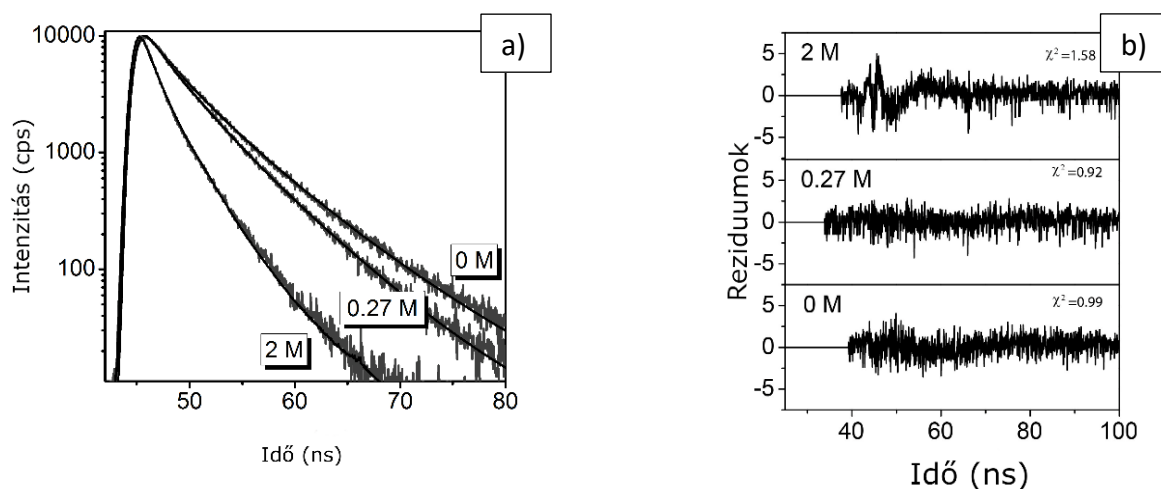
3.1.2.4 Az adatok elemzése

A nyers adatok elemzését a FluoFit (PicoQuant) elemző szoftverrel végeztük, amely a Levenberg-Marquardt algoritmuson alapuló nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével számol. A fluoreszcencia-élettartam mérések adatait folytonos (Gauss-féle) élettartam-eloszlásokkal illesztettük (3.1 ábra). A triptofánok élettartamának (ρ_G) Gauss-eloszlását az intenzitás (I) lecsengési görbéiből a következő egyenlet szerint írhatjuk fel:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \int_{-\infty}^{\infty} \rho_G(\tau) e^{-\frac{t-t'}{\tau}} d\tau dt' \quad (29)$$

$$\rho_G(\tau) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\sigma_i(2\pi)^{0,5}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\tau-\tau_i}{\rho_i}\right)^2}; \quad \sigma_i = \frac{FWHM_i}{(8 \ln 2)^{0,5}} \quad (30)$$

ahol τ_i és A_i az i -edik eloszlású komponens élettartama és amplitúdója, $FWHM_i$ eloszlásszélességgel. σ_i az i -edik komponens Gauss-értékének szórását jelenti. Az illesztést úgy kaptuk, hogy minden esetben egyetlen élettartam-komponenst feltételeztünk.



3.1 ábra. A hexokináz triptofán emissziójának vizsgálata 0, 0,27 és 2,0 M akrilamid jelenlétében 20 °C-on.

A) A fluoreszcencia-lecsengési idők eloszlásai. A kísérleti adatokhoz illesztett Gauss-függvény 3,31 ns, 2,95 ns és

1,31 ns fluoreszcencia-élettartamot adott, 6,76 ns, 3,03 ns és 3,86 ns FWHM értékekkel.

B) A Gauss-illesztések súlyozott reziduumaik különböző akrilamid koncentrációk esetén.

Az illesztés jóságát a redukált χ^2 értékéből határoztuk meg⁶⁵. A félértékszélesség (FWHM) $2,345\sigma$, ami a fehérje konformációk (részállapotok) eloszlását tükrözheti⁵⁷⁻⁵⁹.

3.1.2.5 Fluoreszcencia kioltási kísérletek

A kioltási kísérletek során hét különböző fehérje triptofánjának fluoreszcencia-élettartamát mértük akrilamid (a fehérjemintákhoz való) titrálásával, a koncentráció 0 M-ről 2 M-ra történő növelésével.

3.1.2.6 Kísérletek guanidin-hidrokloriddal

A guanidin-hidroklorid (GuHCl) hatását a fluoreszcencia paramétereinek mérésével vizsgáltuk 0-7 M koncentrációjú GuHCl jelenlétében. A denaturáló vegyszert a megfelelő koncentrációban, kristályos formában adtuk a fehérjeoldathoz a kívánt végkoncentráció beállításához. A fehérjeoldatot a GuHCl-lal együtt egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, mielőtt a fluoreszcencia élettartam és CD spektroszkópai kísérleteket elvégeztük. A nanoszekundumban megadott FWHM értéket minden GuHCl-koncentrációnál meghatároztuk.

3.1.2.7 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópai mérések

A lizozim cirkuláris dichroizmus méréseit Májer Zsuzsa (ELTE, Kémiai Intézet) végezte el Jasco J-810 spektropolariméterrel (Jasco Ltd., Tokió, Japán). A CD-spektrumokat a 250-350 nm-es tartományban vette fel szobahőmérsékleten 0,1 M Na-foszfátban 0,2 mm-es úthosszú kvarc cellával. A következő paramétereket alkalmazta: 1 nm-es spektrális sáv szélesség, 8 s-os válaszidő, 0,1 nm-es adattávolság, 20 nm/perces pásztázási sebesség. Minden spektrumot alapvonallal korrigáltunk. A fehérjekoncentráció körülbelül 8 mg/ml volt. A CD-sávok intenzitását moláris ellipticitásban ([Q]MR, fok cm²/mol) fejeztük ki.

3.1.3 Következtetések

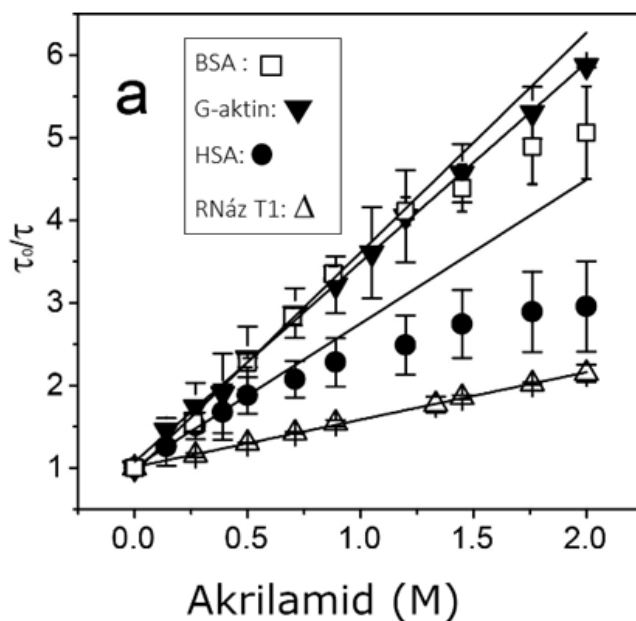
3.1.3.1 Fluoreszcencia kioltási kísérletek

A fehérjék dinamikájának és konformációs változásainak vizsgálatánál jól bevált fluoreszcencia kioltás módszeréhez használt anyagok (pl. akrilamid) egyik fontos, a kioltástól eltérő hatása a fehérjék denaturációja lehet. Mivel általában a fehérjék denaturálódását a

kísérletekben nem észlelik, így hatását – jóllehet a nyers adatokban szerepel – nem veszik figyelembe a kísérletek értelmezésénél sem. Bár az akrilamiddal történő triptofán fluoreszcencia kioltási adatok elemzésének előfeltétele, hogy ez a kicsi és semleges kioltó molekula ne legyen hatással a fehérjék konformációjára vagy dinamikájára, korábban kimutatták, hogy az akrilamid fehérjékhez való kötődése konformációs változásokat idézhet elő. Ezért fontos az akrilamidnak a vizsgált fehérjékre gyakorolt ezen hatásainak azonosítása, leírása és figyelembevétele.

Az akrilamidnak a fehérjék stabilitására és/vagy konformációjára gyakorolt hatásának jellemzésére fluoreszcencia élettartam és CD spektroszkópiai méréseket végeztünk. A fluoreszcencia élettartamokat az időkorrelált egyfotonszámlálás módszerével határoztuk meg, és az elemzést egyszeres Gauss-élettartam-eloszlásokat feltételezve végeztük (3.1a. ábra, 3.1b. ábra). Az akrilamid koncentrációja ezekben a kísérletekben 0 és 2 M között volt. Mivel célunk az akrilamid lehetséges hatásainak megnevezése, kiterjesztése és kihangsúlyozása volt, a felső határértéket a kioltási kísérletekben általában használnál magasabb koncentrációra állítottuk be.

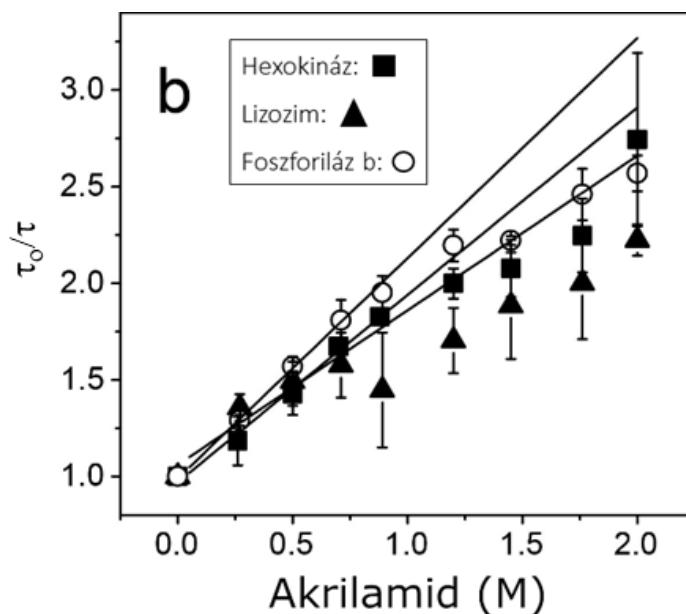
A fluoreszcenciamérések során vizsgált hét fehérje [RNáz T1, HSA, BSA, G-aktin (monomer aktin), lizozim, foszforiláz b és hexokináz] nagy változatosságot mutat méretét, másodlagos és harmadlagos szerkezetét, valamint a triptofánok számát és elhelyezkedését tekintve. Az eredmények elemzéséhez készített klasszikus Stern-Volmer grafikonokon (3.2 a. és b. ábra) nagyobb akrilamid-koncentrációknál a legtöbb vizsgált fehérje esetében nemlineáris tendenciák jelentek meg. Az értelmezés során kizártuk a statikus kioltási mechanizmusok hatását, mivel olyan fluoreszcencia-élettartamokat mértünk, amelyek nem érzékenyek ezekre a statikus kioltási folyamatokra. Az aktin és az RNáz T1 kivételével minden fehérje Stern-Volmer-diagramja lefelé görbült (3.2 a. ábra, 3.2 b. ábra). Ez a nem lineáris tendencia a fehérjék belső változásával állt összefüggésben, és jól magyarázható a vizsgált fehérje részleges vagy teljes denaturációjával. Ezt a lehetőséget tovább vizsgáltuk a felhalmozott fluoreszcencia-élettartam adatok inherens tulajdonságainak felhasználásával. Az aktin és az RNáz T1 esetében a Stern-Volmer-görbék lineárisak voltak, ami arra utal, hogy ezen fehérjék integritását az akrilamid nem befolyásolta lényegesen.



3.2 ábra. Stern-Volmer-diagramok az időfelbontású fluoreszcencia-kioltási kísérletek eredményeként

Az illesztéseket a grafikonok kezdeti lineáris részein végeztük el.

- a) BSA, G-aktin, HSA és RNáz T1. A számított K_{SV} értékek: $2,66 \pm 0,07 \text{ M}^{-1}$ (BSA), $2,42 \pm 0,03 \text{ M}^{-1}$ (G-aktin), $1,74 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$ (HSA) és $0,57 \pm 0,06 \text{ M}^{-1}$ (RNáz T1)



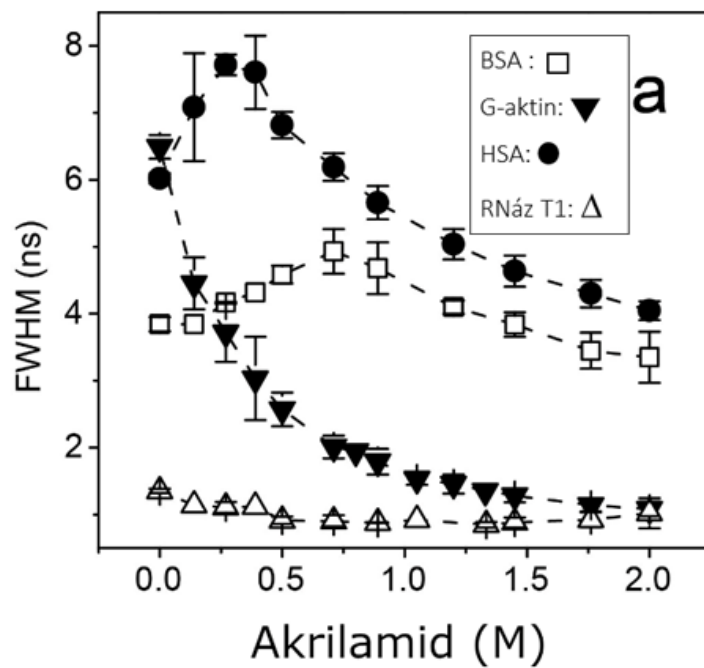
- b) Hexokináz, lizozim és foszforiláz b. A számított K_{SV} értékek: $0,97 \pm 0,05 \text{ M}^{-1}$ (hexokináz), $0,8 \pm 0,16 \text{ M}^{-1}$ (lizozim) és $1,14 \pm 0,02 \text{ M}^{-1}$ (foszforiláz b).

3.1.3.2 A triptofán fluoreszcencia élettartam-eloszlásainak elemzése

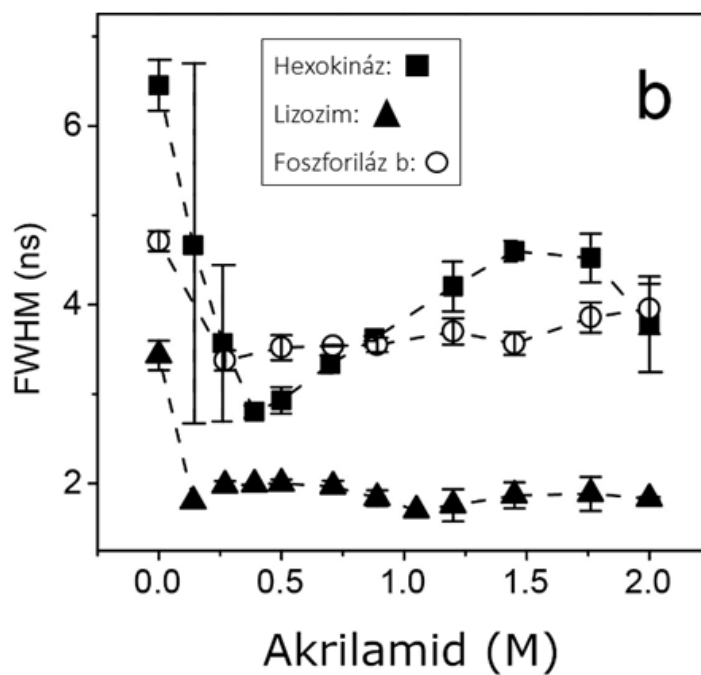
Annak érdekében, hogy további betekintést nyerjünk abba a mechanizmusba, amellyel az akrilamid a fehérjékre hat, a kioltási kísérletek során gyűjtött triptofán fluoreszcencia élettartam adatokat az élettartam-eloszlások félérték-szélesség (FWHM) értékeinek felhasználásával is elemeztük. Ez a paraméter alkalmas a fluorofór mikrokörnyezetében bekövetkező fizikai-kémiai változások követésére⁶⁰⁻⁶². Két fontos hatás van, amelyet általában kritikusnak tartanak a fluoreszcencia-élettartamok eloszlásszélességének szabályozásában. Mind a „benépesített” (sűrűn betöltött) részállapotok számának változása, mind a részállapotok között lévő átmenetek változása módosíthatja az eloszlás szélességének értékét. Ezért általában véve ezen adatok elemzése és értelmezése során figyelembe kell venni a két folyamat lehetséges tendenciáit. A Stern-Volmer-diagramok tendenciáit összehasonlítottuk a triptofán élettartam-eloszlások félérték-szélesség értékeivel további lehetséges összefüggések felismerése érdekében.

Az triptofán fluoreszcencia élettartam-adatokat folytonos – Gauss – élettartam-eloszlásokat feltételezve elemeztük, mivel a Gauss-függvény félérték-szélessége (FWHM) praktikus eszköznek bizonyult az oldatban lévő fehérjepopulációk heterogenitásának feltérképezésére.⁶⁰⁻⁶² Az illesztés jósága egyik ilyen esetben sem volt rosszabb a Gauss-eloszlásoknál, mint a diszkrét eloszlások alkalmazásakor.

Az RNáz T1 és az aktin esetében az FWHM értékében (3.3 a. ábra) 1 M felett csak nagyon kis akrilamidfüggő változások voltak, ami korrelál azzal a megfigyeléssel, hogy a megfelelő Stern-Volmer-diagramon (3.2 a. ábra) nem volt eltérés a linearitástól. Az összes többi fehérje esetében az FWHM érték jelentősen megváltozott megemelt akrilamid-koncentráció esetén (3.3 a, b ábra). A HSA és a BSA esetében az FWHM értéke alacsonyabb akrilamid-koncentrációnál nőtt, és magasabb (0,5, illetve 1 M feletti) akrilamid-koncentrációnál csökkent (3.3 a ábra). Alacsonyabb akrilamid-koncentrációknál az aktin, a hexokináz, a foszforiláz b és a lizozim esetében éles csökkenés volt megfigyelhető (3.3 a. és b. ábra), amelyet a hexokináz esetében további növekvő és csökkenő, a foszforiláz b és a lizozim esetében pedig kvázi állandó tendenciák követtek (3.3 b. ábra).



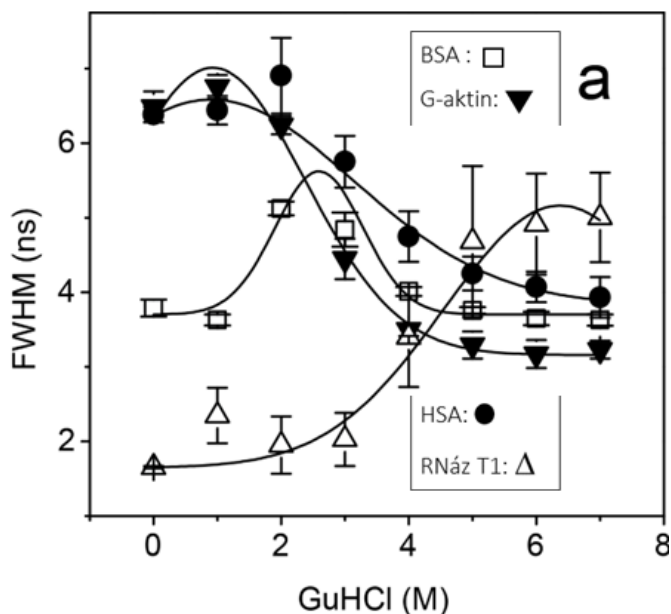
3.3 a. ábra. A triptofán fluoreszcencia-élettartam eloszlások félérték-szélesség (FWHM) értékei az akrilamid-koncentráció függvényében BSA, G-aktin, HSA és RNáz T1 esetében.



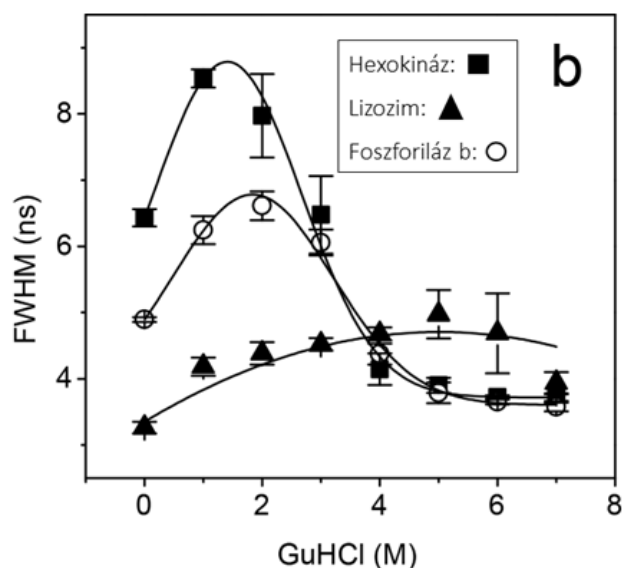
3.3 b. ábra. A triptofán fluoreszcencia-élettartam eloszlások FWHM értékei az akrilamid-koncentráció függvényében a hexokináz, a lizozim és a foszforiláz b esetében.

3.1.3.3 A GuHCl denaturáló hatása

A guanidin-hidroklorid (GuHCl) nagy koncentrációban ismert módon denaturálja a fehérjéket. Megvizsgáltuk, hogy a hét fehérje triptofán fluoreszcencia lecsengési időfüggvényének félértékszélessége (FWHM) érzékeny-e a denaturálásra. A triptofán fluoreszcencia élettartamát mértük ugyanezen fehérjék esetében a GuHCl koncentráció függvényében a 0-7 M tartományban. A GuHCl-t nagyobb koncentrációban (0-7M) alkalmaztuk, mint az akrilamidot (0-2 M), mivel a fehérjékre gyakorolt hatásuk eltérő jellegű. Az FWHM értékeket a GuHCl koncentráció függvényében ábrázoltuk (4a, b ábrák). E grafikonok alapján mind a hét fehérje FWHM értékei kiszélesedtek alacsony GuHCl-koncentráció esetén. Ez a kiszélesedés különböző GuHCl-koncentrációknál kezdődött. Magas GuHCl-koncentrációnál (az érték a fehérje kiválasztásától is függött) az FWHM érték csökkent, és a grafikonok összességében Gauss-eloszlásokra hasonlítottak. Ezen eloszlások maximuma viszonylag magas GuHCl-koncentrációknál jelent meg a lizozim (5-6 M) és az RNáz T1 (6-7 M) esetében, ami azt jelzi, hogy a hét vizsgált fehérje közül ez a két fehérje a legstabilabb a GuHCl indukálta denaturációval szemben.



3.4 a. ábra. A triptofán fluoreszcencia-élettartam eloszlás FWHM értékei a GuHCl-koncentráció függvényében G-aktin, BSA, HSA és RNáz T1 esetén. Az adatokat Gauss-függvénnyel illesztettük és folytonos vonalakkal jelöltük.



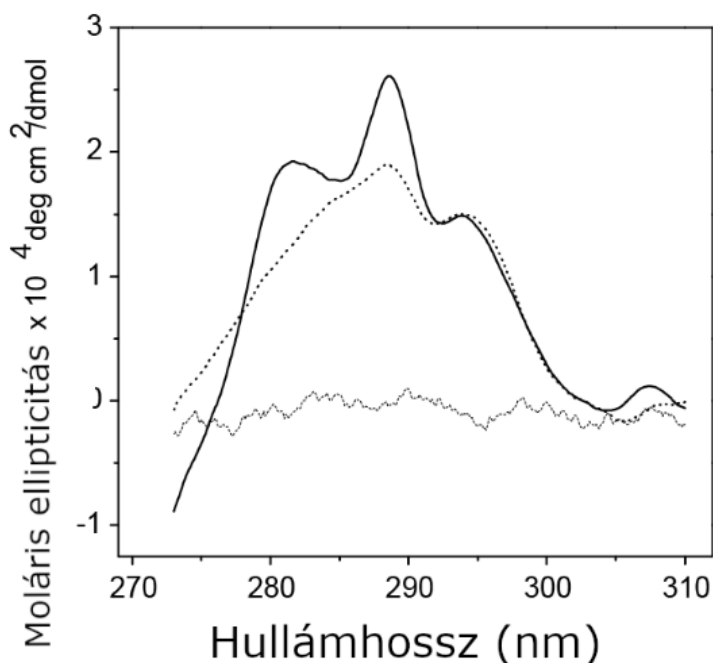
3.4 b. ábra. A triptofán fluoreszcencia-élettartamok FWHM-je a GuHCl-koncentráció függvényében a hexokináz (kitöltött négyzet), a liozím (kitöltött felfelé mutató háromszög) és a foszforiláz b (üres kör) esetében. A Gauss-illesztéseket folytonos vonalakkal jelöltük.

Érdekes, hogy hasonló megközelítést alkalmaztak Laptinok és munkatársai⁶⁵ az apoflavodoxin esetében, ahol a szerzők fluoreszcencia-anizotrópia lecsengés méréseket végeztek különböző GuHCl-koncentrációk mellett. Biexponenciális anizotrópia bomlást feltételezve ($\beta_1 e^{-\frac{t}{\Phi_1}} + \beta_2 e^{-\frac{t}{\Phi_2}}$) a szerzők megfigyelték, hogy a GuHCl koncentráció növelésével a preexponenciális együtthatók hányadosa (β_1/β_2 arány) is nőtt, és 2,5 M körüli koncentrációnál érte el a csúcspontját. A preexponenciális együtthatók hányadosa hasonló GuHCl függést követ, mint amit mi a triptofán fluoreszcencia élettartam eloszlások FWHM értékének tanulmányozásával megfigyeltünk (3.3 a. ábra, 3.3 b. ábra, 3.4 a. ábra, 3.4 b. ábra).

A fenti megfontolásokat figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy a triptofán fluoreszcencia élettartam-eloszlások félérték-szélesség paramétere érzékeny a vizsgált fehérjék konformációs heterogenitásának módosulására. E paraméter akrilamid- és GuHCl-koncentrációtól való függése az egyes fehérjék esetében eltérő volt. Az eredmények arra is utaltak, hogy az ilyen kísérleti adatok értelmezése viszonylag összetett megközelítéseket igényel. Következtetésünk csak olyan fluorofórok esetén igaz, amelyek élettartama valóban változik a fehérjekörnyezet szerkezetétől függően. Ha a triptofán nem volna erre érzékeny, nem lenne alkalmas paraméter a denaturáció nyomonkövetésének vizsgálatára.

3.1.3.4 CD-spektroszkópiai kísérletek

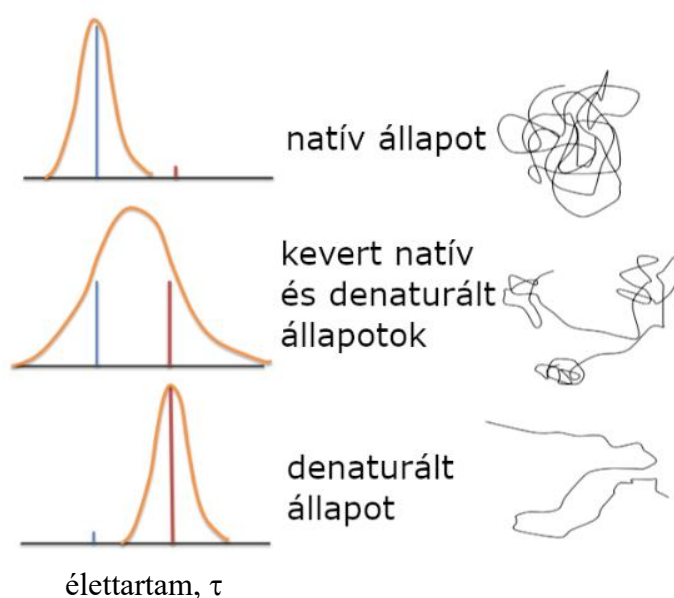
Az akrilamid denaturáló hatásának közvetlen bizonyítására CD-spektrumokat is felvettünk kioltó jelenlétében. A CD-spektroszkópia érzékeny a fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetének változásaira. A kontrollkísérleteknél a lizozim CD-spektrumát mértük 7 M GuHCl jelenlétében, illetve anélkül (3.5 ábra). Ez a két spektrum vázolta a fehérje szélsőséges stabilitási állapotait és megmutatta, hogy a fehérje jól strukturált spektrumai (sötét, folytonos vonal) eltűntek (halvány, zajos vonal) a denaturáló szer jelenlétében. Ezután a kísérleteket 2 M akrilamiddal ismételtük meg (szaggatott vonal). Az akrilamid jelenlétében megfigyelt CD-spektrum kevésbé volt strukturált – kisebbek az intenzitások a $\lambda \sim 285$ nm és a $\lambda \sim 290$ nm-nél, mint az említett vegyszerek (azaz az akrilamid vagy a GuHCl) hiányában. Az adatok azt mutatták, hogy az akrilamid valóban képes volt a fehérjemátrix részleges denaturálására, bár hatása sokkal kisebb volt, mint a GuHCl-é. Ez a megfigyelés összhangban volt a fluoreszcencia kioltási kísérletekből származó eredményeinkkel.



3.5 ábra. A lizozim (fekete vonal), a 2 M akrilamiddal inkubált lizozim (szaggatott vonal) és a 7 M GuHCl-lal inkubált lizozim (halvány, zajos vonal) CD-mérései láthatók. A lizozim CD-spektrumának csúcsai 293,9 nm, 288,6 nm, 281,4 nm és 274 nm. Az akrilamiddal inkubált lizozim esetében a csúcsok 294 nm, 287,2 nm, 280 nm, 267,6 nm. A GuHCl-lel inkubált lizozim esetében a csúcsok eltűntek.

3.1.3.5 Az adatok értelmezéséhez javasolt modell

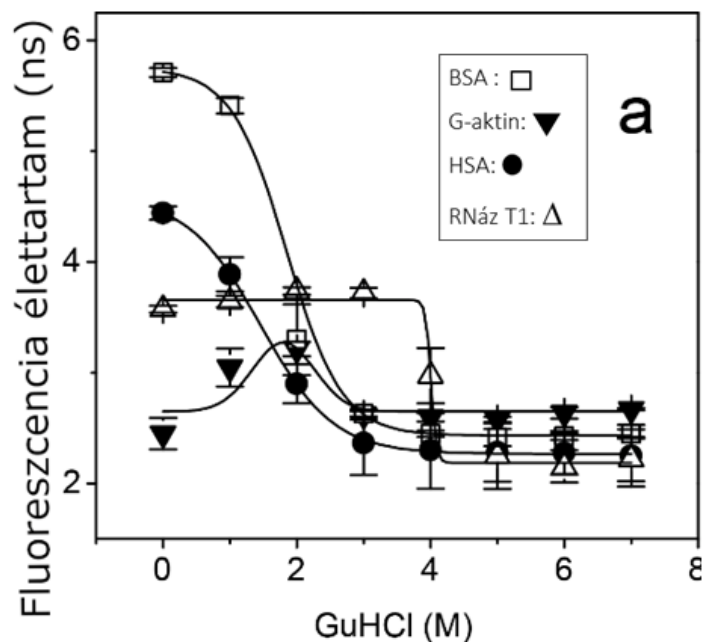
Az FWHM esetében megfigyelt különböző tendenciák megértéséhez egy egyszerű modell szolgálhat magyarázatként. Ebben azt feltételezzük, hogy egy fehérje teljesen natív vagy teljesen kitekert állapota alacsony számú konformációs állapottal rendelkezik, amit szűk konformációs eloszlások tükröznek (3.6 ábra).



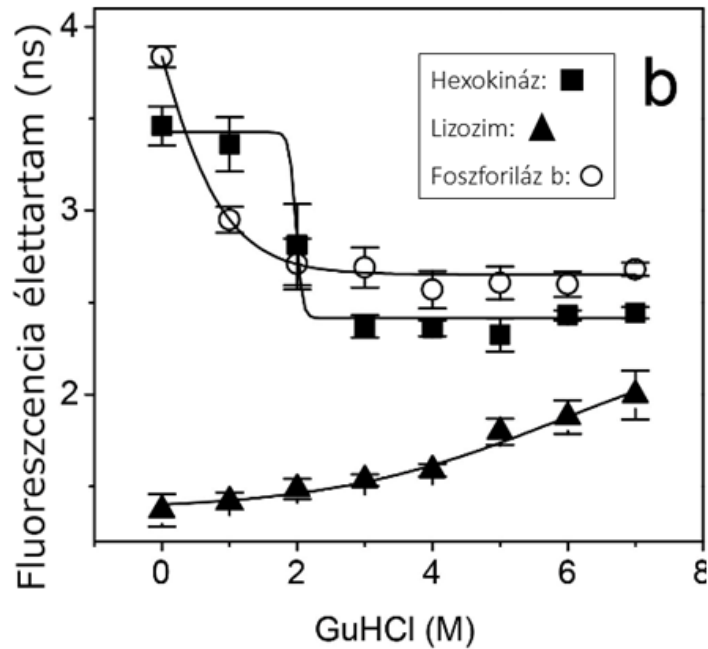
3.6 ábra. A vizsgált fluorofór a fehérje natív és denaturált állapotában eltérő fluoreszcencia-élettartammal rendelkezik. A „Half Denaturation Lifetime Distribution Broadening Model” a vizsgált fehérjék tercier szerkezetének különböző állapotához tartozó fluorofór jellegzetes élettartam-eloszlásait ábrázolja.

A natív és a denaturált konformációk bármilyen körülmények között egymás mellett léteznek. A denaturáló szer alacsony koncentrációjánál a natív, magas koncentrációknál a denaturált állapot dominál az eloszlásban. Közepes koncentrációknál mindkét fehérjeállapot hasonló koncentrációban van jelen, és ezen részpopulációk keveredése határozza meg a teljes populációra vonatkozó félértékszélességet. Feltéve, hogy a vizsgált fluorofór a fehérje natív és denaturált állapotában eltérő fluoreszcencia-élettartammal rendelkezik, a kísérleti adatok e populációk eloszlásának változásait tükrözik. Az élettartamértékek esetében a natív fehérjére jellemző értéktől a denaturált fehérjének megfelelő érték felé való elmozdulást várnánk, ezért ábrázoltuk az élettartamokat a GuHCl koncentráció függvényében a 3.7 a. és 3.7 b. ábrán.

Megjegyzendő, hogy az akrilamid adatainak hasonló ábrázolása nagyon bonyolult lenne a közvetlen kioltó hatása miatt. Bár az átmenet jellege a fehérjék esetében eltérő volt (3.7 a. ábra, 3.7 b. ábra), az átmenet megjelenésére vonatkozó elvárás az aktin kivételével minden fehérje esetében teljesült. A másik hat fehérjénél az élettartam-átmenet a magasabb értékről az alacsonyabb érték felé történt, ami azt jelzi, hogy a denaturáció csökkentette a triptofán fluoreszcencia élettartamát, valószínűleg a környező oldószerből származó kioltó folyamatok megjelenése miatt. Az aktin szokatlan esetnek bizonyult, mivel a triptofán fluoreszcencia-élettartam 2 M GuHCl-ig nőtt, nagyobb koncentrációban pedig csökkent. A kezdeti növekedésre nehéz megfelelő magyarázatot találni. Azonban hasonló perturbációs kísérletekben, amikor a hőmérsékletet növelték, az aktin már korábban is mutatott időleges konformációs átmeneteket. Amikor kalcium-kötött aktint vizsgáltak, 25 °C körül jelentős konformációváltozás jelentkezett³⁹, ami azt jelzi, hogy a konformációs átmenetek összetettek és nem viselkednek monoton módon ebben a fehérjében. A mi megfigyelésünk is az aktin ezen speciális jellegét tükrözi.



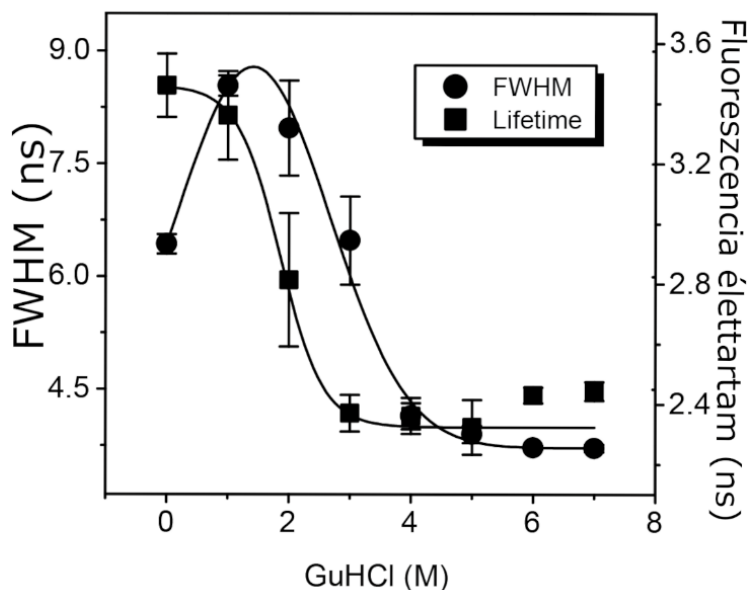
3.7 a. ábra. A fluoreszcencia élettartam a GuHCl-koncentráció függvényében G-aktin, BSA, HSA és RNáz T1 esetén. Az adatokat szigmoidális függvényekkel illesztettük (kivéve a G-aktin esetében, amelyet Gauss-függvénnyel illesztettünk).



3.7 b. ábra. A fluoreszcencia-élettartam a GuHCl-koncentráció függvényében a hexokináz, a lizozim és a foszforiláz b esetében. Az adatokat szigmoid függvénnyel illesztettük.

Az FWHM vizsgálata ezekben az esetekben az élettartamoknál figyelembe vettől eltérő szempontot és tendenciát mutat. Ha a fehérje natív vagy denaturált formája dominál, akkor az élettartamok viszonylag keskeny eloszlását várjuk, amelyek a megfelelő élettartam-értékekre központosulnak (3.6 ábra). Ez csak olyan fluorofórok esetén igaz, amelyek élettartama valóban változik a fehérjekörnyezet szerkezetétől függően. Ha a triptofán nem volna erre érzékeny, nem lenne alkalmas paraméter a denaturáció nyomonkövetésének vizsgálatára.

Ha mind a natív, mind a denaturált részállapotok jelentős populációban vannak jelen, azaz relatív járulékok összehasonlítható, a két különböző élettartam megnyújtja a teljes élettartam-eloszlást, ami nagyobb FWHM-értékeket eredményez (3.6 ábra, középső panel). Ezekben az esetekben a fizikailag igazolható fluoreszcencia élettartamok megfelelő leírására irányuló elemzések az alkalmazott illesztési függvény egynél több komponensét foglalják magukban. A mi esetünkben azonban a legfontosabb információ a tényleges kiszélesedés, ezért ekkor egy Gauss-eloszlással végzett elemzés a megfelelő választás. A GuHCl okozta változások a triptofán fluoreszcencia élettartam- és FWHM-értékekben, a fent említett összefüggés szerint a hexokináz példáján láthatók a 3.8. ábrán.



3.8 ábra. A hexokinázra kapott fluoreszcencia-élettartamok (jobb tengely) és FWHM-értékek (bal tengely). Az élettartamokhoz való szigmoidális illesztés 1,86 M-t adott az inflexiós pontnak, és a Gauss-illesztés maximuma az FWHM-értékek esetében 1,41 M GuHCl-nél volt.

A hexokináz esetén kapott triptofán élettartam 3,31 ns-ről a denaturáció függvényében 2,4 ns-ra csökkent, ami az irodalmi adatokkal korrelál (1-6 ns közé esik a triptofán). Az FWHM ns-ban megadott értéke 6,76 ns-ről 2,97 ns-ra csökkent.

Ezeket a megfontolásokat figyelembe véve közvetlen kapcsolat áll fenn az akrilamid, illetve GuHCl által indukált denaturáció és az egy-Gauss komponensek illesztéséből kapott FWHM értékek között. Amikor a fehérje egy szűk konformációs tartományban található – vagy a natív vagy a teljesen denaturált részállapot dominál, – az FWHM viszonylag kicsi, míg az ezen állapotok közötti átmenet koncentrációtartományában kiszélesedik. Ez az egyszerű modell megmagyarázza, hogy a fehérjékben vizsgált bizonyos fluorofórok fluoreszcencia élettartamából nyert FWHM érték hogyan működhet érzékeny szondaként a denaturáció folyamatának követésére.

A fehérjék szerkezetének és dinamikájának különbözősége miatt a külső denaturálószerrel szembeni ellenállásuk eltérő. Ezért az akrilamid vagy GuHCl koncentrációi, amelyeknél a fehérjék denaturálódásának hatása megjelenik a grafikonokon, szintén eltérőek, és az adatok értelmezése minden egyes esetben speciális megfontolásokat igényel. A kísérletekben a várható FWHM tendenciákat leíró elméleti Gauss-görbéknek csak

egy részét tekintjük, ugyanis nem minden esetben látszik a teljes natív-denaturált szerkezeti átmenet, vagyis a teljes Gauss-görbe. Van, hogy a Gauss-görbének csak egy része (a felfutó, vagy a leszálló ága) látható, hiszen minden egyes fehérje “egyedi eset”, a denaturálószerrel szembeni ellenállása széles tartományon változhat. Ennek megfelelően az ebben a munkában vizsgált egyes fehérjék beleillenek az általános sémába, de az alkalmazott akrilamid- vagy GuHCl-koncentrációk által meghatározott virtuális ablak és a fehérjék eltérő jellege miatt a Gauss-nak különböző részeit fedik le. Bonyolultabb esetekben a fluoreszcenciaadatok megfelelő megértéséhez szükség lehet kiegészítő módszerek - mint itt a CD-spektroszkópia - alkalmazására is a mögöttes molekuláris kölcsönhatások leírására.

3.1.4. Konklúzió

Célunk az volt, hogy egy viszonylag könnyen használható eszközt biztosítsunk az akrilamid nemkívánatos hatásainak azonosítására fluoreszcencia kioltási kísérletekben. Megmértük a triptofán fluoreszcencia élettartam-eloszlások FWHM értékének akrilamid- és GuHCl-koncentráció-függését és korreláltuk a kapott Stern-Volmer-diagramokkal. Az akrilamidhatás és a denaturáció közötti közvetlen viszonyt is igazoltuk CD-spektroszkópia segítségével. Megállapítottuk, hogy az akrilamid megzavarta a vizsgált fehérjék konformációs állapotait. A kísérleti adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az FWHM érték meghatározása és elemzése - amely az összegyűjtött kísérleti kioltási adatokból nyerhető - hatékony analitikai eszköz az akrilamid nemkívánatos hatásainak azonosításához és leírásához a kioltási kísérletekben. Elemzésünk azért fontos, mert a nemkívánatos hatások a kioltási eredmények félreértelmezéséhez vezethetnek.

3.2 Az elektron transzfer szerepe az OaPAC funkcionális dinamikájában

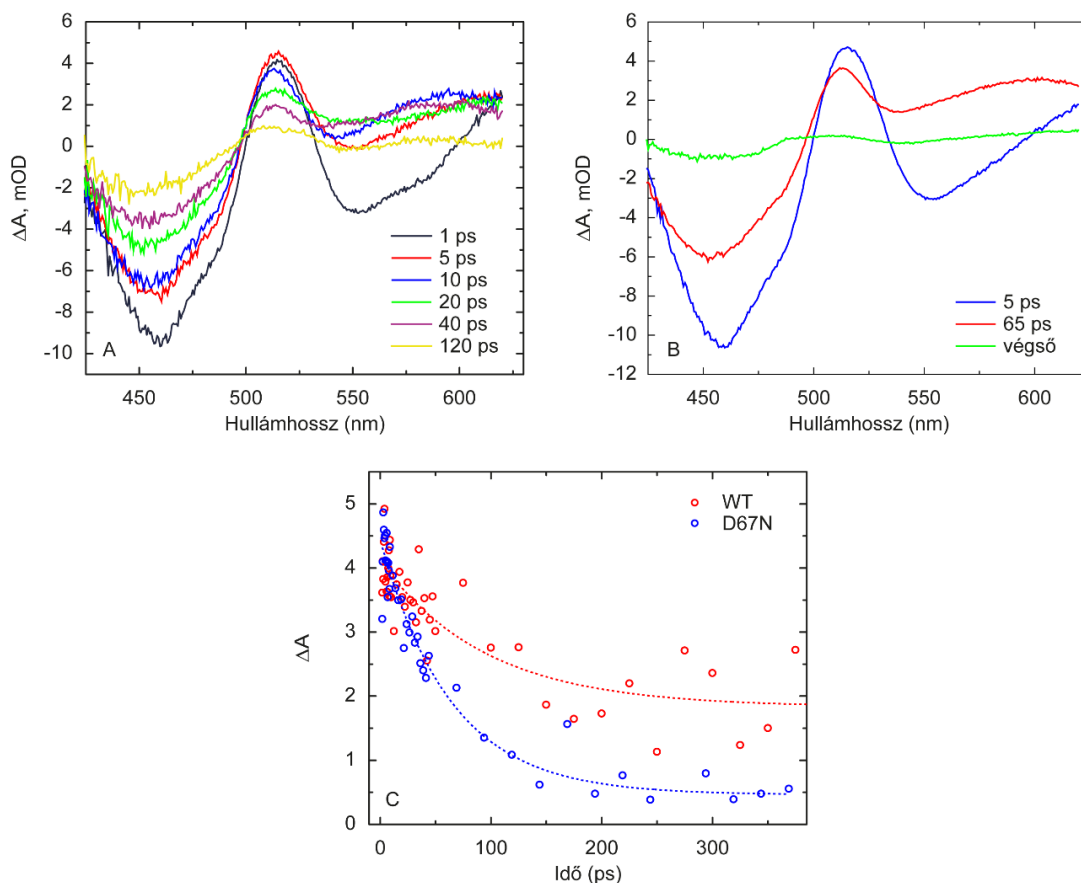
3.2.1 A vad típusú OaPAC és D76N mutáns expressziója és tisztítása

A D67N mutációt a Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) segítségével valósítottuk meg, a vad típusú teljes hosszúságú OaPAC/pCold-I-t használtuk templátként. A mutáns konstrukciót DNS-szekvenálással ellenőriztük. A teljes hosszúságú vad típusú vagy D67N OaPAC/pCold-I konstrukciót *E. coli* BL21(DE3) sejtekbe transzformáltuk és 100 µg/mL ampicillint tartalmazó LB-agar lemezen növesztettük. Ezt követően beoltottunk 10 ml 2x-YT táptalajt (Fisher Bioreagents, BP9743-5), amely 100 µg/mL ampicillint tartalmazott, és éjszakán át 37°C-on (250 RPM) rázattuk. A 10 ml tenyészetet 1 L 2x-YT táptalaj beoltására használtuk, 37 °C-on (250 RPM) rázattuk, amíg az OD600 el nem érte a ~0,8 értéket. A hőmérsékletet 18 °C-ra csökkentettük, majd 30 perces inkubációt követően 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérjék expresszióját. A 18 órás sötétben történő indukció után a sejteket centrifugáltuk, a sejt pelletet felhasználásig -20°C-on tároltuk. Fehérjetisztítás előtt a sejt pelletet felolvasztottuk és reszuszpendáltuk reszuszpenziós pufferben (50 mM NaH₂PO₄ pH = 8,0, 300 mM, NaCl, 2 mg/ml fenilmetil-szulfonil fluorid (PMSF), 1 mg/ml lizozim, 0,5 mg/ml DNáz, Pierce proteáz inhibitor tabletta (1 tabletta/50 ml, Thermo Fisher Scientific)). A sejteket 4°C-on szonikálással roncsoltuk. A sejt törmelékét ultracentrifugálással távolítottuk el 30 000 rpm-en, 80 percig 4°C-on, majd a felülúszót a reszuszpenziós pufferrel egyensúlyba hozott Ni-NTA oszlopra töltöttük. Az oszlopot 60 ml 5 mM imidazolt tartalmazó reszuszpenziós pufferrel mostuk, majd a fehérjét 500 mM imidazolt tartalmazó reszuszpenziós pufferrel eluáltuk. Az eluátum puffer tartalmát azonnal kicseréltük 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0, 20 mM MgCl₂ pufferre egy Econo-Pac 10 G sótanító oszlop segítségével. A fehérjét Superdex 200 oszlopkromatográfiával tovább tisztítottuk. A fehérje tisztaságát és hozamát SDS-PAGE és UV-Vis spektroszkópia segítségével határoztuk meg.

3.2.2 Tranziens abszorpciós mérések

Az OaPAC fotokémiáját a korábbiakban ultragyors tranziens infravörös és a látható fény hullámhossztartományán működő abszorpciós spektroszkópiával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a kék fény elnyelése után protonhoz kapcsolt elektronátvitel történik (PCET: proton coupled electron transfer)³³. A folyamat során az elsődleges elektrondonor az Y6 tirozin, azonban létezik egy alternatív elektronátviteli útvonal is a W90 és a flavin között³³. Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy az OaPAC AC-aktivitása az elsődleges protonhoz kapcsolt elektronátadási folyamathoz kapcsolódik. Ahogy a döntő fontosságú tirozin (Y6) pKa értéke 9,9-ről <7,7-re csökkent, a flavin gyök nem protonálódott (anionos (FAD⁻) gyök maradt), és az enzimaktivitás csökkenését figyeltük meg³³.

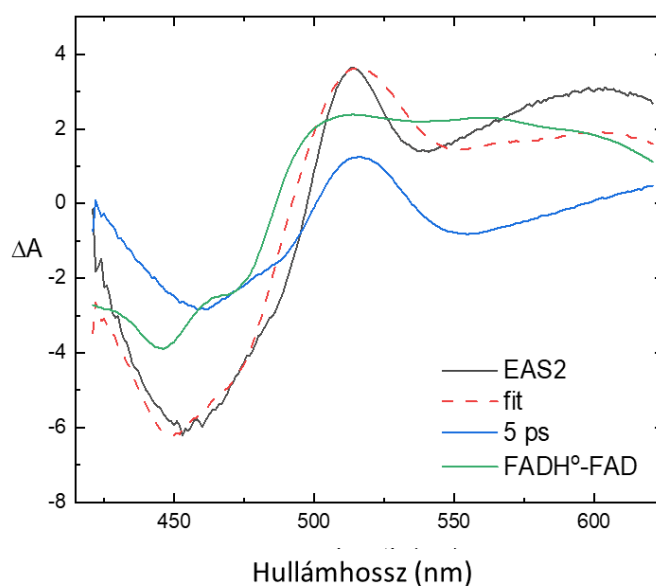
A D67N mutáns elsődleges fotokémiájának jellemzésére tranziens abszorpciós (TA) méréseket végeztünk. A flavin kromofór különböző redoxállapotainak határozottan eltérő abszorpciós spektrumai (2.2 B ábra) felhasználhatók a nyers adatok globális elemzésével kapott EAS-spektrumok (EAS: Evolution Associated Spectra, $\Delta OD(\lambda)$) spektrális modellezéséhez^{2,3}, a gerjesztést követő különböző késleltetéseknél detektált flavin- és aminosav gyökök azonosítására. (Mivel a Tyr^H és a Tyr^o nem abszorbeál >420 nm-en, hozzájárulásukat nem vettük figyelembe.) Az OaPAC D67N-es mutánsa esetében mért tranziens abszorpciós spektrumok (3.9 A ábra) hasonlók más (oxidált) flavoproteinekéhez – beleértve a vad típusú OaPAC-ot^{66,67}: 450 nm körül egy intenzív negatív csúcs (bleaching: kifehéredés) figyelhető meg, amely a flavin S₀→S₁ abszorpciójának eltűnéséhez köthető. Az 510 nm körüli pozitív csúcs a gerjesztett állapot abszorpciójának, míg a korai időbeli késleltetéseknél megfigyelt széles ~ 550 nm-es csúcs a flavin stimulált emissziójának tulajdonítható (3.9 A ábra).



3.9 ábra. A) Tranziens abszorpciós mérések a D67N mutánsan a különböző színekkel jelölt időbeli késleltetéseknél B) Globális elemzés után kapott EAS spektrumok C) A vad típusú és a D67N OaPAC egyedi kinetikája 505 nm-en mérve. Monoexponenciális illesztést alkalmazva a vad típusú és a D67N időállandója 90 ± 30 ps illetve 64 ± 8 ps volt.

A globális elemzéshez szekvenciális sémát feltételezve három különböző időállandóval (5 ps, 65 ps és végtelen) illeszthettük az adatokat (3.9 B ábra), úgy, mint a vad típusú fehérje esetében³³. A vad típusú mérésekhez hasonlóan az első EAS időállandóját 5 ps-nak találtuk és ennek eredményeként az EAS1-et a gerjesztett és oxidált flavin (FAD*-FADox) különbségspektrumához rendelhetjük. A D67N mutáns 65 ps-os EAS2 időállandója a vad típushoz (EAS2= 83 ps) képest gyorsabb fázisra utal. A 65 ps-os komponens a (FADH•-FAD) és (FAD*-FADox) spektrumok lineáris kombinációjaként illesztettük, mivel a fluoreszcenciamérésekből látható, hogy a gerjesztett állapot a hosszabb időállandónál is jelen van. A 3.9 B* ábrán látható FADH• és FADox spektrumokat használtuk fel a (FADH•-FAD) spektrum megalkotásához, az 5-ps EAS-t pedig a (FAD*-FADox) spektrumhoz. A mutáns esetén mért rövidebb időállandó szintén a gyökkár gyorsabb rekombinációját mutatja. A FAD* relaxációjának kinetikája a flavinra történő elektron- és protonátadás révén diszperzív és a

lassabb fázisok kinetikailag nem választhatók el a FADH^{*} köztes állapot kialakulásának kinetikájától. A végső állapot a vörös-eltolódott FADox állapotot jelzi. A kapott időállandókból az következik, hogy a FAD gerjesztett állapotát követően 5 ps alatt kialakul a semleges gyök. Ezután 65 ps alatt a FAD oxidálódik. A FAD* gyorsabb relaxációjára utal, hogy a FAD* relatív hozzájárulása az EAS2-höz kisebb a D67N (~60%) esetén, mint a vad típusnál (~75%). A D67N OaPAC mutáns gyorsabb fázisa mellett az EAS2 alakjában is különbségeket figyeltünk meg a vad típus és a mutáns között. 505 nm-en a gerjesztett állapotú flavin csúcsának kinetikája a D67N esetén látványosan gyorsabb, mint a vad típusú fehérjénél (3.9 C ábra). Monoexponenciális illesztést alkalmazva a vad típusú és a D67N fehérje időállandója 90 ± 30 ps és 64 ± 8 ps-nak adódott. A gyorsabb FAD* csökkenés erősíti azt a hipotézisünket, miszerint az aszparaginsav semleges vagy pozitív töltésű aminosavra történő cseréje gyorsítja az elektrontranszfer folyamatot.



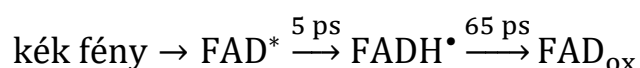
3.9 B* ábra Az EAS2 (65 ps) spektrumát a flavin gerjesztett állapot és a semleges gyökállapot spektrumának kombinációjával lehetett illeszteni. Az 5-ps EAS-t a FAD*-FADox különbségspektrumaként használtuk.

A mért tranziens spektrumok vizsgálata azt mutatja, hogy a széles negatív tartomány a stimulált emisszióhoz rendelhető, továbbá az EAS2 alakja hasonló a W90F OaPAC mutáns esetén kapott EAS2-höz. Érdeemes megjegyezni, hogy a W90F mutáció megszüntette azt az alternatív útvonalat, amelyben a W90 elektrondonorként szolgálhat. Ezt a vad típusúhoz képesti

gyorsabb relaxáció és a semleges flavin gyök hatékonyabb képződése jelezte. A W90F-hez hasonlóan a D67N esetében is megfigyeltük a semleges flavin gyök nagyon hatékony képződését röviddel a gerjesztés után, ami arra utal, hogy ebben a mutánsban is inkább a PCET útvonal részesül előnyben (ahol az elektron- és a protondonor az Y6 tirozin), mint az az útvonal, ahol az elektront a W90-ből vonjuk ki.

A gerjesztett állapot abszorpciós maximumainál az egyedi kinetikát illesztve szintén gyorsabb lecsengést figyelhettünk meg a D67N esetében a vadtípushoz képest, ami alátámasztja azt az elsődleges megfigyelést, hogy a gerjesztett állapot - valószínűleg az elektrontranszfer miatt bekövetkező - kioltása hatékonyabb a mutánsban.

Az időállandók (2. táblázat) azt jelzik, hogy a FAD gerjesztés után közvetlenül kialakult gerjesztett állapota 5 ps alatt relaxálódik a következő állapotba, ami a semleges flavin gyök jelenlétét mutatja. A végső állapot a FAD világos állapotára jellemző szerkezete, amely hosszabb ideig tart, mint a mérés ablaka:

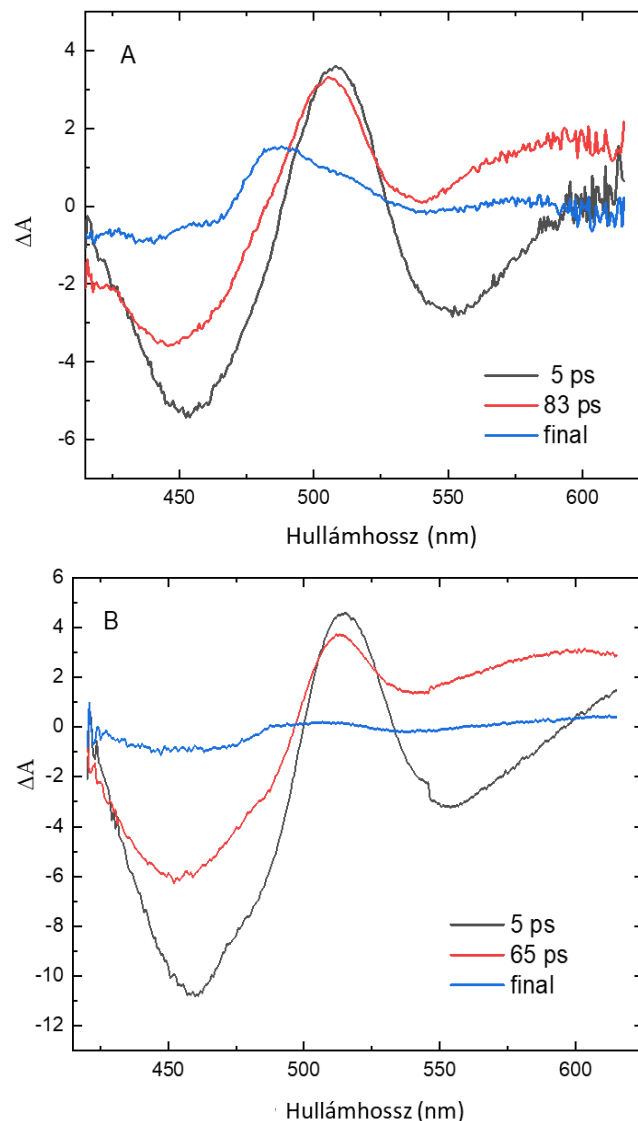


2. táblázat Az ultragyors tranziens abszorpciós mérések eredményeként kapott időállandók

	vad típus	D67N
FADH[•] létrejötte	5 ps	5 ps
FADH[•] relaxációja	83 ps	65 ps
világos állapot	∞	∞
a gerjesztett állapoti abszorpciós csúcs kinetikája 505 nm-en	90 ± 30 ps	64 ± 8 ps

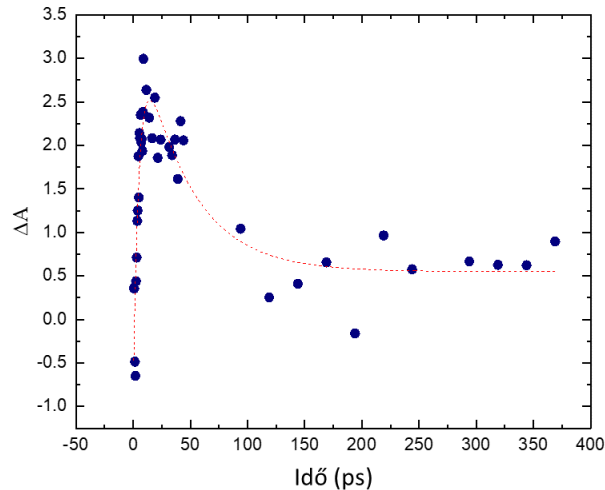
A vad típusú OaPAC-ban az ~510 nm-es csúcs ~80 ps alatt tolődik el 480 nm felé; ez az eltolódás a világos állapot kialakulásának köszönhető. Hasonló eltolódás figyelhető meg a D67N OaPAC mutánsban, de a végső állapot EAS amplitúdója kisebb a mutánsban a vad típushoz képest. Mivel a jelátviteli állapot spektruma hasonló a vad típusban és a D67N OaPAC-ban (3.17 bal oldali ábra), ez a világos állapot kialakulásának alacsonyabb kvantumhatásfokára utal. A végső állapot és a kezdetben képződött FAD*

különbségspektrumok amplitúdó-arányai alapján (EAS végső és 5-ps a 3.10. ábrán) úgy becsüljük, hogy a világos állapotú kvantumhatásfok ~ 4 -szer alacsonyabb a D67N-ben, mint a vad típusú OaPAC-ban. A kvantumhatásfok ebben az esetben azt mutatja meg, hogy 100 elnyelt fotonból hány indít meg világos állapotot. Ez attól is függ, hogy a tirozin milyen állapotban van; protonált állapotban nagyobb gyakorisággal ad protont. (A triptofán útvonal (W90) nem vezet el a fehérje funkciójáig, habár a triptofán redoxpotenciálja nagyobb, mint a tiroziné.) A nem normált EAS-spektrumok a 3.10 ábrákon láthatók.



3.10 ábra A WT és a D67N OaPAC nem normált EAS-spektrumai a vad típus- és D67N adatok globális elemzése után. A D67N mérés esetében a végső állapot amplitúdója kisebb, mint az első EAS 10 %-a.

A 3.11 ábrán a D67N 600 nm-en megfigyelt kinetikája látható, (ahol a FADH• -nak meg kell jelennie). A semleges gyök állapot kialakulása 5.1 ± 1.5 ps időállandóval, az állapot relaxációja (deprotonálódása) 42.5 ± 18 ps időállandóval történik. A két időállandó átfedésben van az EAS1 és EAS2 globális illesztéssel meghatározott értékeivel.



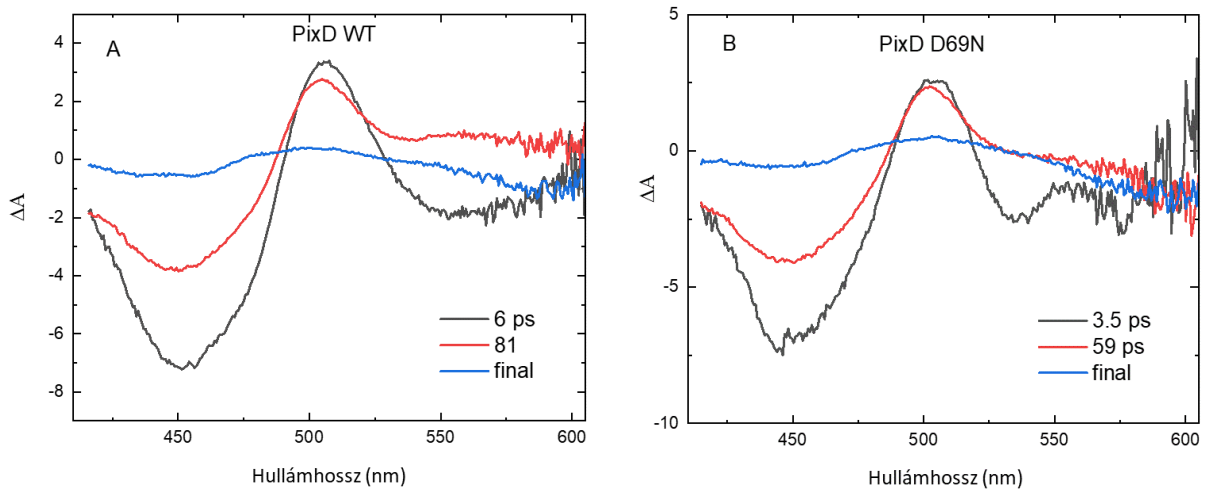
3.11 ábra A D67N 600 nm-en megfigyelt kinetikája

Tranziens abszorpciós mérések a vad típusú és a D69N mutáns PixD fehérjéken

A Goings és munkatársai⁴⁰ által javasolt mutáció PixD-ben való hatásának ellenőrzésére elkészítettük a D69N mutánst és tranziens abszorpciós méréseket végeztünk a vad típusú PixD-n és a PixD D69N mutánsban (3.12 ábra). Nagyon hasonló viselkedést és időállandókat figyeltünk meg (3. táblázat), mint az OaPAC-nál. A mutánsban gyorsabb a visszaalakulás, mint a vad típusban.

3. táblázat A TA mérések eredményeként kapott időállandók az OaPAC vad típusa - D67N mutánsa, illetve a PixD vad típusa - D69N mutánsa esetén

	OaPAC		PixD	
	vad típus	D67N	vad típus	D69N
FADH• létrejötte	5 ps	5 ps	6 ps	3,5 ps
FADH• relaxációja	83 ps	65 ps	81 ps	59 ps
világos állapot	∞	∞	∞	∞



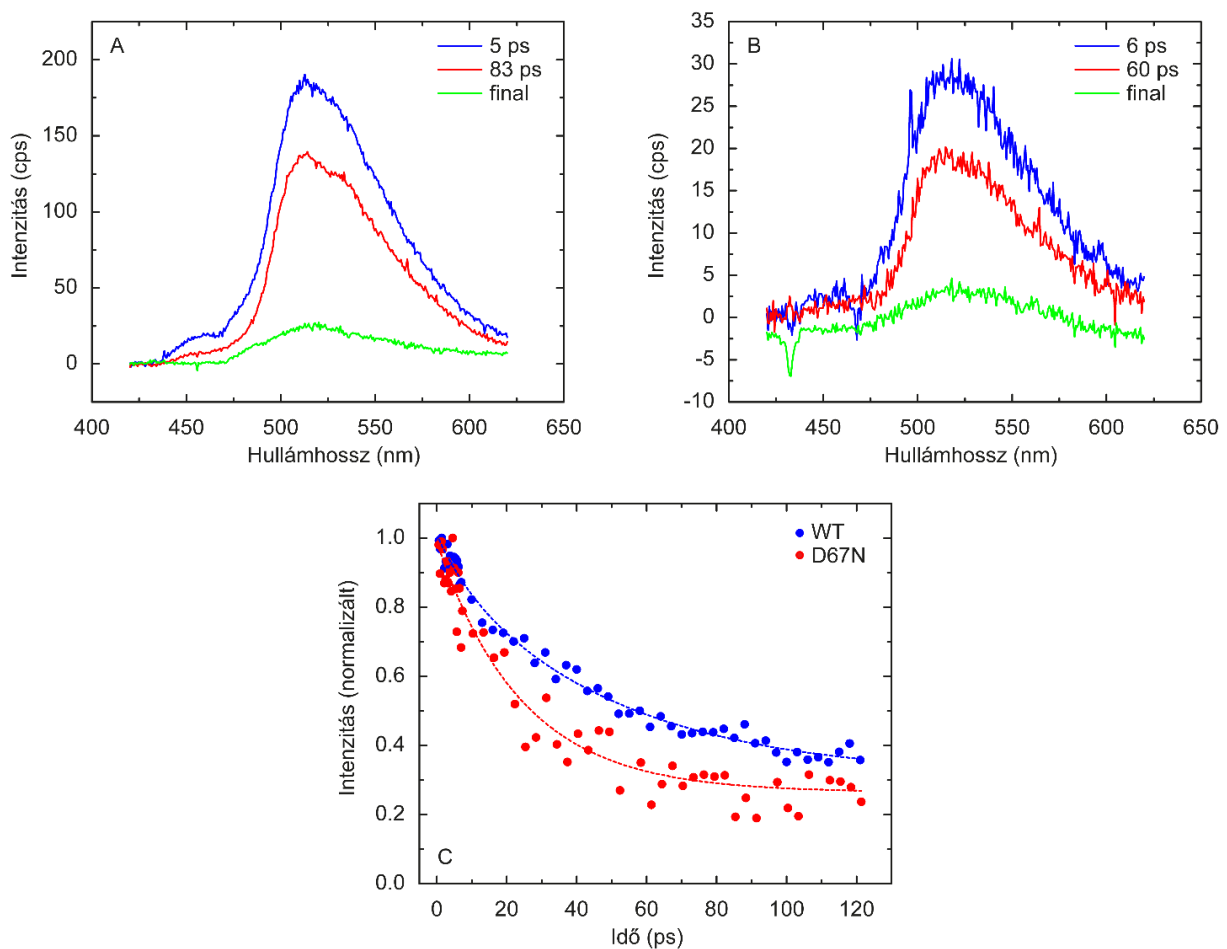
3.12 ábra EAS-spektrumok az A) WT és B) D69N adatok globális elemzése után

3.2.3 Ultrarövid tranziens fluoreszcencia spektroszkópai kísérletek

Az ultrarövid tranziens fluoreszcencia méréseket saját építésű Kerr-kapus elrendezésünkön végeztük, azzal a szándékkal, hogy további információkat nyerjünk a D67N mutáció elektrontranszportra gyakorolt hatásáról. A Kerr-kapus megoldás előnye a fluoreszcencia upkonverziós rendszerekkel szemben, hogy minden időkésltetésnél megkapjuk a fluoreszcencia emissziós spektrumot is, míg a fluoreszcencia upkonverziós módszer esetében a fluoreszcencia intenzitás lecsengését egy adott hullámhosszon mérjük. A 3.13 A) és B) ábrán a tranziens fluoreszcencia-adatsor globális illesztésével kapott EAS-spektrumok láthatók. A fluoreszcencia emisszió maximuma ~ 513 nm-nél jelentkezett, ami valamivel magasabb, mint az AppA fehérje esetében megfigyelt érték (ahol közel 500 nm) és lényegesen alacsonyabb, mint a szabad flaviné (~ 530 nm)⁶⁸. A fluoreszcencia emisszió hullámhossza azt mutatja, hogy a flavin kompakt (nem a felszín irányába kitett) környezetben rejtőzik, és nincs jelentős különbség a vad típusú és a mutáns fehérje emissziós maximumai között. Mindez arra utal, hogy a mutáció nem eredményezett jelentős változást a flavin környezetében.

A vad típusú OaPAC fluoreszcencia emissziójának lecsengése erősen diszperzívnek bizonyult, ahogyan azt az AppA esetében is megfigyelték. A globális illesztés mindkét mintában, a TA kísérletekkel analóg három EAS-komponenssel írható le, a D67N esetében a vad típusúhoz képest kisebb időállandóval (4. táblázat). A tranziens fluoreszcencia-adatsor tehát

jól leírható volt ugyanazzal a három élettartammal (5 ps, 83 ps és végtelen a vad típusú, illetve 5 ps, 60 ps, végtelen a mutáns fehérje esetén), mint a TA kísérletekben. A megfelelő EAS (szekvenciális sémát feltételező (1→2→3)) spektrumok mindegyikének 513 nm környékén van a maximuma, ami arra utal, hogy fehérjéhez kötött flavinból származnak, mivel a szabad flavin fluoreszcencia-emissziós maximuma ennél jobban tolódik a vörös felé (~ 530 nm).



3.13 ábra. A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópiai mérések eredménye A) A vad típusú tranziens fluoreszcencia-adatainak globális elemzésével kapott EAS-spektrumok. A globális illesztés eredménye a flavin heterogén relaxációját mutatja B) A D67N mutáns tranziens fluoreszcencia-adatainak globális elemzésével kapott EAS-spektrumok C) Az 513 nm-en megfigyelt fluoreszcencia-csökkenés egyedi kinetikája. Monoexponenciális illesztést alkalmazva a vad típusú fluoreszcencia relaxáció átlagos élettartamára 40 ± 2 ps, a D67N esetében pedig 25 ± 2 ps adódott.

A vad típusú és a D67N mutáns fehérje fluoreszcencia emissziójának lecsengése közötti közvetlen összehasonlítás érdekében összevetettük az 513 nm-en megfigyelt kinetikát. A 3.13 C) ábrából látható, hogy a gerjesztett állapot relaxációjának élettartama a D67N mutánsban közel a fele (25 ± 2 ps) a vad típusú fehérje esetében megfigyeltnek (40 ± 2 ps). Ez az eredmény

egyértelműen bizonyítja, hogy a D67N OaPAC mutánsban az elektronátvitel összességében gyorsabb. Mégis, mint fentebb kimutattuk, ez a gyorsabb kezdeti elektronátvitel nem vezet a világos állapot nagyobb hozamához (kvantumhatásfokához) - feltehetően a FADH[•] -ből a sötét állapotba történő erőteljes ellenkező irányú transzfer (a Y6-ra visszafelé irányuló proton- és elektrontranszfer) miatt.

4. táblázat A Kerr-kapuzott fluoreszcencia kísérletek során kapott élettartamok

	OaPAC	
	vad típus	D67N
FADH[•] létrejötte	5 ps	6 ps
FADH[•] relaxációja	83 ps	60 ps
világos állapot	∞	∞
a fluoreszcencia intenzitás lecsengése 513 nm-en	40 ±2 ps	25 ±2 ps

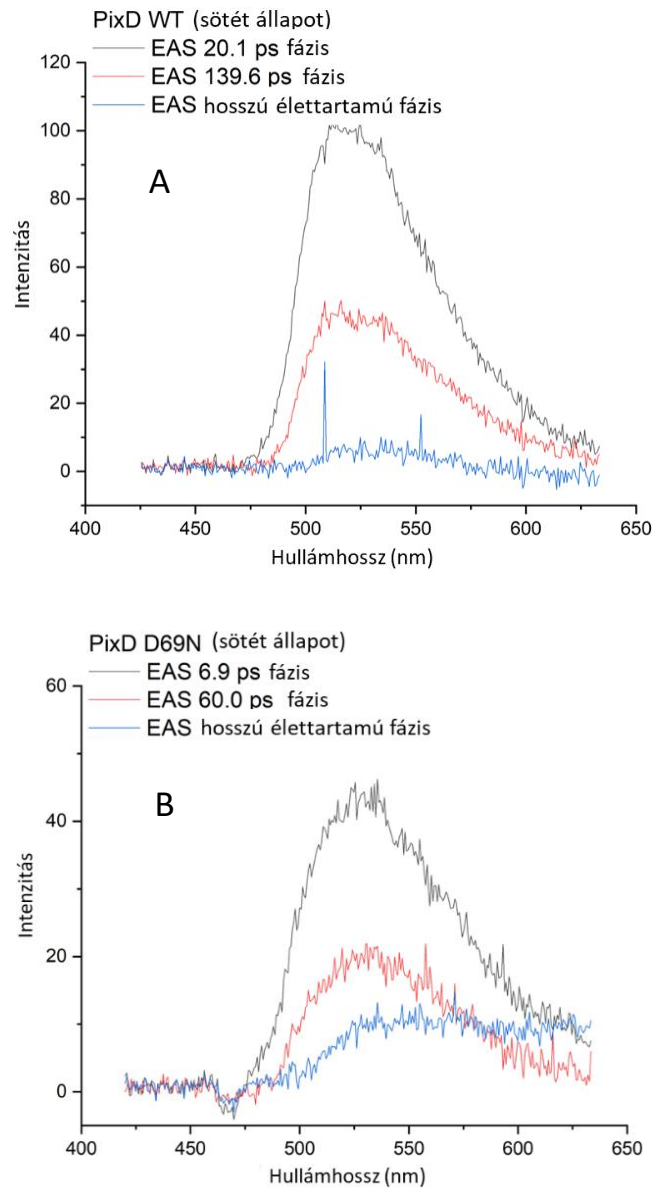
Tranziens fluoreszcencia mérések a PixD vad típusú és a D69N mutáns fehérjéken

A PixD esetében feltételezett elektronátmenet-kinetika fokozódás az aszpartát aszparagin helyett történő bevezetésének hatására az általunk készített homológ PixD mutáció (D69N) esetén is igazolódott: szintén gyorsabb fluoreszcencia-csökkenést és rövidebb időállandókat eredményezett (3.14 ábra).

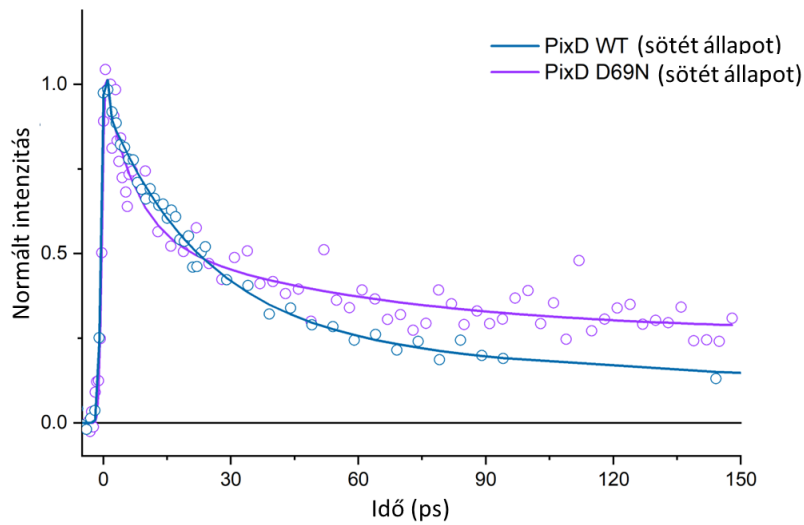
5. táblázat A Kerr-kapuzott fluoreszcencia kísérletek során kapott élettartamok az az OaPAC vad típusa - D67N mutánsa, illetve a PixD vad típusa - D69N mutánsa esetén

	OaPAC		PixD	
	vad típus	D67N	vad típus	D69N
FADH[•] létrejötte	5 ps	6 ps	20 ps	6 ps
FADH[•] relaxációja	83 ps	60 ps	139,6 ps	60 ps
világos állapot	∞	∞	∞	∞

A vad típusú PixD fluoreszcencia-csökkenése heterogén volt, hasonlóan a vad típusú OaPAC-hoz, hosszabb időállandóval. A D69N mutáns időállandói nagyon hasonlóak adódtak az OaPAC D67N mutánsnál megfigyelt értékekhez (5. táblázat). A vad típus és a D69N fluoreszcencia-csökkenését 520 nm-en figyelve csak a mutánsban látható a fluoreszcencia-emisszió kissé gyorsabb kezdeti csökkenése (3.15 ábra).



3.14 ábra A) A PixD vad típus és a B) D69N mutáns esetében kapott EAS-spektrumok



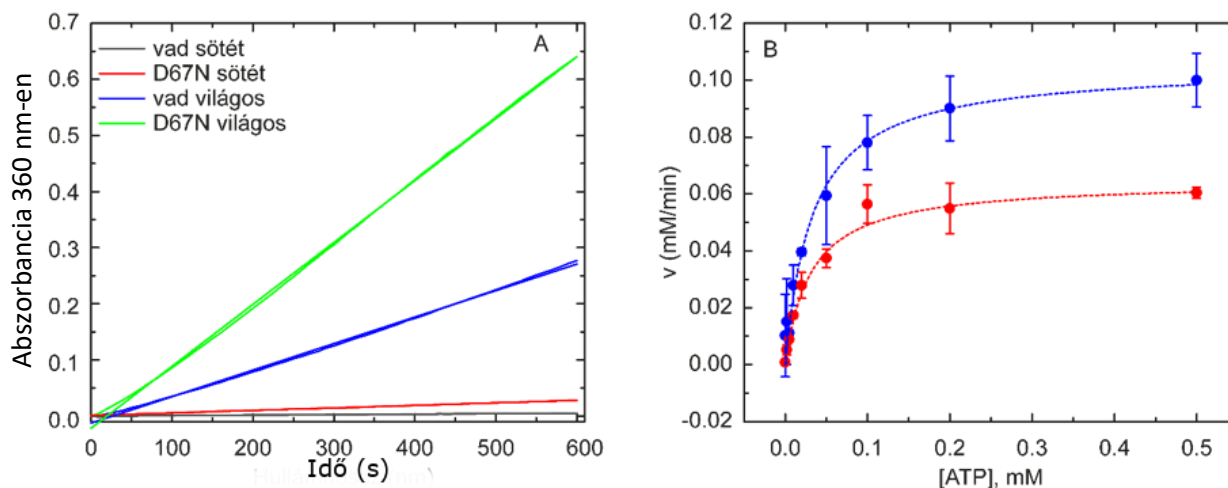
3.15. ábra A vad típusú PixD és a D69N PixD egyedi kinetikája 520 nm-en megfigyelve

3.2.4 cAMP hozam mérések

Elsőként a vad típusú OaPAC és a D67N OaPAC adenilát-cikláz aktivitását egy olyan spektrofotometriás teszttel követtük nyomon időben, amely az OaPAC által felszabaduló pirofoszfátot közvetetten mutatja ki (OD_{360}), amikor az ATP-t átalakítja cAMP-vé.

A 3.16.A ábra az 1 μ M vad típusú OaPAC, illetve az 1 μ M D67N mutáns OaPAC sötét- és fényindukált enzimaktivitását mutatja 500 μ M ATP jelenlétében. Sötétben a mutáns enzimaktivitása kissé magasabb, mint a vad típusé, de még mindig nagyon alacsony. Megvilágítás hatására a konverziós ráták erősen megnöttek a vad típusú és a D67N mutáns esetében. A D67N mutáns azonban nagyobb sebességgel (hatékonyabban) alakítja át az ATP-t, mint a vad típus, így ez a mutáns kiindulópontként szolgál a PAC fehérjék optogenetikai hangolásához.

A kinetikai állandók meghatározásához növekvő mennyiségű szubsztrát (ATP) felhasználásával végeztünk enzimatis vizsgálatot. Az eredményeket a klasszikus Michaelis-Menten függvény segítségével értékeltük ki (3.16.B ábra).



3.16 ábra. A vad típusú és a D67N OaPAC enzimaktivitása. A) az ATP átalakításának kinetikája a vad típusú és a D67N OaPAC sötét és fényadaptált állapotában – a 2-amino-6-merkapto-7-metilpurin termelésének sebessége. A sötét állapotban a D67N mutánsban (piros) az ATP-átalakulás sebessége kissé nagyobb, mint a vad típusban (fekete). A fényhez adaptált állapotban 0,5 mM ATP jelenlétében az átalakulás sebessége a mutáns (zöld) esetében nagyobb volt, mint a vad típusú fehérje esetében (kék). B) A vad típusú (piros) és a D67N (kék) enzimaktivitásának Michaelis-Menten-diagramja. Megvilágítás hatására a v_{max} megnövekedett a D67N mutánsban.

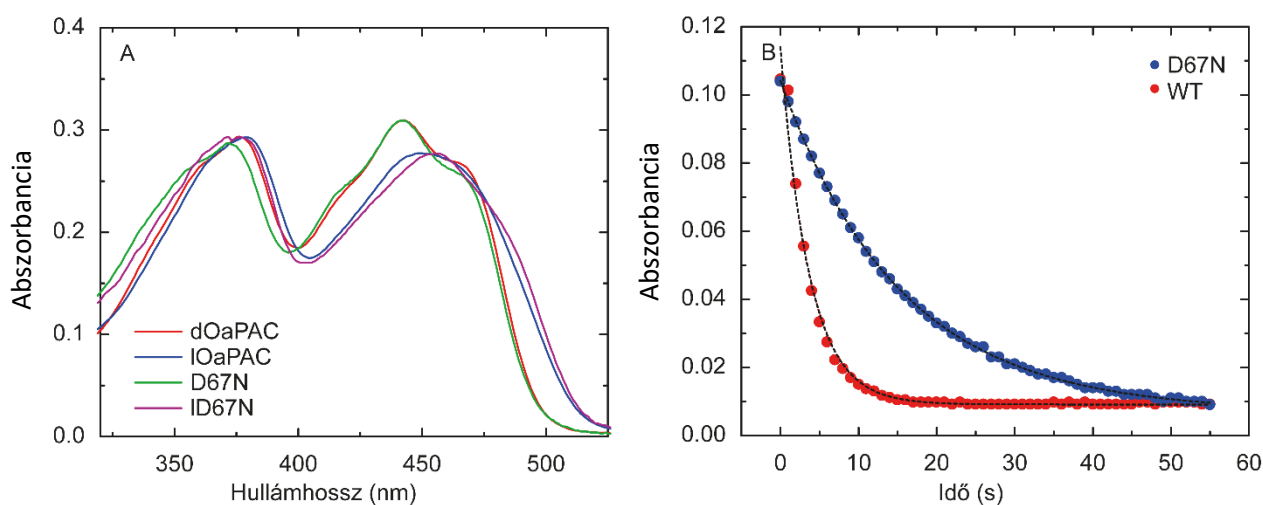
Ezek a vizsgálatok a D67N OaPAC-ban megnövekedett cAMP-termelődést mutattak: az átalakulási sebesség maximális értéke 1,5-szer nagyobb volt a mutánsban ($0,100 \pm 0,002$ mM/perc), mint a vad típusban ($0,064 \pm 0,007$ mM/perc). A félmaximális sebesség koncentrációja (K_M) szintén kissé magasabb a mutánsban, mint a vad típusban, de ami még fontosabb, hogy a katalitikus állandó (k_{cat}) - amely megadja az egyes enzimhelyek által egységnyi idő alatt termékké alakítható szubsztrátmolekulák számát - ~1,5-szer magasabb a D67N-ben (50,05 1/perc), mint a vad típusú OaPAC-ban (32,2 1/perc) (lásd a 6. táblázatot).

6. táblázat A táblázatban az enzimaktivitási esszé során kapott paraméterek láthatók. Ennek alapján a v_{max} és a k_{cat} is jelentősen megnő a D67N mutánsban

Kinetikai értékek	Vad típus	D67N
V_{max} (mM min ⁻¹)	0.0644 ± 0.0069	0.1001 ± 0.002
k_{cat} (min ⁻¹)	32.2	50.05
K_M (mM)	0.031 ± 0.001	0.412 ± 0.005
k_{cat}/K_M (mM/min)	1038.7	121.5

3.2.5 Visszatérési kísérletek

Más BLUF domén fehérjékhez hasonlóan a D67N mutáns abszorpciós spektruma az S_0 - S_1 átmenetet jellemző abszorpciós csúcs tipikus vörös eltolódását mutatja (442 nm-ről 455 nm-re) kék fényel történő besugárzás után. A BLUF-domén fotofizikája és a mutáns funkcionális dinamikája közötti kapcsolat jellemzésére visszatérési kísérleteket is végeztünk. A BLUF-domének világosból sötét állapotba való regenerálódása - a fotoaktivált állapot relaxációja - néhány másodperctől néhányszor tíz percig is terjedhet. Az AppA-ban a fotociklus viszonylag hosszú, majdnem fél órán át tart (a regenerációs élettartam ~ 25 perc)⁶⁹, a PixD-ben lényegesen rövidebb (~ 26 s)³⁸, az OaPAC-ban ez csupán néhány másodperc³³. A D67N mutáns és a vad típusú OaPAC regenerálódását a 492 nm-en mért abszorpcióval követtük nyomon. A mutáns regenerálódási sebessége lényegesen kisebb (~ 5 -öd része), mint a vad típusú OaPAC esetén mért visszatérési sebesség (3.17 B ábra).



3.17 ábra A) A vad típusú és a D67N OaPAC abszorpciós spektrumai sötét és világos állapotban B) A vad típusú és a D67N OaPAC sötét állapotba való visszatérésének sebessége 490 nm-en megfigyelt abszorpció nyomon követésével. A vad típusú OaPAC 3,6 s alatt relaxál sötét állapotba, a D67N esetében ez az idő 15,3 s

A 3.17/A ábrán a vad típusú és D67N OaPAC sötét és világos állapotban felvett abszorpciós spektrumai, a B ábrán a vad típusú és a D67N OaPAC sötét állapotba való visszatérése, helyreállása figyelhető meg. Az abszorpciós spektrumokon jól látszik, hogy a vad típusú (piros) és a mutáns (zöld) abszorpciói nagyon hasonlóak a sötét állapotban: az S_0 - S_1 átmenet csúcsa mindkét fehérjénél azonos, maximuma 442 nm-nél van. A mutáns esetében az

S₀-S₂ átmenet 4 nm-es kék eltolódása figyelhető meg (376 nm a vad típusú esetében és 372 nm a mutáns esetében). Világos állapotban az S₀-S₁ csúcs a vad típusban 452 nm-re, a mutánsban pedig 456 nm-re tolódik. Az S₀-S₂ csúcs a vad típusban 376 nm-ről 379 nm-re, a mutánsban 372 nm-ről 376 nm-re tolódik (7. táblázat).

7. táblázat Az abszorpciós csúcsok eltolódása

	sötét állapot		világos állapot	
	vadtípus	D67N	vadtípus	D67N
S₀-S₁ átmenet csúcsa (nm)	442	442	452	456
S₀-S₂ átmenet csúcsa (nm)	376	372	379	376

A D67N lassabb regenerálódása arra utal, hogy a fehérje a fénygerjesztés után több időt tölt olyan szerkezetben, amely lehetővé teszi a cAMP termelését. Összességében a mutáns olyan szerkezetet vesz fel, amely nem csak kedvezőbb az ATP-cAMP-ra átalakuláshoz, hanem lassítja is az eredeti szerkezetbe való visszarendeződést.

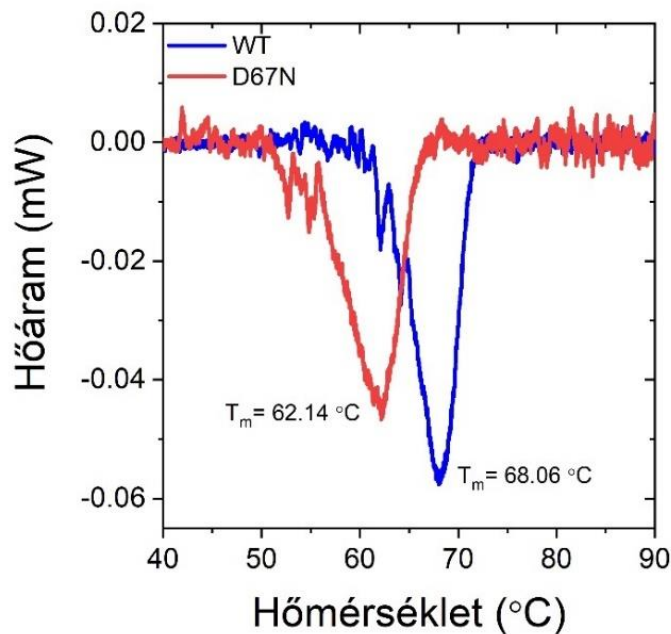
3.2.6 Differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérések

Az enzimatisz aktivitásban és a sötét állapotba való visszatérésben tapasztalt különbség azt sugallja, hogy a bevezetett mutáció megváltoztatta a fehérje szerkezetét. Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a cAMP-termelés növekedésének eredetébe, differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) kísérleteket végeztünk a vad típusú és a D67N OaPAC fehérjén, hogy megvizsgáljuk a termostabilitásukat. Ezek a mérések jelentős különbséget mutatnak a mutáns és a vad típusú OaPAC között (3.18 ábra).

A DSC-t méréseket SETARAM Micro DSC-III kaloriméterrel, 20 és 100 °C közötti tartományban végeztük 0,3 K·min⁻¹ fűtési sebességgel. A mintát (vad típusú és D67N fehérje) és a referenciát (puffer) ± 0,05 mg pontossággal egyensúlyoztuk, hogy elkerüljük az edények hőkapacitásának korrekcióját. A denaturált minta második hőmérését az alapvonal korrekciója céljából végeztük el. A termikus kibomlási görbék olvadási hőmérsékletét (T_m) az OriginLab Origin2021 szoftverrel állapítottuk meg.

Az olvadási hőmérséklet (T_m) az a hőmérséklet, ahol a fehérje 50%-a denaturálódik,

míg a görbe alatti terület a fehérje kitekeredéshez szükséges energiát mutatja, amely az entalpiaváltozáshoz (ΔH) kapcsolódik. A vad típus termikus denaturációja meredek endotermikus denaturálódást mutatott 68,1 °C-os T_m és 0,078 J/g ΔH értékkel. A D67N mutánson végzett mérés alacsonyabb T_m értéket (62,1 °C) eredményezett, alacsonyabb ΔH -val (0,069 J/g).



3.18 ábra. A vad típusú (WT) és a mutáns (D67N) OaPAC termikus kitekerése DSC-vel mérve.

A D67N kisebb ΔH értéke és a 6°C -kal alacsonyabb T_m értéke azt mutatja, hogy a D67N OaPAC termodinamikai stabilitása a mutációval jelentősen csökkent. Ez a D67N mutáns kevésbé kompakt és rugalmasabb konformációjára, ezáltal a szerkezeti változásra utal. A DSC mérések alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a D67N OaPAC fehérje megnövekedett enzimaktivitásának háttérében a flexibilisebb szerkezet, vagyis a kedvezőbb struktúra áll és nem az elektron transzfer folyamatban megfigyelt különbségek.

3.2.7 Nukleotid-kötési vizsgálatok fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel

A fluoreszcencia-anizotrópia érzékeny a ligandumok fehérjékhez való kötődésére⁴. Az anizotrópia változásait a fluorofór mozgékonyságának változása okozza. Az OaPAC hozzáadása a MANT-ATP-hez növeli az N-metilantraniloil (a MANT-ATP fluoreszcens része) fluoreszcencia anizotrópiáját, mivel a MANT-ATP kötődése az OaPAC-hoz a jelölt egység forgási tehetetlenségének növekedését eredményezi és így lelassítja annak forgását. Mivel nem volt ismert, hogy az ATP-nek milyen az affinitása a fehérje sötét vagy világos állapotában, ezért fluoreszcencia anizotrópia mérésen alapuló nukleotid-kötési esszé segítségével megmértük egy fluoreszcensen jelölt ATP-analóg (MANT-ATP) kötési affinitását (K_D) a vad típusú fehérje és a D67N mutáns esetén.

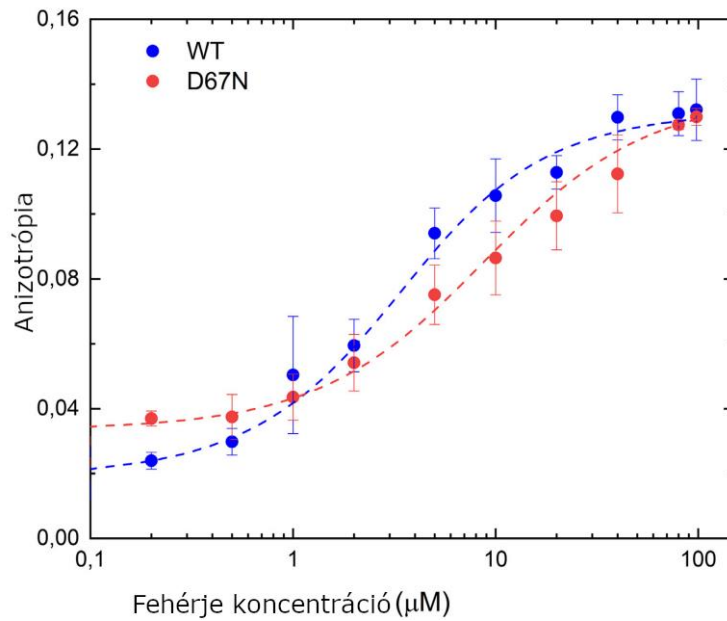
A fluoreszcencia-anizotrópia alapú nukleotid-kötési vizsgálatokat szobahőmérsékleten végeztük 2 μ M MANT ATP felhasználásával. Ez egy hidrolizálható, fluoreszcensen jelölt ATP, amely 350 nm-es gerjesztés mellett 450 nm-en emittál. A méréseket egy L formátumú, polarizációs tartozékkal felszerelt Fluorolog Jobin Yvon Horiba spektrofluorométerrel végeztük. A K_D -értékeket az alábbi kvadratikus kötési egyenletre való illesztéssel határoztuk meg:

$$\frac{r-r_A}{r_{AT}-r_A} = \frac{A_0+T_0+K_D-\sqrt{(A_0+T_0+K_D)^2-4\cdot A_0\cdot T_0}}{2} \quad (31)$$

ahol A_0 és T_0 az összes MANT-ATP/cAMP és OaPAC koncentráció, r_A a MANT-ATP/cAMP steady state anizotrópiája az OaPAC távollétében, r_{AT} a MANT-ATP/cAMP anizotrópiája telítődő OaPAC-mennyiségnél és K_D a MANT-ATP/cAMP-OaPAC-komplex disszociációs állandója.

A 2 μ M MANT-ATP-t 350 nm-en gerjesztettük, a fluoreszcencia emissziót pedig 450 nm-en detektáltuk az OaPAC koncentrációjának 0-98 μ M tartományban történő növelése mellett (3.19 ábra). Mivel az OaPAC 350 nm-en gerjesztve >500 nm felett emittál, ezért a flavin emisszió nem járul hozzá az anizotrópia mérésekhez (ld. FAD emissziós spektruma az 1.2 ábrán). A vad típusú és a D67N OaPAC MANT-ATP-hez való affinitására (K_D) a vad típus esetében $2,2 \pm 0,4$ mM, a mutáns esetében $7,7 \pm 1,6$ mM értéket kaptunk. A mutáns esetében tapasztalt alacsonyabb affinitás ismét arra enged következtetni, hogy a mutáció olyan – már a

DSC mérésekben is tapasztalt – szerkezeti változást idézett elő, amely befolyásolta az ATP kötési affinitását, valamint a cAMP termelés hozamát.



3.19 ábra. A MANT-ATP nukleotid fluoreszcencia-anizotrópia mérése vad típusú és D67N OaPAC-ben a MANT-ATP koncentrációjának függvényében (rögzített értéken (1 μM) MANT-ATP-koncentráció mellett). A fehérje koncentrációjának növekedésével a kötött nukleotid populációja is növekszik, ami magasabb fluoreszcencia-anizotrópiát eredményez. A kötési affinitás a vad típusú esetben magasabb volt. *MANT: 2'-(vagy-3')-O-(N-metilán-tranilil)adenozin 50 -trifoszfát, trinátrium só;

Záró gondolatok, értelmezés

Előállítottuk a fotociklus kinetikájának megváltoztatása szempontjából ígéretes OaPAC mutánst, a D67N-t. Az OaPAC kristályszerkezete alapján a D67 hidrogénkötési távolságban van az R79 (3 Å) aminosavtól és a flavin ribitil-láncától (3,2 Å). Mivel a D67 hidrogénkötés-akceptor, aszparaginra - egy semleges aminosavra - történő mutációja a hidrogénkötés-hálózat megváltoztatásával módosítja a flavin elektrosztatikus potenciálját. Goings és munkatársai³⁸ szerint a flavin középpontjában lévő elektrosztatikus potenciál módosítható a pozitív töltésnek a gyűrű felé történő mozgásával vagy a negatív töltésnek a gyűrűtől való eltávolításával.

A PixD-ben a D69-R71 páros jó példa az egymáshoz hidrogénkötéssel kapcsolódó aminosavakra, amelyek ellentétes hatást gyakorolnak az aktív hely potenciáljára. A Goings-csoport³⁸ által végzett kvantummechanikai/molekulamechanikai vizsgálat szerint, amikor a D69-R71 pár közelebb kerül a flavin gyűrűhöz, a negatív töltésű D69 destabilizálja a töltésátvitelt, míg a pozitív töltésű R71 stabilizálja azt, és fordítva. Ha a D67-et N-re mutáljuk, az N67 oldallánca és a flavin ribitil-lánca közötti hidrogénkötés hossza várhatóan megnő, ami potenciálisan kedvez a töltésátadásnak.

Ultrarövid tranziens fluoreszcencia méréseink azt mutatták, hogy a mutánsban a világos állapot létrejöttének irányában zajló elektronátvitel teljes kinetikája jelentősen gyorsabb volt a vad típushoz képest, ami összhangban van Goings és munkatársai³⁸ előrejelzéseivel. A TA mérések 4-szer gyengébb fotoaktivációs kvantumhatásfokot is mutattak, ami a világos állapot kialakulásával versengő relaxáció („visszatranszfer”) jelentősebb felgyorsulását tükrözi a mutánsban. (Ha nem lenne visszafelé történő proton/elektron transzfer, relaxáció, akkor a flavin protonált állapotban maradna.) A mutáció további kinetikai hatása a sötét állapotba való visszatéréshez szükséges relaxációs sebesség negyed részére történő lassulása. Ezek a hatások összességében hasonló enzimsebességhez vezetnek a vad típusú és a D67N OaPAC esetében. Mivel a D67N aktivitása sötét állapotban valamivel magasabb, mint a vad típusé, a maximális enzimsebesség (k_{cat}) a világos állapotban a 1,5-szeresére nő. Ez teszi ezt a mutánst jobb potenciális optogenetikai eszközzé, mivel a sötét állapotú aktivitás még mindig alacsony, de a fény által aktivált cAMP-termelés magasabb, mint a natív fehérjében.

A D67N mutáns gerjesztéskor hosszabb időt tölt az ATP-cAMP átalakulást elősegítő szerkezetben. Ez arra utal, hogy az enzimatis aktivitás megnövekszik, mivel a fehérje az alacsonyabb kvantumhatásfok ellenére tovább van a világos állapotban. Kalorimetriás méréseink azt mutatták, hogy az olvadási hőmérséklet jelentősen alacsonyabb, mint a vad típusnál megfigyelt, ami arra utal, hogy a D67N mutáns könnyebben bomlik ki. Úgy tűnik tehát,

hogy a mutáns fehérje kevésbé kompakt szerkezettel rendelkezik, mint a vad típus. A kötési kísérletek szintén egy megváltozott enzimatis doménszerkezetre utaltak, mivel a vad típusú OaPAC valamivel erősebben köti az ATP-t, mint a mutáns. Összességében a releváns kinetikai sebességek további hangolására irányuló jövőbeli vizsgálatok jó utat jelenthetnek a PAC-ok enzimaktivitásának növeléséhez.

Összefoglalás, következtetések

Kísérletsorozatunkban az OaPAC fotoszenzoros BLUF-doménjében zajló elsődleges elektrontranszfer hatását vizsgáltuk a fehérje enzimatis aktivitására. Az OaPAC AC aktivitását a BLUF doménben zajló elektrontranszfer folyamat optimalizálásával növeltük: célzott mutagenezissel egy aszparaginsavat aszparaginra cseréltünk a flavin kromofór közelében. Szimuláción alapuló előrejelzések azt mutatták, hogy a mutáció (D67N) megváltoztatja az elektronátviteli folyamat kinetikáját. Ultrarövid tranziens abszorpciós és tranziens fluoreszcencia méréseink alapján a mutánsban az elektronátvitel sebessége számottevően nagyobb volt a vad típusú OaPAC fehérjéhez képest. Az ATP-cAMP átalakulás számottevő sebességnövekedése nagyobb enzimatis aktivitást eredményezett: a v_{max} több mint kétszeres, a K_M négyszeres volt a mutáns esetében. Az enzimatis vizsgálatok azt is kimutatták, hogy kék fényvel való megvilágítás hatására a mutáns ~1,6-szor több cAMP-t termel, mint a vad típusú OaPAC. Érdekes módon a világos állapotból a sötét állapotba való visszatérés sebessége ~4-szer hosszabb volt a mutánsban, mint a vad típusú OaPAC-ban. A gyorsabb elektronátadási sebesség, valamint a nagyobb enzimatis aktivitás úgy tűnik, összefüggésben van a fehérje szerkezetével: a kalorimetriás és az anizotropia mérések azt mutatják, hogy a mutáns kevésbé kompakt, és rugalmasabb szerkezetű, mint a vad típus. Szerkezeti kísérleteink értelmében a mutáció strukturális változást is előidézett, ami szintén hatással lehet az enzimatis aktivitásra.

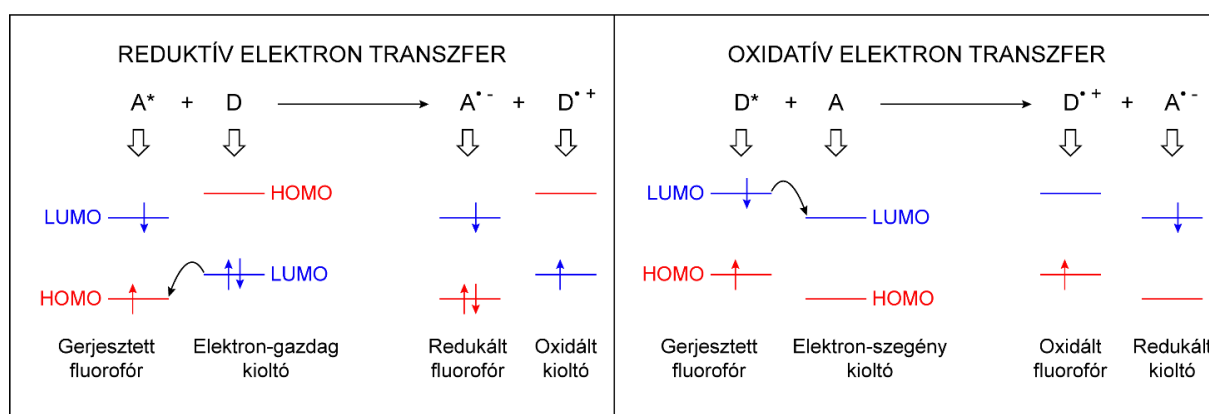
A D67N OaPAC mutánson végzett kísérleteink igazolták azt a hipotézist, miszerint az aszparaginsav aszparaginra való cseréje felgyorsítja a fotoindukált elektrontranszfert, valamint a flavin oxidációját. A mutáció egyúttal a cAMP konverzió növekedéséhez is vezetett, amelynek az elsődleges oka valószínűleg nem az elektrontranszfer folyamatában megfigyelt különbség, hanem a mutáns szerkezetének megváltozása.

8. táblázat: A módszerek és eredmények összefoglalása

		Mérési eredmények			
Mérési eljárás	Mért paraméter neve, jele, mértékegysége	Vad típusú OaPAC	D67N mutáns	Változás, tendencia	Értelmezés
Enzimatisz aktivitás mérés: cAMP hozam mérések abszorpciós spektrofotometriával (pirofoszfát esszé)	Átalakulás maximális sebessége v_{max} [mM/perc]	0,064±0,007	0,1±0,002	↑ ~1,6X	Nagyobb enzimaktivitás a mutáns esetén
	Katalitikus állandó k_{cat} [1/perc]	32,2	50,05	↑ ~1,6X	Egységnyi idő alatt a mutáns enzim több szubsztrát molekulát képes terméké alakítani
	Félmaximális sebesség koncentrációja K_M [mM]	0,031±0,001	0,041±0,005	↑ ~1,3X	Nagyobb enzimaktivitás a mutáns esetén
Időfüggő abszorpciós spektrofotometria	Sötét állapotba való visszatérés ideje [s]	3,6	15,3	↑ ~4X	A mutáns hosszabban tartózkodik világos állapotban, azaz az ATP-cAMP átalakulást elősegítő szerkezetben
Ultragyors tranziens abszorpciós spektroszkópia	Gerjesztett állapot relaxáció ideje [ps]	90±30	64±8	↓ ~0,7X	A mutánsban az elektronátvitel sebessége számottevően nagyobb a vad típusú OaPAC-hoz képest
Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia	Fluoreszcencia élettartam τ [ps]	40±2	25±2	↓ ~0,6X	
Differenciális pásztázó kalorimetria	Olvasási hőmérséklet T_m [°C]	68,1	62,1	↓ -6°C	A mutáns könnyebben bomlik ki, rugalmasabb a szerkezete.
	Entalpiaváltozás ΔH [J/g]	0,078	0,069	↓ ~0,9X	A mutáns kisebb energiát igényel a denaturációhoz, tehát a szerkezete kevésbé kompakt
Steady-state fluoreszcencia anizotrópia	Kötési affinitás K_D [mM]	2,2±0,4	7,7±1,6	↑ ~3,5X	A mutáció olyan szerkezeti változást idézett elő, amely befolyásolta az ATP kötési affinitását, valamint a cAMP termelés hozamát.

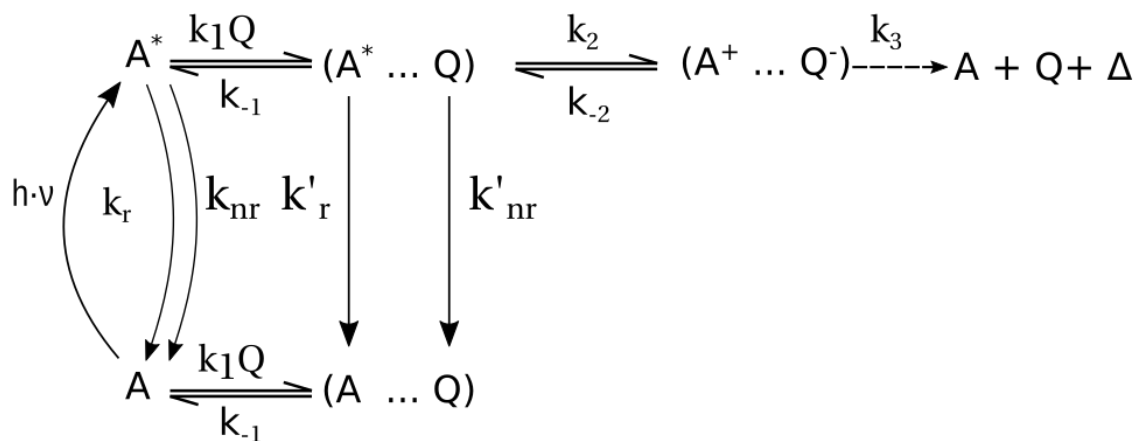
3.3 Elektrontranszfer és fluoreszcencia kioltás – kapcsolat a két projekt közt

Az élettani folyamatokban gyakran találkozunk elektron- és protontranszfer folyamatokkal. Ilyen például a fotoszintézis is, ami fény hatására bekövetkező elektrontranszfer folyamat. A flavoproteinekben a fénybesugárzást követően a funkcióhoz vezető első közvetítő lépés elektrontranszfer folyamat. A fénnel gerjesztett molekulák a környezetükből elektront vonnak el, aminek eredményeként megszűnik gerjesztett állapotuk, a fluoreszcenciájuk gyorsabban lecseng, vagyis kioltódik. A közeli elektronok fluoreszcencia kioltó hatása oldatban és fehérjékben egyaránt megfigyelhető. Flavoproteinekben a gerjesztett flavin fotoredukciója közeli aminosavak (tirozin vagy triptofán) elektron donációja révén történik, ami hatékony fluoreszcencia kioltást eredményez.



kioltó között bizonyos fokú elektronátvitelre kerül sor (Ricci és Nesta, 1976; Froehlich és Nelson, 1978; Johnson, 1980). Az a tény, hogy mind az akrilamid, mind a szukcinimid kiválóan elnyeli a hidratált elektronokat (Steiner és Kirby, 1969; Simic és Hagon, 1973), alátámasztja ezt a feltevést. Az indol fluoreszcencia szukcinimiddel történő kioltási hatékonyságának oldószerfüggése szintén arra utal, hogy a töltésszétválasztás történik a kioltási folyamat során (Eftink, 1986). Általában azonban nehéz határozottan megállapítani a kioltási mechanizmust egy adott rendszer esetében, és gyakran közvetett bizonyítékokra kell támaszkodni az ilyen folyamatok jellemzésére.

A fluoreszcencia-kioltási reakció hatékonyságát gyakran a γ paraméterrel adják meg, ahogyan azt Weller 1961-ben a fluoreszcencia-oltási folyamatok dinamikájáról szóló értekezésében leírta. A γ kifejezésben hangsúlyos a koncentrációfüggés. Az ábrán látható fotokémiai séma feltételezi, hogy a kioltási mechanizmus egy töltésátviteli köztitermék képződését foglalja magában. A levezetett egyenletek bármely érintkezéses kioltási mechanizmusra vonatkoznak.



k_1 és k_{-1} az ütközési komplex diffúziólimitált képződési és disszociációs sebességi állandója, k_2 és k_{-2} az ütközési komplex átalakulásának időállandója töltésátviteli komplexszé, A jelöli a fluorofórt, Q a kioltó, ami az A^* gerjesztett fluorofórt elektrontranszfer mechanizmussal oltja ki, k_r és k_{nr} a radiatív és nonradiatív energiaveszteségek sebességi állandói, $(\text{A}^+ \dots \text{Q})$ a töltésátviteli komplex, ami A^* hullámhosszán biztosan nem fluoreszkál, k_3 a töltésátviteli komplex A-ra és Q-ra vagy fotokémiai terméké váló lebomlásának sebességi állandója. A fluoreszcencia kioltás hatékonyságára (γ) vonatkozó legfontosabb egyenlet:

$$\gamma = \frac{k_2}{k_2 + k_{-1} + \tau_0^{-1} + k_1(Q)} \quad (32)$$

A Stern-Volmer egyenlet standard alakja:

$$\frac{\phi_F^0}{\phi} = 1 + K_{SV}(Q) = 1 + k_q \tau_0, \quad (33)$$

ami kiterjeszhető

$$\frac{\phi_F^0}{\phi} = (1 + \gamma k_1 \tau_0 Q) \left[1 + \frac{k_1}{k_{-1}}(Q) \right] \quad (34)$$

a módosított Stern Volmer egyenletté.

Eftink és munkatársai megállapították, hogy az akrilamid és a szukcinimid töltésátviteli mechanizmus révén oltja ki az aromás vegyületek fluoreszcenciáját, illetve, hogy a fluoreszcencia kioltási reakció hatékonysága nagyban függ a fluorofór ionizációs energiájától, a fluorofór gerjesztési energiájától, a kioltó elektronaffinitásától (megmutatja, hogy mennyire jó az elektronátviteli mechanizmus), a használt oldószertől és hogy mennyire jó elektronmegkötő a kioltó. Fontos megjegyezni, hogy ezek a szerkezet-aktivitás összefüggések nem mutatják meg, hogy milyen mértékben történik teljes vagy részleges töltésátvitel a kioltási reakciókban. A korrelációk csak arra utalnak, hogy a folyamat során bizonyos mennyiségű töltés kerül át a fluoroforról a kioltóra.

Irodalomjegyzék

- 1 Kao, Y. *et al.* Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 13132-13139 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja8045469>
- 2 Snellenburg, J., Liptonok, S., Seger, R., Mullen, K. & van Stokkum, I. Glotaran: A Java-Based Graphical User Interface for the R Package TIMP. *Journal of Statistical Software* **49**, 1-22 (2012). <https://doi.org/10.18637/jss.v049.i03>
- 3 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). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>
- 4 Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer, 2006).
- 5 Liptonok, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A. & Vos, M. H. Subpicosecond Kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol Biol* **1076**, 321-336 (2014). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_13
- 6 Sancar, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **103**, 2203-2237 (2003). <https://doi.org/10.1021/cr0204348>
- 7 Brettel, K. & Vos, M. H. Spectroscopic resolution of the picosecond reduction kinetics of the secondary electron acceptor A1 in photosystem I. *FEBS Lett* **447**, 315-317 (1999). [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00317-8)
- 8 Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**, 586-590 (2000). <https://doi.org/10.1038/35014644>
- 9 Byrdin, M., Eker, A., Vos, M. & Brettel, K. Dissection of the triple tryptophan electron transfer chain in Escherichia coli DNA photolyase: Trp382 is the primary donor in photoactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8676-8681 (2003). <https://doi.org/10.1073/pnas.1531645100>
- 10 Lukacs, A. *et al.* Role of the middle residue in the triple tryptophan electron transfer chain of DNA photolyase: Ultrafast spectroscopy of a Trp -> Phe mutant. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 15654-15658 (2006). <https://doi.org/10.1021/jp063686b>
- 11 Lukacs, A., Eker, A., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. Electron Hopping through the 15 angstrom Triple Tryptophan Molecular Wire in DNA Photolyase Occurs within 30 ps. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14394-+ (2008). <https://doi.org/10.1021/ja805261m>
- 12 Byrdin, M. *et al.* Quantum Yield Measurements of Short-Lived Photoactivation Intermediates in DNA Photolyase: Toward a Detailed Understanding of the Triple Tryptophan Electron Transfer Chain. *Journal of Physical Chemistry a* **114**, 3207-3214 (2010). <https://doi.org/10.1021/jp9093589>
- 13 Lukacs, A. *et al.* Photoexcitation of the blue light using FAD photoreceptor AppA results in ultrafast changes to the protein matrix. *J Am Chem Soc* **133**, 16893-16900 (2011). <https://doi.org/10.1021/ja2060098>
- 14 Brust, R. *et al.* Proteins in action: femtosecond to millisecond structural dynamics of a photoactive flavoprotein. *J Am Chem Soc* **135**, 16168-16174 (2013). <https://doi.org/10.1021/ja407265p>
- 15 Lukacs, A., Tonge, P. J. & Meech, S. R. Photophysics of the Blue Light Using Flavin Domain. *Acc Chem Res* **55**, 402-414 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00659>
- 16 Li, G., Sichula, V. & Glusac, K. D. Role of adenine in thymine-dimer repair by reduced flavin-adenine dinucleotide. *J Phys Chem B* **112**, 10758-10764 (2008). <https://doi.org/10.1021/jp804506t>
- 17 van den Berg, P. A., van Hoek, A., Walentas, C. D., Perham, R. N. & Visser, A. J. Flavin fluorescence dynamics and photoinduced electron transfer in Escherichia coli glutathione reductase. *Biophys J* **74**, 2046-2058 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77911-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77911-1)
- 18 van den Berg, P. A. *et al.* Exploring the conformational equilibrium of E. coli thioredoxin reductase: characterization of two catalytically important states by ultrafast flavin fluorescence spectroscopy. *Protein Sci* **10**, 2037-2049 (2001). <https://doi.org/10.1110/ps.06701>

- 19 van den Berg, P. A., Widengren, J., Hink, M. A., Rigler, R. & Visser, A. J. Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **57**, 2135-2144 (2001). [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(01\)00494-2](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(01)00494-2)
- 20 Bonetti, C. *et al.* The light activation mechanism of a novel blue-light photoreceptor. *Biophysical Journal*, 337A-337A (2007).
- 21 Gauden, M. *et al.* Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* **44**, 3653-3662 (2005). <https://doi.org/10.1021/bi047359a>
- 22 Kennis, J. *et al.* The LOV2 domain of phototropin: A reversible photochromic switch. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 4512-4513 (2004). <https://doi.org/10.1021/ja031840r>
- 23 Kennis, J. T. & Groot, M. L. Ultrafast spectroscopy of biological photoreceptors. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 623-630 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.09.006>
- 24 Laan, W. *et al.* On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochemistry* **45**, 51-60 (2006). <https://doi.org/10.1021/bi051367p>
- 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* **44**, 1215-1224 (2005). <https://doi.org/10.1021/bi047876t>
- 26 Brust, R. *et al.* Ultrafast Structural Dynamics of BlsA, a Photoreceptor from the Pathogenic Bacterium. *J Phys Chem Lett* **5**, 220-224 (2014). <https://doi.org/10.1021/jz4023738>
- 27 Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *PNAS* **113**, 6659-6664 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1517520113>
- 28 Ohki, M. *et al.* Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 8562-8567 (2017). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704391114>
- 29 Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S. & Iseki, M. Functional transplant of photoactivated adenylate cyclase into Aplysia mechanosensory neurons. *Neuroscience Research* **58**, S241-S241 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.06.593>
- 30 Jansen, V. *et al.* Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *Elife* **4** (2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05161>
- 31 Ohki, M. *et al.* Structural insight into photoactivation of an adenylate cyclase from a photosynthetic cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 6659-6664 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1517520113>
- 32 Ohki, M. *et al.* Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*. *Acta Crystallographica a-Foundation and Advances* **72**, S251-S251 (2016). <https://doi.org/10.1107/S2053273316096194>
- 33 Collado, J. *et al.* Unraveling the Photoactivation Mechanism of a Light-Activated Adenylate Cyclase Using Ultrafast Spectroscopy Coupled with Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *Acs Chemical Biology* **17**, 2643-2654 (2022). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00575>
- 34 Lukacs, A. *et al.* BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J Am Chem Soc* **136**, 4605-4615 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja4121082>
- 35 Mathes, T., van Stokkum, I., Bonetti, C., Hegemann, P. & Kennis, J. The Hydrogen-Bond Switch Reaction of the Blrb Bluf Domain of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Physical Chemistry B* **115**, 7963-7971 (2011). <https://doi.org/10.1021/jp201296m>
- 36 Zirak, P. *et al.* Photodynamics of the small BLUF protein BlrB from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Photochem Photobiol B* **83**, 180-194 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.015>
- 37 Bonetti, C. *et al.* The Role of Key Amino Acids in the Photoactivation Pathway of the *Synechocystis* Slr1694 BLUF Domain. *Biochemistry* **48**, 11458-11469 (2009). <https://doi.org/10.1021/bi901196x>
- 38 Gil, A. A. *et al.* Photoactivation of the BLUF Protein PixD Probed by the Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues. *J Am Chem Soc* **139**, 14638-14648 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07849>
- 39 Fujisawa, T., Takeuchi, S., Masuda, S. & Tahara, T. Signaling-State Formation Mechanism of a BLUF Protein PapB from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas palustris* Studied by

- Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem B* **118**, 14761-14773 (2014). <https://doi.org/10.1021/jp5076252>
- 40 Goings, J. & Hammes-Schiffer, S. Early Photocycle of Slr1694 Blue-Light Using Flavin Photoreceptor Unraveled through Adiabatic Excited-State Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 20470-20479 (2019). <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11196>
- 41 Mátyus, L., Szöllosi, J. & Jenei, A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *J Photochem Photobiol B* **83**, 223-236 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.017>
- 42 Eftink, M. R. & Ghiron, C. A. Dynamics of a protein matrix revealed by fluorescence quenching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3290-3294 (1975). <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3290>
- 43 Gratton, E., Jameson, D. M., Weber, G. & Alpert, B. A model of dynamic quenching of fluorescence in globular proteins. *Biophys J* **45**, 789-794 (1984). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84223-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84223-X)
- 44 Somogyi, B. *et al.* A double-quenching method for studying protein dynamics: separation of the fluorescence quenching parameters characteristic of solvent-exposed and solvent-masked fluorophors. *Biochemistry* **24**, 6674-6679 (1985). <https://doi.org/10.1021/bi00344a056>
- 45 Calhoun, D. B., Vanderkooi, J. M., Holtom, G. R. & Englander, S. W. Protein fluorescence quenching by small molecules: protein penetration versus solvent exposure. *Proteins* **1**, 109-115 (1986). <https://doi.org/10.1002/prot.340010202>
- 46 Tanaka, F. & Mataga, N. Fluorescence quenching dynamics of tryptophan in proteins. Effect of internal rotation under potential barrier. *Biophys J* **51**, 487-495 (1987). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83370-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83370-2)
- 47 Somogyi, B. & Lakos, Z. Protein dynamics and fluorescence quenching. *J Photochem Photobiol B* **18**, 3-16 (1993). [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)80035-8](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)80035-8)
- 48 Hild, G., Nyitrai, M., Gharavi, R., Somogyi, B. & Belágyi, J. Fluorescence quenching of the tryptophan emission from the F- and G-forms of actin. *J Photochem Photobiol B* **35**, 175-179 (1996). [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)07319-8](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07319-8)
- 49 Clark, P. L., Liu, Z. P., Zhang, J. & Gierasch, L. M. Intrinsic tryptophans of CRABPI as probes of structure and folding. *Protein Sci* **5**, 1108-1117 (1996). <https://doi.org/10.1002/pro.5560050613>
- 50 Wang, W. Q., Xu, Q., Shan, Y. F. & Xu, G. J. Probing local conformational changes during equilibrium unfolding of firefly luciferase: fluorescence and circular dichroism studies of single tryptophan mutants. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 28-33 (2001). <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4539>
- 51 Shirley, B. A. Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Mol Biol* **40**, 177-190 (1995). <https://doi.org/10.1385/0-89603-301-5:177>
- 52 Pace, C. N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**, 266-280 (1986). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)31045-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)31045-0)
- 53 Eftink, M. R. & Ghiron, C. A. Does the fluorescence quencher acrylamide bind to proteins? *Biochim Biophys Acta* **916**, 343-349 (1987). [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90179-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90179-8)
- 54 Carrington, C. D., Lapadula, D. M., Dulak, L., Friedman, M. & Abou-Donia, M. B. In vivo binding of [(14)C]acrylamide to proteins in the mouse nervous system. *Neurochem Int* **18**, 191-197 (1991). [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(91\)90185-g](https://doi.org/10.1016/0197-0186(91)90185-g)
- 55 Punyiczki, M. & Rosenberg, A. The effect of viscosity on the accessibility of the single tryptophan in human serum albumin. *Biophys Chem* **42**, 93-100 (1992). [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(92\)80011-s](https://doi.org/10.1016/0301-4622(92)80011-s)
- 56 Somogyi, B. *et al.* Coupling between external viscosity and the intramolecular dynamics of ribonuclease T1: a two-phase model for the quenching of protein fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **1209**, 61-68 (1994). [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90137-6)
- 57 Stein, D. L. A model of protein conformational substates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3670-3672 (1985). <https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3670>

- 58 Frauenfelder, H., Parak, F. & Young, R. D. Conformational substates in proteins. *Annu Rev Biophys Chem* **17**, 451-479 (1988). <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.17.060188.002315>
- 59 Hong, M. K. *et al.* Conformational substates and motions in myoglobin. External influences on structure and dynamics. *Biophys J* **58**, 429-436 (1990). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82388-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82388-2)
- 60 Alcalá, J. R., Gratton, E. & Prendergast, F. G. Fluorescence lifetime distributions in proteins. *Biophys J* **51**, 597-604 (1987). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83384-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83384-2)
- 61 Alcalá, J. R., Gratton, E. & Prendergast, F. G. Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions. *Biophys J* **51**, 925-936 (1987). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83420-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83420-3)
- 62 Alcalá, J. R., Gratton, E. & Prendergast, F. G. Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry. *Biophys J* **51**, 587-596 (1987). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83383-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83383-0)
- 63 Fiorini, R., Valentino, M., Wang, S., Glaser, M. & Gratton, E. Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **26**, 3864-3870 (1987). <https://doi.org/10.1021/bi00387a019>
- 64 Fiorini, R. M., Valentino, M., Glaser, M., Gratton, E. & Curatola, G. Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene reveal the effect of cholesterol on the microheterogeneity of erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* **939**, 485-492 (1988). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90095-8)
- 65 Laptinok, S. P. *et al.* A general approach for detecting folding intermediates from steady-state and time-resolved fluorescence of single-tryptophan-containing proteins. *Biochemistry* **50**, 3441-3450 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi101965d>
- 66 Nag, L., Sournia, P., Myllykallio, H., Liebl, U. & Vos, M. Identification of the TyrOH(center dot+) Radical Cation in the Flavoenzyme TrmFO. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 11500-11505 (2017). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b04586>
- 67 Nag, L., Lukacs, A. & Vos, M. H. Short-Lived Radical Intermediates in the Photochemistry of Glucose Oxidase. *Chemphyschem* **20**, 1793-1798 (2019). <https://doi.org/10.1002/cphc.201900329>
- 68 Karadi, K. *et al.* Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy. *Sci Rep* **10**, 2061 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59073-5>
- 69 Gil, A. *et al.* Mechanism of the AppABLUF Photocycle Probed by Site-Specific Incorporation of Fluorotyrosine Residues: Effect of the Y21 pKa on the Forward and Reverse Ground-State Reactions. *J Am Chem Soc* **138**, 926-935 (2016). <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11115>

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1.) Photocycle alteration and increased enzymatic activity in genetically modified photoactivated adenylate cyclase OaPAC

Katalin Raics, Katalin Pirisi , Bo Zhuang , Zsuzsanna Fekete , Nikolett Kis-Bicskei, Ildiko Pecsí, Kinga Pozsonyi Ujfalusi, Elek Telek, Yin Li, Jinnette Tolentino Collado, Peter J. Tonge, Stephen R. Meech, Marten H. Vos, Eموke Bodis, and Andras Lukacs

J Biol Chem. 2023 Aug;299(8):105056. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105056. IF: 5,5

2.) Fluorescence lifetime distributions report on protein destabilisation in quenching experiments

Emőke Bódis, Katalin Raics, Miklós Nyitrai, Zsuzsa Majer, András Lukács

J Photochem Photobiol B. 2013 Dec 5;129:108-14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.004. IF:2,8

További publikációk

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

Kristof Karadi, Sofia Kapetanaki, Katalin Raics, Ildiko Pecsí, Robert Kapronczai, Zsuzsanna Fekete, James Iuliano, Jinnette Collado, Agnieszka Gil, Jozsef Orban, Miklos Nyitrai, Greg Greetham, Marten Vos, Peter Tonge, Stephen Meech, Andras Lukacs

Sci Rep. 2020 Feb 6;10(1):2061. doi: 10.1038/s41598-020-59073-5.

4.) Developmental changes in the expression level of connexin36 in the rat retina

Tamás Kovács-Öller, Katalin Raics, József Orbán, Miklós Nyitrai, Béla Völgyi

Cell Tissue Res. 2014 Nov;358(2):289-302. doi: 10.1007/s00441-014-1967-9.

5.) The role of electron transfer in the enzymatic activity of a photoactivable adenylate cyclase

Elek Telek, Katalin Raics, Katalin Pirisi, Robert Kapronczai, Eموke Bodis, Ildiko Pecsí, Marten Vos, Bo Zhuang, Andras Lukacs

Biophysical Journal, vol. 122, issue 3, p. 43

6.) Position of W104 in AppA BLUF domain revealed by fluorescence spectroscopy

K. Raics, K. Pirisi, J. Orban, R. Brust, G. Greg, T. Mike, T. Pete, M. Stephen

9th European-Biophysical-Societies-Association Congress

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak, hogy lehetőséget adott a Biofizikai Intézetben való tudományos munkába való bekapcsolódásra és hogy ötleteivel, derűjével, pozitív hozzáállásával formált.

Hálás vagyok Dr. Lukács Andrásnak, amiért megtanította, hogyan dolgozik egy önálló kutató, kitűnően motivált, alaposra sarkallt, rengeteg tudást, tapasztalatot átadott és mindig volt türelme személyesen is segíteni akár a kísérletek legapróbbnak látszó részleteiben – amelyekről sokszor derült ki, hogy kifejezetten kritikusak. Példát mutatott kitartásból, szakmai tájékozottságból, munkakedvből, műveltségéből, profizmusból és kiváló előadói stílusból. A mérőműszerek és izgalmas mérési eljárások iránti rajongásom is Andrásnak köszönhetem.

Köszönöm Dr. Bódis Emőkének, hogy következetességre, az eltervezettek megvalósítására, minden részlet megértésére, utánajárására ösztönzött és kiváló pedagógiai érzékkel támogatott a közös munkánk során. Alapossága, széles látóköre, lényeglátása, szemléletes és lelkesítő magyarázatai, melyekből érződik a természet iránti rajongása, mindig lenyűgöz. A baráti beszélgetéseink is nagyon sokat jelentenek.

Hálás vagyok Dr. Orbán Józsefnek, Dr. Futó Kingának és Dr. Barkó Szilviának a mindig legjobbkor jövő szakmai segítségért és a jóleső baráti beszélgetésekért. Köszönöm Dr. Hild Gábor elgondolkodtató kérdésfelvetéseit, magyarázatait, szemléletformáló könyvajánlásait.

Köszönettel tartozom Dr. Grama Lászlónak, hogy szenzációs tanári mintaként szolgál sokaknak, köztük nekem is, és önzetlenül segíti az ezen az úton járók fejlődését. Szemléletes és világos magyarázatai derűs, barátságos és könnyed stílusában a tökéletes kombinációt testesítik meg. Köszönöm a motivációt: jó, hogy ilyen magas a léc, sosem dőlhetek hátra.

Hálás vagyok az Ultragyors Fehérjedinamika Kutatócsoport minden tagjának a szakmai segítségéért, a közös munkába fektetett energiájáért: Dr. Fekete Zsuzsannának, Dr. Pirisi Katalinnak, Dr. Karádi Kristófnak, Dr. Kis-Bicskei Nikolettnek, Dr. Pécsi Ildikónak, Dr. Telek Eleknek, Yin Li-nek, Ujfalusi Pozsonyi Kingának, Hoffmanné Simon Évának.

Köszönöm a Biofizikai Intézet munkatársainak a baráti légkört, a segítőkészséget és a támogatást.

Köszönettel tartozom a Ciszterci Rend Nagy Lajos Gimnáziuma igazgatójának, Dr. Nyisztor Zsoltnak, hogy támogatta doktori tanulmányaimat, Páll Csabának az ábrák elkészítésében nyújtott segítségéért, Várszeginé Pálos Katalinnak a nyelvi korrektúráért és Jehn Jánosnak, hogy tartotta a frontot, amíg az értekezés elkészült. Köszönöm Dr. Szeidemann

Ákosnak, hogy javító észrevételeivel segítette a disszertáció elkészítését. Hálás vagyok Dr. Sánta Imrének, aki megtanította, hogy másnak is lehet igaza és aki csodálkozik ott is, ahol mások közömbösek. Példája arra sarkall, hogy emberileg figyelmesebb, szakmailag alaposabb legyek. Hatására gondolkodó és gondolkodtató tanárrá váltam.

Köszönöm Férjemnek, hogy a katedrálist közösen építjük: a nyugodt munkaórákat, amíg a családi ügyeket sokszor erőn felül átvállalta, a türelmet, biztatást, önzetlen támogatást; lányaimnak a megértését és a hiányom elviselését. Hálás vagyok szüleimnek és testvéreimnek a forrásért: a természettudományok iránti rajongásomért, az éjszakába nyúló beszélgetésekért, a disszertáció átnézéséért.

Soli Deo Gloria!



Photocycle alteration and increased enzymatic activity in genetically modified photoactivated adenylate cyclase OaPAC

Received for publication, May 18, 2023, and in revised form, June 30, 2023. Published, Papers in Press, July 17, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105056>

Katalin Raics¹, Katalin Pirisi¹, Bo Zhuang² , Zsuzsanna Fekete¹, Nikolett Kis-Bicskei¹, Ildiko Pecs¹, Kinga Pozsonyi Ujfalusi¹, Elek Telek¹, Yin Li³, Jinnette Tolentino Collado⁴, Peter J. Tonge⁴, Stephen R. Meech⁵, Marten H. Vos², Eموke Bodis^{1,*}, and Andras Lukacs^{1,*}

From the ¹Department of Biophysics, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary; ²Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France; ³Department of Physics, School of Physics and Materials Science, Nanchang University, Nanchang City, China; ⁴Department of Chemistry, Stony Brook University, New York, USA; ⁵School of Chemistry, University of East Anglia, Norwich, UK

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Kirill Martemyanov

Photoactivated adenylate cyclases (PACs) are light activated enzymes that combine blue light sensing capacity with the ability to convert ATP to cAMP and pyrophosphate (PPi) in a light-dependent manner. In most of the known PACs blue light regulation is provided by a blue light sensing domain using flavin which undergoes a structural reorganization after blue-light absorption. This minor structural change then is translated toward the C-terminal of the protein, inducing a larger conformational change that results in the ATP conversion to cAMP. As cAMP is a key second messenger in numerous signal transduction pathways regulating various cellular functions, PACs are of great interest in optogenetic studies. The optimal optogenetic device must be “silent” in the dark and highly responsive upon light illumination. PAC from *Oscillatoria acuminata* is a very good candidate as its basal activity is very small in the dark and the conversion rates increase 20-fold upon light illumination. We studied the effect of replacing D67 to N, in the blue light using flavin domain. This mutation was found to accelerate the primary electron transfer process in the photosensing domain of the protein, as has been predicted. Furthermore, it resulted in a longer lived signaling state, which was formed with a lower quantum yield. Our studies show that the overall effects of the D67N mutation lead to a slightly higher conversion of ATP to cAMP, which points in the direction that by fine tuning the kinetic properties more responsive PACs and optogenetic devices can be generated.

The photoactivated adenylate cyclase (PAC) from the cyanobacterium *Oscillatoria acuminata* (OaPAC) is a recently discovered flavoprotein that translates a blue-light signal into the production of cAMP (1). OaPAC is a homodimer of a 366-aa protein comprising an N-terminal blue light using flavin (BLUF) (a blue-light using flavin adenine dinucleotide [FAD]) domain and a C-terminal class III adenylyl cyclase (AC)

domain. The AC activity of OaPAC is stimulated by light up to 20-fold above basal levels in the dark (1).

Blue-light regulation of the majority of the PAC proteins is achieved by a BLUF domain. BLUF domains act as light sensing modules and are involved in a large range of light-controlled biological processes like bacteriochlorophyll biosynthesis, biofilm formation, phototaxis, and controlling levels of cyclic-AMP (2–8). Despite the diversity in the function of BLUF domains, the photosensing mechanism is similar—blue-light absorption by the FAD chromophore leads to a rearrangement of the hydrogen bonding network, which is reflected in a red-shift of ~10 nm of the S₀–S₁ flavin transition (8).

The photoinduced mechanism of the BLUF domain is driven by the photochemistry of FAD—after blue light excitation, the flavin attracts an electron from the neighboring electron-rich amino acids like tryptophans or tyrosines (9–11). After the electron transfer step, either the anionic (FAD^{•-}) or the neutral (FADH[•]) flavin radical is formed depending on the flavin environment. A similar process is crucial in the function of cryptochromes, where excitation of the oxidized flavin leads to electron transfer from the neighboring tryptophan, forming the anionic flavin radical followed by protonation (on the microsecond timescale) to yield a semiquinone flavin radical form (12–16). However, the actual role of electron transfer in BLUF domain proteins is still under debate, as it was not observed in activation of photopigment and PUC A protein (AppA) (17), BIsA (18), or BlrB (7), but was found to be crucial in PixD (5, 19) and PapB (20).

In the OaPAC BLUF domain (Fig. 1) a concerted proton-coupled electron transfer (PCET) process takes place: upon excitation of FAD an electron is transferred from a nearby tyrosine (Y6) to the flavin while simultaneously a proton is transferred from Y6 to the adjacent glutamine (Q48) and later to the flavin. Aside the involvement in the PCET process Q48 plays a central role in the photoactivation and the function of the protein as it is thought to tautomerize after the light excitation of flavin. Tautomerization of the glutamine was first

* For correspondence: Andras Lukacs, andras.lukacs@aok.pte.hu; Eموke Bodis, emoke.bodis@aok.pte.hu.

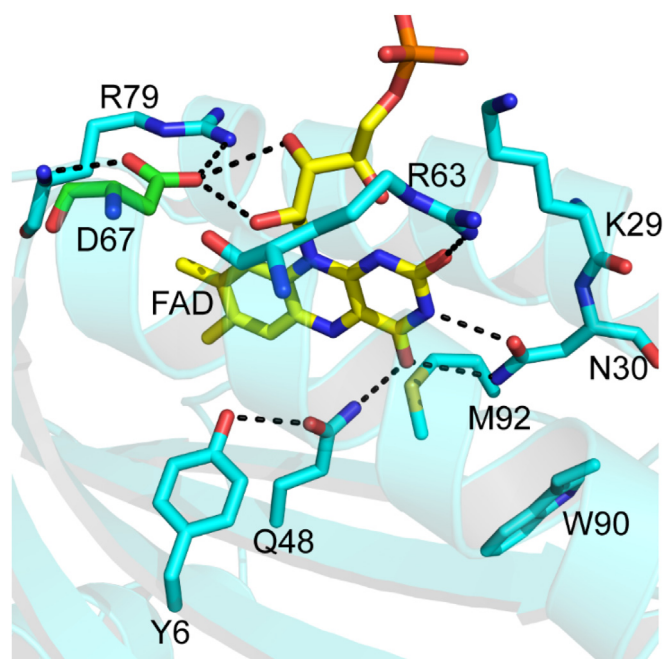


Figure 1. Environment of FAD in OaPAC including the Y6, D67, Q48, and W90 amino acids, involved in the photophysics of OaPAC (PDB: 4yus). Y6 is the primary electron donor, but W90 can donate an electron as well. Q48 is crucial in the propagation of the signal from the BLUF domain toward the AC domain. D67 is in hydrogen bonding distance to R79 (~ 3 Å) residue and to the ribityl chain (~ 3.2 Å) of flavin. D67 is a hydrogen bond acceptor and mutating D67 to N, a neutral amino acid, modulates the electrostatic potential of flavin by altering the hydrogen bonding network. AC, adenylate cyclase; BLUF, blue light using flavin; FAD, flavin adenine dinucleotide; OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*; PDB, Protein Data Bank.

proposed for AppA (21–28) but later was proven to be present in PixD (29–31) as well. Based on these findings, it is a plausible assumption that during the PCET process Q48 tautomerizes, and this step is expected to be crucial in transmitting the signal to the C-terminal part of the protein where ATP is converted to cAMP. The role of Q48 should be further studied as it is expected to play a central role in the photoactivation and the overall function of OaPAC.

PACs are important for applications in the life sciences as the light-controlled cAMP production is a promising optogenetic tool: EuPAC was expressed in the neurons of the marine gastropod *Aplysia* enabling photocontrol of neuron stimulation (32), and bPAC was utilized in transgenic mice in light-controlled flagellar beat of sperms (33). The latter has a 300-fold increase in cAMP conversion activity compared to OaPAC which has around a 20-fold activity increase (1, 34). It is therefore important to enhance control of the cyclase activity of OaPAC. In this work, we investigated the functional dynamics of D67N mutant OaPAC, which shows an ~ 1.5 -fold increase in light-induced AC activity of OaPAC as well as an acceleration of the forward and backward electron transfer processes and a decrease of the dark state recovery rate in the BLUF domain. The mutation slightly elevated the activity of the enzyme in the dark-adapted state as well, which points to a structural change extending to the enzymatic domain.

Results and discussion

Transient absorption measurements

Previously, ultrafast transient infrared and visible absorption spectroscopy were employed to investigate the photochemistry of OaPAC and it was established that after absorption of blue light by the flavin, a PCET takes place (35). During the PCET process, the primary electron donor is the conserved Y6 tyrosine (35). Photoexcitation of the flavin leads to the extraction of an electron from the tyrosine accompanied by the transfer of a proton from the same tyrosine resulting in the formation of neutral (36) tyrosine and flavin radicals. In our previous work, we demonstrated that the AC activity of OaPAC is linked to this PCET process: as the pK_a of the crucial tyrosine (Y6) was lowered from 9.9 to <7.7 , the photocycle was halted at $FAD^{\bullet-}$ and no enzymatic activity was observed (35).

Adiabatic quantum mechanical/molecular mechanical simulations performed on Slr1694 (also called PixD), another intensively studied (5, 19, 37) BLUF domain protein, suggested that the replacement of the negatively charged aspartic acid D69 (D67 in OaPAC, Fig. 1) with a neutral or a positively charged residue will dramatically affect the electron transfer process (38). It was predicted that such mutations may demonstrate vastly different photocycle kinetics (38). Thus, here we investigate experimentally the potential effect of an analogous mutation on the photoactivation mechanism of OaPAC and measure the resulting enzymatic activity of the AC domain.

The primary photochemistry of the D67N mutant was characterized using transient absorption (TA) measurements. Ultrafast TA spectroscopy is a powerful method to characterize the electron transfer processes in flavoproteins (4, 5, 7, 10, 14, 39–43). Depending on the protein environment the flavin chromophore can exist in five different redox states (44), and these redox states possess distinct absorption spectra (Fig. S1A). Using these spectra one can perform spectral modeling in order to identify the flavin and amino acid radical species detected at different time delays after excitation (10, 14, 45, 46).

The TA spectra of D67N OaPAC measured at early time delays (Fig. 2A) are similar to those of other (oxidized) flavoproteins (10, 22), including WT OaPAC (35): an intense negative peak (bleach) is observed around 450 nm, which reflects disappearance of the $S_0 \rightarrow S_1$ absorption of the flavin. The positive peak around 510 nm is attributed to the absorption of the excited state, whereas the negative broad peak ~ 550 nm observed at the early time delays can be assigned to the stimulated emission of the flavin. The TA data for the WT protein could be globally fitted with three different time constants (35), 5 ps, 83 ps, and an infinite value (also called final state). Analysis of the corresponding evolutionary-associated spectra (EAS) indicated that the 5-ps component reflects FAD^* decay. The 83-ps component reflects decay of both FAD^* and formation of $FADH^{\bullet}$. The FAD^* decay kinetics, by electron and proton transfer to the flavin, are thus dispersive (see fluorescence kinetics below) and the slower phases cannot be kinetically disentangled from that of the formation and decay of the $FADH^{\bullet}$ intermediate state. The final state represents the red-shifted

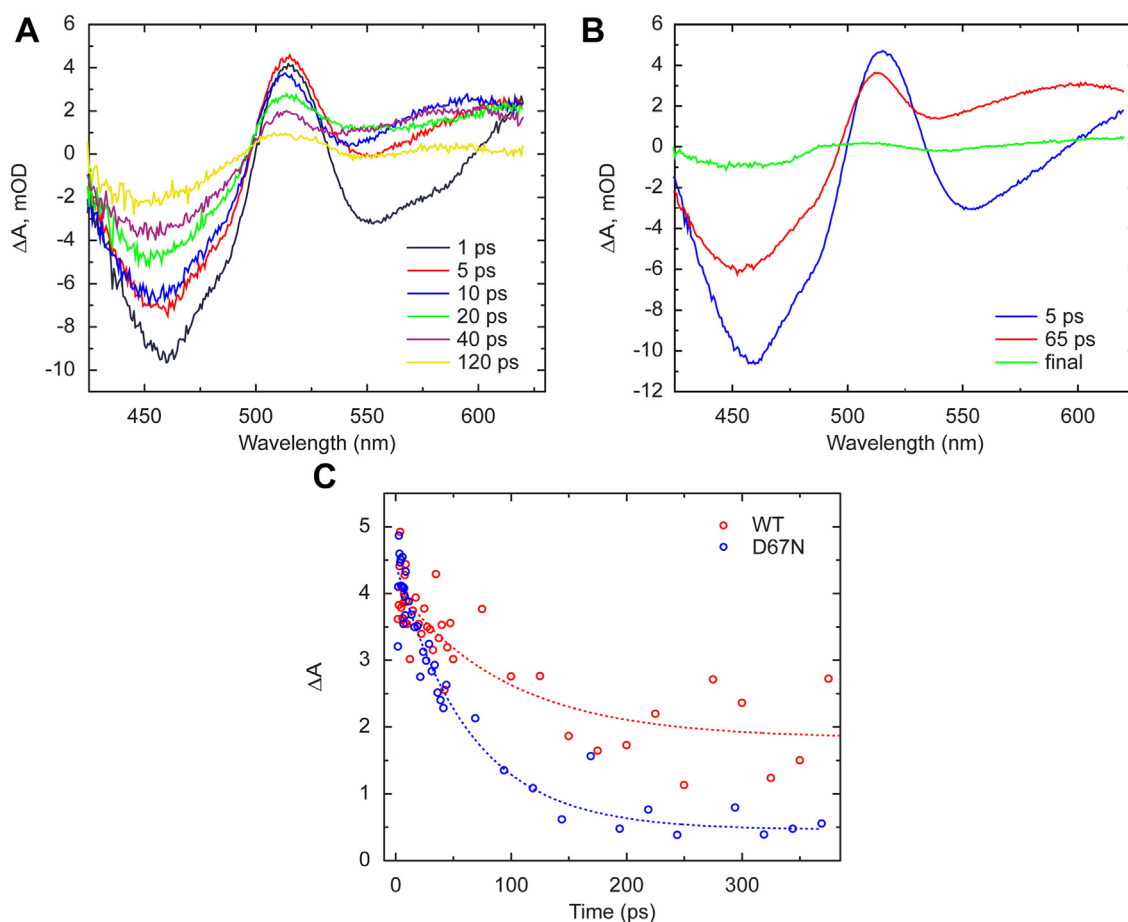


Figure 2. Ultrafast transient absorption spectroscopy measurements. A, transient absorption measurements on the D67N mutant at indicated time delays B, EAS spectra obtained after global analysis. The time constants show that the excited state of FAD, formed right after excitation, decays in 5 ps to the next state which shows the presence of the neutral flavin radical. The final state is dominated by the signaling state and exist longer than the window of the measurement C, individual kinetics of the WT and D67N OaPAC measured at 505 nm. Applying a monoexponential fit the time constants for the WT and D67N were 90 ± 30 ps and 64 ± 8 ps, respectively. EAS, evolutionary-associated spectra; FAD, flavin adenine dinucleotide; OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*.

FADox signaling state. Similarly to the WT measurements, the TA data of D67N was also globally fitted with three different time constants (Fig. 2B) of 5 ps, 65 ps, and infinite. The 5-ps EAS ascribed to FAD* decay resembles the 5 ps EAS of WT and EAS2 (65 ps phase for D67N) was equally modeled as a combination of the spectra of the excited flavin and the neutral flavin radical (Fig. S1B). The 5 ps component thus reflects the formation of the neutral flavin radical and the 65 ps component reflects the relaxation of the radical state (Fig. S2). Yet, the relative contribution of FAD* to EAS2 appears smaller for D67N (~75% in WT and ~60% in D67N), indicating also dispersive but faster overall FAD* decay (see also below). In addition, the second time constant is somewhat shorter in the mutant (65 ps versus 85 ps) which also suggests a faster recombination of the radical pair. In WT OaPAC (35) the ~510 nm peak shifts toward 480 nm in ~80 ps; this shift is due to the formation of the signaling state. A similar shift is observed in D67N OaPAC mutant, but the amplitude of the final state EAS is smaller in the mutant compared to WT (Fig. S3). Along with the finding that the spectrum of the signaling state is similar in WT and D67N OaPAC (Fig. 5A below), this indicates lower quantum yield of formation of the signaling state. Based on the amplitude ratios of

the final state and the initially formed FAD* difference spectra (EAS final and 5-ps in Fig. S3) we estimate that the signaling state QY is ~4-fold lower in D67N than in WT OaPAC.

Observing the kinetics of the excited state absorption peak of the flavin (~505 nm) the mutant's relaxation appears slightly faster compared to WT (Fig. 2C); applying a monoexponential fit the time constants for the WT and D67N were 90 ± 30 ps and 64 ± 8 ps, respectively. This is due to faster FAD* decay kinetics (see below) as well as to the lower asymptotic value at this wavelength due to lower signaling state formation. The faster FAD* decay is in good agreement with the theoretical expectation that the replacement of the aspartic acid with a neutral or even positively charged amino acid will accelerate the electron transfer process as it alters the active site potential (38).

Ultrafast transient fluorescence spectroscopy experiments

To gain further information on the impact of D67N on the electron transfer process in OaPAC, we performed ultrafast transient fluorescence measurements on our home-built Kerr-gated fluorescence setup (47). The advantage of using the Kerr-gate approach compared to fluorescence upconversion is

Single mutation increases enzymatic activity of a PAC

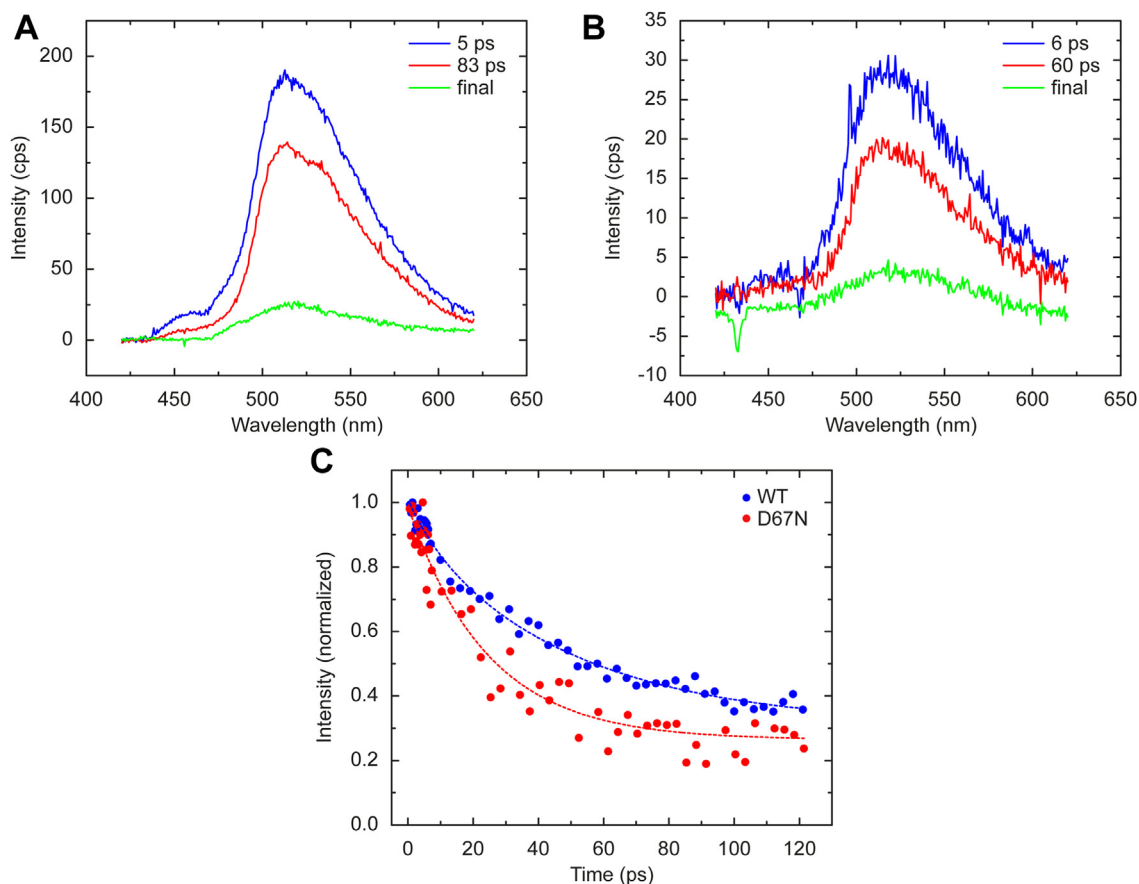


Figure 3. Ultrafast transient fluorescence spectroscopy measurements. *A*, EAS spectra obtained by global analysis of the transient fluorescence data of WT. The result of the global fit shows a heterogeneous decay of the flavin. *B*, EAS spectra obtained by global analysis of the transient fluorescence data of the D67N mutant. *C*, individual kinetics of the fluorescence decay observed at 513 nm. Using a monoexponential fit, we obtained a fluorescence lifetime of 40 ± 2 ps for WT and 25 ± 2 ps for D67N. EAS, evolutionary-associated spectra.

that the fluorescence emission spectrum can be obtained at every time delay whereas in the fluorescence upconversion method the decay of the fluorescent intensity is measured at

one certain wavelength. **Figure 3**, *A* and *B*) show the EAS spectra obtained from the global fitting of the transient fluorescence dataset. The maximum of the fluorescence emission

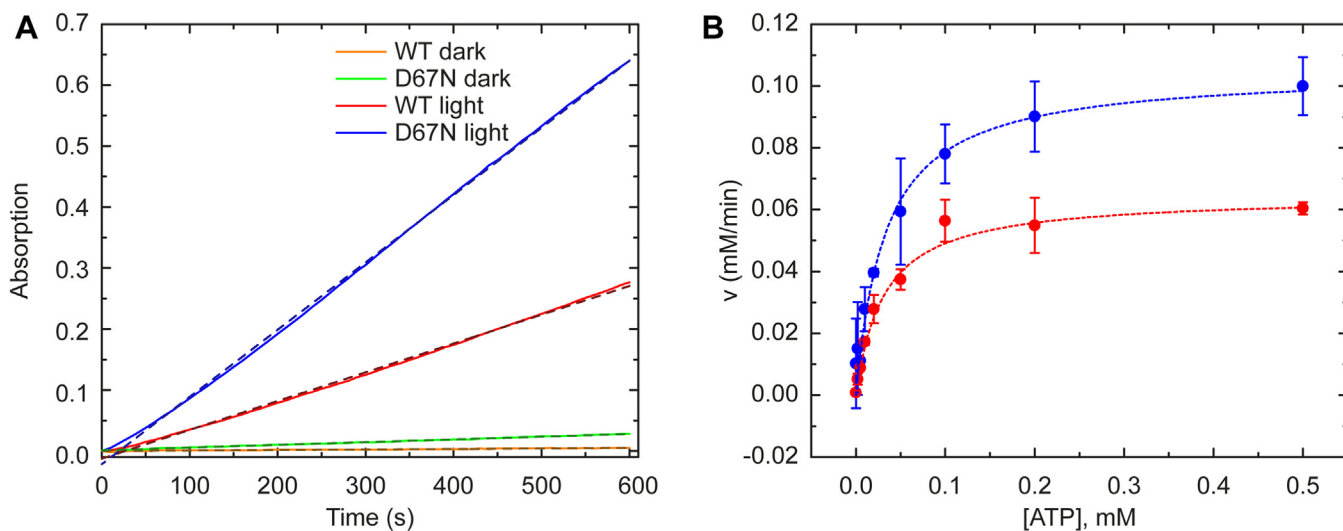


Figure 4. Enzymatic activity of WT and D67N OaPAC. *A*, the kinetics of ATP conversion in the dark- and light-adapted state of WT and D67N OaPAC. In the dark, the ATP conversion rate is slightly higher in the D67N mutant (green) than in WT (orange). In the light-adapted state at 0.5 mM ATP the speed of the conversion was higher in the case of the mutant (blue) than in WT (red). *B*, Michaelis-Menten plot of the enzymatic activity of WT (red) and D67N (blue) under irradiation, v_{\max} is increased in the D67N mutant. OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*.

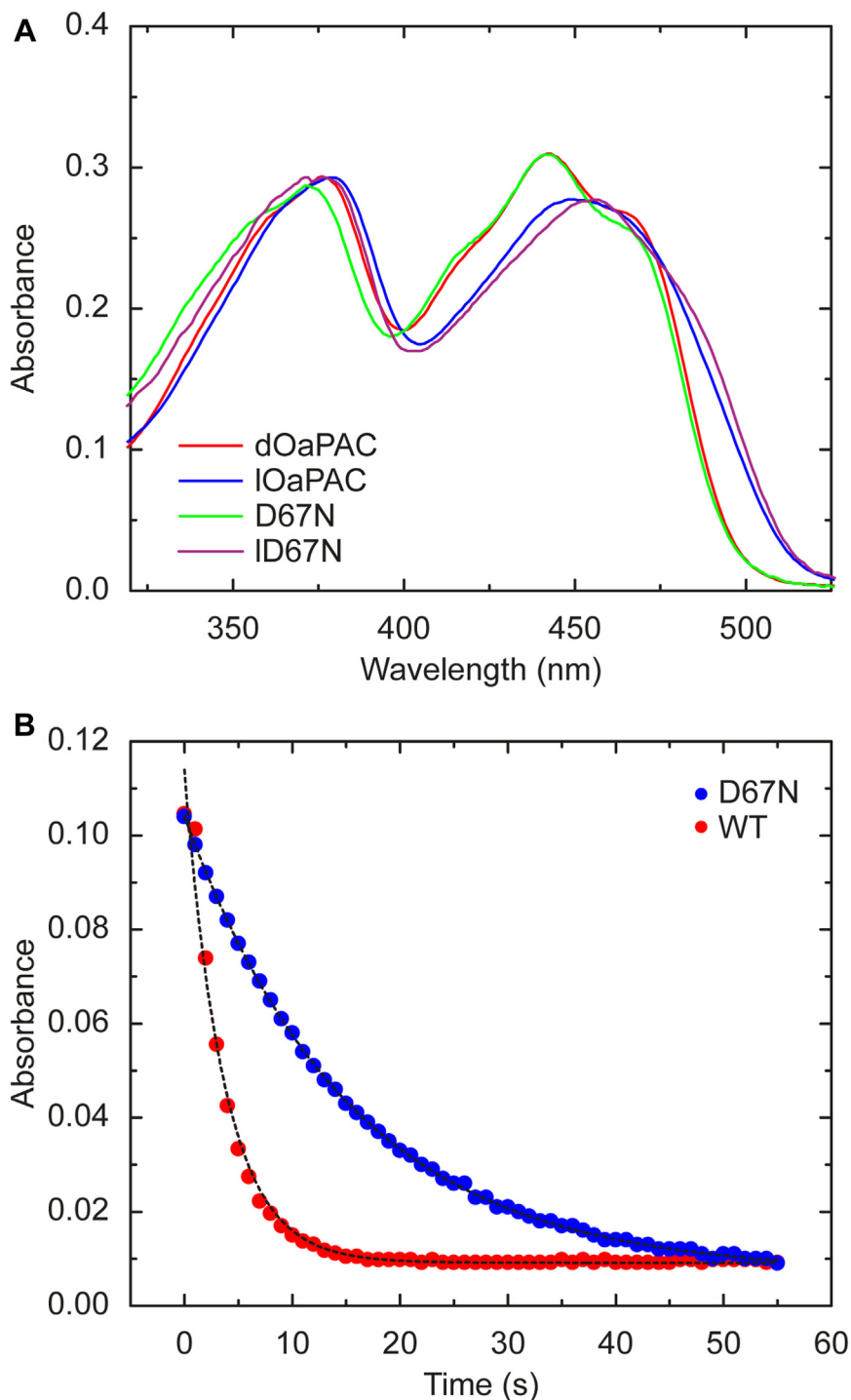


Figure 5. Dark state recovery of WT and D67N OaPAC. *A*, absorption spectra of WT and D67N OaPAC in dark and light state. The absorption spectra of WT and the mutant are very similar in the dark adapted state: the peak of the S_0 - S_1 transition is the same for both proteins with a maximum at 442 nm; a 4 nm blue shift of the S_0 - S_2 transition is observed for the mutant (376 nm for the WT and 372 nm for the mutant). In light-adapted state the S_0 - S_1 peak shifts to 452 nm in WT and to 456 nm in the mutant. The S_0 - S_2 peak shifts from 376 nm to 379 nm in the WT, and from 372 nm to 376 nm in the mutant. *B*, recovery kinetics of WT (red) and D67N (blue) OaPAC, measured at 490 nm. The time constant of dark state recovery is 3.6 s for WT and 15.3 s for D67N. OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*.

is at ~ 513 nm, which is slightly higher than that observed in AppA BLUF (48) (~ 500 nm) and significantly lower than of the free flavin (~ 530 nm). The fluorescence emission spectrum indicates that the flavin is embedded in a nonsurface exposed environment. There is no significant difference between the

emission maxima of WT and mutant OaPAC, suggesting that the mutation did not result in significant change of the flavin environment.

The fluorescence of WT OaPAC, which was not reported before, was found to be highly dispersive as was

Single mutation increases enzymatic activity of a PAC

observed in the case of AppA (6). The transient fluorescence dataset could be well described with the same three lifetimes (5 ps, 83 ps, and infinite) as retrieved in the TA experiments. The corresponding EAS (species-associated spectra assuming a sequential scheme (1→2→3)) all peaked at ~ 513 nm, implying that they arise from protein-bound flavin, as the fluorescence emission maximum of free flavin is ~ 530 nm.

A global fit also resolved three components for the D67N mutant (5 ps, 60 ps, infinite, Fig. 3B), again with a shorter second time constants compared to the WT protein. The kinetic traces observed at 513 nm were overlaid (Fig. 3C) to compare the decay of the fluorescence emission of WT and D67N. The time constant of the excited state relaxation in D67N is almost half compared to that observed in the WT protein. This assessment, which is not complicated by contributions of product states as in TA experiments, unambiguously demonstrates that overall electron transfer is faster in D67N OaPAC mutant. Yet, as shown above, this modestly faster initial electron transfer does not lead to a higher yield of the signaling state, presumably due to strongly enhanced back PCET from FADH^{*} to the resting dark state (49).

It is worth mentioning that the aspartate to asparagine mutation was suggested for PixD where the authors expected that the mutation would enhance significantly the electron transfer kinetics (38). We performed this homologous mutation in PixD (D69N) and it also resulted in faster fluorescence decay and shorter time constants (Figs. S4 and S5). We also performed TA measurements on PixD WT and D69N and we observed a similar shortening of the time constant of EAS2 (Fig. S6).

Indirect measurement of cAMP

An enzymatic assay was employed to examine the impact of accelerating the electron transfer process in the D67N mutant blue light sensing domain on the ability of the AC domain to convert ATP to cAMP plus pyrophosphate. The adenylate cyclase activities of 1 μ M of WT OaPAC and D67N OaPAC were monitored using a spectrophotometric assay that detects pyrophosphate released by OaPAC when it converts ATP to cAMP. The inorganic pyrophosphatase enzyme converts pyrophosphate into two equivalents of phosphate which is then consumed by the 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine riboside/purine nucleoside phosphorylase reaction and detected by an increase in absorbance at 360 nm. Figure 4A shows the dark and the light-induced enzymatic activity of WT OaPAC and D67N mutant OaPAC in the presence of 500 μ M ATP. In the dark, the enzymatic activity of the mutant is slightly higher than WT but still very low. Upon illumination the conversion rates strongly increased for WT and the D67N mutant. However, D67N mutant converts ATP at a higher rate than WT making this mutant a starting point for tuning PACs as optogenetic tool.

The enzymatic assays were performed using increasing amount of substrate and the results were evaluated using the classical Michaelis–Menten presentation (Fig. 4B). The enzymatic assays show an elevated cAMP production in D67N

Table 1
Kinetic parameters for WT OaPAC and D67N mutant

Parameters	WT OaPAC	D67N mutant
v_{\max}	0.064 ± 0.007 mM/min	0.100 ± 0.002 mM/min
k_{cat}	32.2 1/min	50.05 1/min
K_M	0.031 ± 0.001 mM	0.041 ± 0.005 mM
Dark state recovery	3.6 s	15.3 s
Excited state relaxation	90 ± 30 ps	64 ± 8 ps
Fluorescence lifetime	40 ± 2 ps	25 ± 2 ps
T_m	68.1 °C	62.1 °C
ΔH	0.078 J/g	0.069 J/g
Kd	2.2 ± 0.4 mM	7.7 ± 1.6 mM

OaPAC: the maximal velocity of the conversion rate was ~ 1.5 times higher in the mutant (0.100 ± 0.002 mM/min) than in WT (0.064 ± 0.007 mM/min). The concentration of half-maximal velocity (K_M) is also slightly higher in the mutant than in WT—but more importantly the catalytic constant (k_{cat})—which gives the number of substrate molecule each enzyme site can convert to product per unit time is ~ 1.5 times higher in D67N (50.05 1/min) than the WT OaPAC (32.2 1/min) (see Table 1).

Recovery experiments

The electronic spectrum of the mutant shows the typical red shift of the S_0 – S_1 absorption peak (from 442 nm to 455 nm) after blue light irradiation, resembling WT OaPAC and other BLUF domain proteins (Fig. 5A). We measured the dark state recovery of WT and D67N OaPAC to connect the photochemistry of the BLUF domain with the functional dynamics of the AC domain. Light to dark recovery of BLUF domains spans from dozens of minutes to a few seconds. In AppA the photocycle is relatively long, with a recovery lifetime of ~ 25 min (50), in PixD it is substantially shorter (~ 26 s) (8, 19) and in OaPAC it is only a couple of seconds (35). The dark state recovery of D67N mutant and WT OaPAC were monitored at 490 nm and the recovery rate of the mutant is ~ 5 times lower (15.3 s) than the recovery rate of WT OaPAC (3.6 s) (Fig. 5B). This significant change points to a possible structural difference between the mutant and the native protein. The slower recovery of D67N implies that after light excitation the protein spends more time in a structure allowing high-rate cAMP conversion. Altogether, the mutant adopts a structure that is not only more favorable for ATP to cAMP conversion but also slows down the rearrangement to the original structure.

Differential scanning calorimetry measurements

The difference in the enzymatic activity and the dark state recovery suggests that the introduced mutation has changed the overall protein structure. To test this hypothesis, we performed differential scanning calorimetry (DSC) experiments on both proteins to examine their thermostability. These measurements reveal a significant difference between mutant and WT OaPAC. The thermal denaturation of WT showed a steep endothermic unfolding with a T_m of 68.1 °C and a ΔH of 0.078 J/g. The measurement of D67N resulted in a lower T_m (62.1 °C) with a lower ΔH (0.069 J/g). The melting temperature (T_m) is where 50% of the protein is denatured, while the area under the curve reflects the required energy for protein unfolding associated

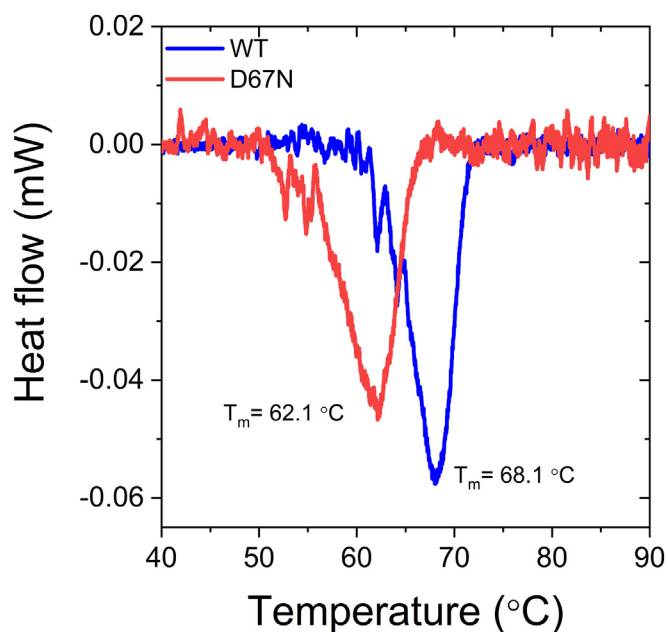


Figure 6. Thermal unfolding of WT and mutant (D67N) OaPAC measured by DSC. The DSC curve of the WT shows a steep endothermic unfolding with a melting temperature of 6 °C higher than of the mutant. This points to a more stable or packed structure of the WT protein as denaturing starts at lower temperature in the case of the mutant. DSC, differential scanning calorimetry; OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*.

with the enthalpy change (ΔH). The smaller ΔH of D67N indicates a less compact conformation of the D67N mutant. This is also reflected by the considerably (6 °C) lower T_m value

(Fig. 6). This observation suggests that this structural change is at the origin of the elevated activity of D67N OaPAC.

Fluorescence anisotropy-based nucleotide-binding assays

It is not known what the affinity of ATP is in the dark- or light-adapted state of the protein. Therefore, using fluorescence anisotropy-based nucleotide-binding assays we measured the binding affinity (K_D) of a fluorescently labeled ATP analog (2'-(or-3')-O-(N-methylanthraniloyl) adenosine 5'-triphosphate, trisodium salt [MANT ATP]) for the WT and D67N mutant. Fluorescence anisotropy provides a sensitive tool to measure the binding of ligands to proteins when a fluorophore is attached to the ligand (36). Changes in the anisotropy are caused by changes in the mobility of the fluorophore. The addition of OaPAC protein or mutant to MANT-ATP increases the fluorescence anisotropy of the N-methylanthraniloyl (the labeled part of MANT-ATP) as binding of MANT-ATP to OaPAC results in an increase in the volume of the labeled entity and hence slows down its rotational movement. MANT-ATP was excited at $\lambda_{exc} = 350$ nm, and the fluorescence anisotropy was detected at 450 nm with increasing concentrations of OaPAC. It should be noted that the flavin in OaPAC emits > 500 nm and therefore there is no contribution from the flavin emission in the anisotropy measurements. The affinity (K_D) for MANT-ATP was determined to be 2.2 ± 0.4 mM for WT and 7.7 ± 1.6 mM for the mutant (Fig. 7). The lower affinity found in the case of the mutant generally aligns with the conclusion that the mutation induces a structural change—as observed in the DSC measurements—

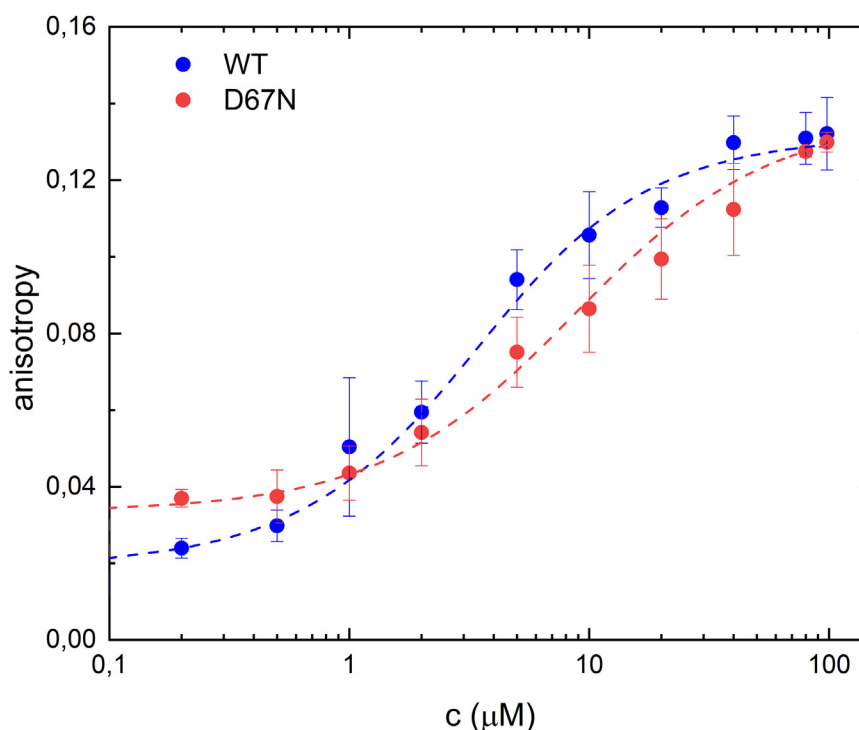


Figure 7. Fluorescence anisotropy measurement of MANT-ATP nucleotide in WT and D67N OaPAC as a function of protein concentration at fixed (1 μ M) MANT-ATP concentration. As the concentration of protein is increasing, the population of bound nucleotide will also increase resulting in higher fluorescence anisotropy. The obtained binding affinity from the fit was 2.2 ± 0.4 μ M in WT and 7.7 ± 1.6 μ M in D67N. MANT, 2'-(or-3')-O-(N-methylanthraniloyl) adenosine 5'-triphosphate, trisodium salt; OaPAC, photoactivated adenylate cyclase from *Oscillatoria acuminata*.

Single mutation increases enzymatic activity of a PAC

which affected the binding affinity of ATP as well as the yield of the cAMP production.

Concluding remarks

The D67N mutant, which was predicted to change the photocycle kinetics, was made in OaPAC. Based on the crystal structure of OaPAC, D67 is in hydrogen bonding distance to R79 (~ 3 Å) residue and to the ribityl chain (~ 3.2 Å) of flavin. D67 is a hydrogen bond acceptor and mutating D67 to N, a neutral amino acid, modulates the electrostatic potential of flavin by altering the hydrogen bonding network. According to Goings *et al.* (38) the electrostatic potential at the center of flavin can be modulated by either moving positive charge toward the ring or moving negative charge away from the ring. In PixD, the Asp69–Arg71 pair is a good example of residues hydrogen bond to each other that have opposite effects on the active site potential. According to the quantum mechanics/molecular mechanics study done by Goings *et al.* (38), when the Asp69–Arg71 pair moves closer to the flavin ring, the negatively charged Asp69 destabilizes charge transfer, whereas the positively charged Arg71 stabilizes charge transfer, and vice versa. When D67 is mutated to N the hydrogen bond length between the side chain of N67 and the ribityl chain of flavin is expected to increase, potentially favoring charge transfer.

Our ultrafast transient fluorescence measurements demonstrated that the overall kinetics of forward electron transfer was significantly faster in the mutant compared to WT, in qualitative agreement with the predictions of Goings *et al.* (38). The TA measurements also demonstrated ~ 4 -fold weaker signaling state quantum yield, reflecting a much stronger acceleration of the back reaction competing with formation of the signaling state due to the mutation. A third kinetic effect of the mutation is the ~ 5 -fold deceleration of the recovery of the dark state. Overall, these counterbalancing effects lead to \sim similar acceleration of the enzymatic rate in WT and D67N OaPAC. However, as the basal activity of D67N OaPAC is somewhat higher than that of WT, the maximal enzymatic velocity k_{cat} in the light state is ~ 1.5 higher in the mutant than in WT. This makes this mutant a better potential optogenetic tool as the basal activities are still low but the light-activated cAMP production is higher than in the native protein.

Upon excitation, the D67N mutant spends longer in the structure favoring the ATP to cAMP conversion. This suggests that the enzymatic activity is increased as the protein spends more in the signaling state despite its lower quantum yield. Our calorimetry measurements showed that the melting temperature is considerably lower than observed in WT, indicating that the D67N mutant unfolds more easily. Hence, the mutant protein seems to possess a less compact structure than WT. The binding experiments also pointed to an altered enzymatic domain structure as WT OaPAC binds ATP slightly more strongly than the mutant.

Overall, future studies aiming at further tuning the relevant kinetic rates may provide a good road to increase the enzymatic activity of PACs.

Experimental procedures

Expression and purification of full-length WT and D76N mutant OaPAC

The D67N mutation was generated with Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) using WT full OaPAC/pCold-I as a template. The mutated construct was verified by DNA sequencing. The full WT or D67N OaPAC/pCold-I construct was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and grown on an LB-agar plate containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin. A single colony was used to inoculate 10 ml 2 \times -YT medium (Fisher Bioreagents, BP9743-5) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin that was shaken overnight at 37 °C (250 RPM). The 10 ml culture was used to inoculate 1 l of 2 \times -YT medium. The culture was shaken at 37 °C (250 RPM) until the A_{600} reached ~ 0.8 . The temperature was lowered to 18 °C, and following 30 min incubation the protein expression was induced by adding 1 mM IPTG. After 18 h of induction in the dark the cells were harvested by centrifugation and the cell pellet was stored at -20 °C until needed. The cell pellet containing WT or D76N mutant OaPAC was thawed and resuspended in resuspension buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mg/ml phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1 mg/ml lysozyme, 0.5 mg/ml DNase, Pierce Protease inhibitor tablet (1 tablet/50 ml, Thermo Fisher Scientific)). The resuspended cells were disrupted and lysed by sonication at 4 °C. The cell debris was removed by ultracentrifugation at 30,000 RPM for 80 min at 4 °C. The supernatant was loaded onto a Ni-NTA column equilibrated with resuspension buffer. The column was washed with 60 ml of resuspension buffer containing 5 mM imidazole, and then the protein was eluted using resuspension buffer containing 500 mM imidazole. Buffer content of the eluate was immediately exchanged to 20 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.0, 20 mM MgCl₂ using an Econo-Pac 10 G desalting column. The protein was further purified with Superdex 200 column chromatography. Protein purity and yield were determined using SDS-PAGE and UV-visible spectroscopy.

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 and allows measuring fluorescence spectra with a temporal resolution down to ~ 100 fs and up to the nanoseconds timescale. The setup was described elsewhere (47). Briefly, the excitation pulse centered at 390 nm is obtained by frequency-doubling, using a beta barium borate crystal, part of the 780 nm pulse 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 CS₂ (response function width ~ 1.2 ps). The sample was flowed through the 1 mm pathlength optical cell using a peristaltic pump. Transient fluorescence spectra were measured with time delays 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 a decay-associated spectrum (51), was performed using Glotaran (52).

Ultrafast TA measurements

Transient visible spectra were recorded with 100 fs temporal resolution by a TA spectrometer applying ~ 800 μJ laser pulses centered at 800 nm at a repetition rate of 1 kHz. Ultrashort 100 fs pulses were obtained from a Spitfire Ace (Ti:sapphire) regenerative amplifier seeded by a femtosecond Mai Tai mode-locked (Ti:sapphire) laser oscillator and pumped by an Empower 45 multi-kilohertz, intracavity-doubled, green (Nd:YLF) pump laser. The output of the amplifier was split in the ratio 1:9 to build the so-called pump–probe arrangement. The higher energy pulses served to produce, in a BBO crystal, the second harmonic generation 400 nm pump pulses from the 800 nm output of the regenerative amplifier and were attenuated to ~ 200 to 400 nJ/pulse before reaching to the sample. The probe arm was provided by the lesser energy laser pulses *via* white continuum generation in a rastered CaF_2 crystal. The pump and probe pulses were spatially overlapped in the sample and the polarization of the probe was again set to magic angle compared to excitation. To avoid photo-degradation, the cuvette was moved with the help of a homemade Lissajous scanner, simultaneously flowed by a peristaltic pump and kept at 12 °C temperature during the whole measurement. A Newport (IMS Series High-Performance Long Travel Linear Stages 600 PP) delay stage was placed in the beam path of the pump pulse to adjust the different pump-probe time delays. Exciting pulses were chopped by a Thorlabs MC2000 optical chopper (to half of the output repetition rate) to generate “pump ON” and “pump OFF” states of the sample. Absorption spectra were recorded by an Andor Newton CCD operating at -80 °C. Absorption data matrices were collected, and the absorption changes calculated, recorded, and stored by the home written NI LabVIEW (<https://www.ni.com/hu-hu/shop/labview.html>) (visual programming language) data acquisition and control software. The absorption changes were reported as pump on–pump off normalized difference spectra. The obtained data matrix was analyzed by the Glotaran software assuming a sequential scheme with EAS assigned to the obtained time constants.

cAMP yield measurement/adenylate cyclase activity

The ATP–cAMP conversion of WT and D67N mutant OaPAC was quantified using a pyrophosphate assay (EnzChek Pyrophosphate Assay Kit). This assay is based on the PPI-dependent increase of the absorption of 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine, which was monitored as a function of time at 360 nm. The reaction rate was determined from the slope of a linear fit using an extinction coefficient of 11,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 360 nm. From the slope of the change of the absorbance the reaction rate ($\mu\text{M/s}$) of the purine base product (2-amino-6-mercapto-7-methylpurine) was determined which

is the same as the reaction rate of pyrophosphate derived from ATP.

To determine the Michaelis–Menten constant, the assay was performed on in the presence of 0 to 500 μM concentrations of ATP using the same condition of the continuous illumination. The initial reaction rate at each ATP concentration was extracted from the linear part of A_{360} *versus* time plot. The resulting rate constants were plotted as a function of ATP concentration. Fitting a Michaelis–Menten saturation curve for the enzyme reaction, the maximum reaction rate (V_{max}), the concentration at the half of the maximum K_M as well as the k_{cat} —which is the number of ATP molecule each OaPAC converts to cAMP per unit time—were determined.

DSC measurements

DSC was performed to measure the thermal stability of the WT and D67N mutant OaPAC using a SETARAM Micro DSC-III calorimeter. The measurements were carried out in the range of 20 to 100 °C with a heating rate of 0.3 $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$. The sample (WT and D67N) and the reference (buffer) were balanced with a precision of ± 0.05 mg in order to avoid corrections for the heat capacity of the vessels. A second thermal scan of the denatured sample was measured for baseline correction. The melting temperature (T_m) of the thermal unfolding curves were analyzed by the OriginLab Origin2021 software (<https://www.originlab.com/>).

Fluorescence anisotropy-based nucleotide binding assays

Fluorescence anisotropy-based nucleotide binding assays were performed at room temperature using 2 μM MANT ATP. This is a hydrolyzable fluorescently labeled ATP, on excitation at 350 nm, emits at ~ 450 nm. Steady-state fluorescence anisotropy measurements were performed with a Fluorolog Jobin Yvon Horiba spectrofluorometer in L-format configuration equipped with a polarization accessory. The measurements were performed at an excitation wavelength of $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm with a vertical polarization filter and by measuring the emission at 450 nm (average of 30 measurements on the same sample) with the polarization filter both parallel and perpendicular with respect to the excitation light polarization. Fluorescence anisotropies were calculated from the fluorescence intensities detected according to the Equation 1.

$$r = \frac{I_{\text{perp/perp}} - G(\lambda)I_{\text{perp/par}}}{I_{\text{perp/perp}} + 2G(\lambda)I_{\text{perp/par}}} \quad (1)$$

where r is the fluorescence anisotropy, $I_{\text{perp/perp}}$ is the fluorescence emission intensity detected with vertical polarization, $I_{\text{perp/par}}$ is the fluorescence emission intensity detected with vertical polarization on the excitation and horizontal polarization on the emission, and $G(\lambda)$ is the correction factor experimentally determined measuring the ratio $I_{\text{perp}}/I_{\text{par}}$ with a horizontally polarized excitation. Data processing was done using Origin 2020 software (OriginLab, <https://www.originlab.com/>) and

Single mutation increases enzymatic activity of a PAC

K_D values were determined by fitting to a quadratic binding equation.

$$\frac{r-r_A}{r_{AT}-r_A} = \frac{A_0+T_0+K_D - \sqrt{(A_0+T_0+K_D)^2 - 4 \cdot A_0 \cdot T_0}}{2} \quad (2)$$

where A_0 and T_0 are the total MANT-ATP/cAMP and OaPAC concentrations respectively, r_A is the steady-state anisotropy of MANT-ATP/cAMP, r_{AT} is the steady-state anisotropy of MANT-ATP/cAMP at a saturating amount of OaPAC and K_D is the dissociation equilibrium constant of the MANT-ATP/cAMP-OaPAC complex.

Data availability

Data are available in the [Supporting information](#). All remaining data are contained in the article.

Supporting information—This article contains supporting information (38, 53–55).

Author contributions—K. R., K. P., B. Z., Z. F., N. K.-B., I. P., K. P. U., E. T., J. T. C., M. H. V., E. B., and A. L. investigation; K. R., B. Z., and E. B. data analysis; Z. F., N. K.-B., and I. P., methodology; J. T. C. visualization; P. J. T., S. R. M., and A. L. conceptualization; P. J. T., S. R. M., M. H. V. and A. L. writing—original draft.

Funding and additional information—J. T. C. was supported by the National Institutes of Health IMSD-MERGE (T32GM135746) and NY-CAPs IRACDA (K12-GM102778) Programs at Stony Brook University. B. Z. was supported by a PhD scholarship from the Chinese scholarship Council. A. L. acknowledges funding from the Hungarian National Research and Innovation Office (K-137557) and was supported by PTE ÁOK-KA-2021. This study was supported by the National Science Foundation (NSF) (MCB-1817837 to P. J. T.) and the EPSRC (EP/N033647/1 to S. R. M.). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: AC, adenylate cyclase; BLUF, blue light sensing using FAD; DSC, differential scanning calorimetry; EAS, evolutionary-associated spectra; FAD, flavin adenine dinucleotide; MANT, 2'-(or-3')-O-(N-methylanthraniloyl) adenosine 5'-triphosphate, trisodium salt; PCET, proton-coupled electron transfer process; TA, transient absorption.

References

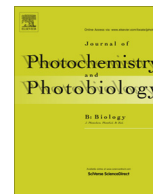
- Ohki, M., Sugiyama, K., Kawai, F., Matsunaga, S., Iseki, M., and Park, S. (2016) Structural basis for photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase from the photosynthetic cyanobacterium *Oscillatoria acuminata*. *Acta Crystallogr. A Found. Adv.* **72**, S251
- Anderson, S., Dragnea, V., Masuda, S., Ybe, J., Moffat, K., and Bauer, C. (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **44**, 7998–8005
- Masuda, S., Hasegawa, K., Ishii, A., and Ono, T. A. (2004) Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry* **43**, 5304–5313
- Bonetti, C., Mathes, T., van Stokkum, I., van Grondelle, R., Groot, M., Hegemann, P., et al. (2007) The light activation mechanism of a novel blue-light photoreceptor. *Biophys. J* **92**, 337A–337A
- Bonetti, C., Stierl, M., Mathes, T., van Stokkum, I., Mullen, K., Cohen-Stuart, T., et al. (2009) The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the *Synechocystis* Slr1694 BLUF domain. *Biochemistry* **48**, 11458–11469
- Gauden, M., Yerenenko, S., Laan, W., van Stokkum, I., Ihalainen, J., van Grondelle, R., et al. (2005) Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* **44**, 3653–3662
- Mathes, T., van Stokkum, I., Bonetti, C., Hegemann, P., and Kennis, J. (2011) The hydrogen-bond switch reaction of the blrb bluf domain of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem. B* **115**, 7963–7971
- Lukacs, A., Tonge, P. J., and Meech, S. R. (2022) Photophysics of the blue light using flavin domain. *Acc. Chem. Res.* **55**, 402–414
- Zhong, D., and Zewail, A. H. (2001) Femtosecond dynamics of flavo-proteins: charge separation and recombination in riboflavin (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11867–11872
- Nag, L., Lukacs, A., and Vos, M. H. (2019) Short-lived radical intermediates in the photochemistry of glucose oxidase. *Chemphyschem* **20**, 1793–1798
- Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y., Tanaka, F., Nishina, Y., and Shiga, K. (2000) Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace. *J. Phys. Chem. B* **104**, 10667–10677
- Müller, P., Bouly, J. P., Hitomi, K., Baland, V., Getzoff, E. D., Ritz, T., et al. (2014) ATP binding turns plant cryptochrome into an efficient natural photoswitch. *Sci. Rep.* **4**, 5175
- Müller, P., and Bouly, J. P. (2015) Searching for the mechanism of signalling by plant photoreceptor cryptochrome. *FEBS Lett.* **589**, 189–192
- Müller, P., Brettel, K., Grama, L., Nyitrai, M., and Lukacs, A. (2016) Photochemistry of wild-type and N378D mutant *E. coli* DNA photolyase with oxidized FAD cofactor studied by transient absorption spectroscopy. *Chemphyschem* **17**, 1329–1340
- Kottke, T., Hense, A., Herman, E., and Oldemeyer, S. (2015) Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome. *FASEB J.* **290**, 1743–1751
- Langenbacher, T., Immeln, D., Dick, B., and Kottke, T. (2009) Microsecond light-induced proton transfer to flavin in the blue light sensor Plant Cryptochrome. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14274–14280
- Lukacs, A., Brust, R., Haigney, A., Laptinok, S. P., Addison, K., Gil, A., et al. (2014) BLUF domain function does not require a metastable radical intermediate state. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4605–4615
- Brust, R., Haigney, A., Lukacs, A., Gil, A., Hossain, S., Addison, K., et al. (2014) Ultrafast structural dynamics of BlsA, a photoreceptor from the pathogenic bacterium. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 220–224
- Gil, A. A., Laptinok, S. P., Iuliano, J. N., Lukacs, A., Verma, A., Hall, C. R., et al. (2017) Photoactivation of the BLUF protein PixD probed by the site-specific incorporation of fluorotyrosine residues. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 14638–14648
- Fujisawa, T., Takeuchi, S., Masuda, S., and Tahara, T. (2014) Signaling-state formation mechanism of a BLUF protein PapB from the purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* studied by femto-second time-resolved absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **118**, 14761–14773
- Stelling, A. L., Ronayne, K. L., Nappa, J., Tonge, P. J., and Meech, S. R. (2007) Ultrafast structural dynamics in BLUF domains: transient infrared spectroscopy of AppA and its mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15556–15564
- Lukacs, A., Haigney, A., Brust, R., Zhao, R. K., Stelling, A. L., Clark, I. P., et al. (2011) Photoexcitation of the blue light using FAD photoreceptor AppA results in ultrafast changes to the protein matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16893–16900

23. Khrenova, M. G., Domratheva, T., Schlichting, I., Grigorenko, B. L., and Nemukhin, A. V. (2011) Computational characterization of reaction intermediates in the photocycle of the sensory domain of the AppA blue light photoreceptor. *Photochem. Photobiol.* **87**, 564–573
24. Khrenova, M. G., Nemukhin, A. V., and Domratheva, T. (2013) Photoinduced electron transfer facilitates tautomerization of the conserved signaling glutamine side chain in BLUF protein light sensors. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2369–2377
25. Sadeghian, K., Bocola, M., and Schütz, M. (2008) A conclusive mechanism of the photoinduced reaction cascade in blue light using flavin photoreceptors. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12501–12513
26. Udvarhelyi, A., and Domratheva, T. (2011) Photoreaction in BLUF receptors: proton-coupled electron transfer in the flavin-Gln-Tyr system. *Photochem. Photobiol.* **87**, 554–563
27. Udvarhelyi, A., and Domratheva, T. (2013) Glutamine rotamers in BLUF photoreceptors: a mechanistic reappraisal. *J. Phys. Chem. B* **117**, 2888–2897
28. Hsiao, Y. W., Götze, J. P., and Thiel, W. (2012) The central role of Gln63 for the hydrogen bonding network and UV-visible spectrum of the AppA BLUF domain. *J. Phys. Chem. B* **116**, 8064–8073
29. Hontani, Y., Mehlhorn, J., Domratheva, T., Beck, S., Kloz, M., Hegemann, P., et al. (2023) Spectroscopic and computational observation of glutamine tautomerization in the blue light sensing using flavin domain photoreaction. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 1040–1052
30. Domratheva, T., Hartmann, E., Schlichting, I., and Kottke, T. (2016) Evidence for tautomerisation of glutamine in BLUF blue light receptors by vibrational spectroscopy and computational chemistry. *Sci. Rep.* **6**, 22669
31. Goings, J., Li, P., Zhu, Q., and Hammes-Schiffer, S. (2020) Formation of an unusual glutamine tautomer in a blue light using flavin photocycle characterizes the light-adapted state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 26626–26632
32. Nagahama, T., Suzuki, T., Yoshikawa, S., and Iseki, M. (2007) Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase into *Aplysia* mechanosensory neurons. *Neurosci. Res.* **58**, 81–88
33. Jansen, V., Alvarez, L., Balbach, M., Strunker, T., Hegemann, P., Kaupp, U., et al. (2015) Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *Elife* **4**, e05161
34. Lindner, R., Hartmann, E., Tarnawski, M., Winkler, A., Frey, D., Reinstein, J., et al. (2017) Photoactivation mechanism of a bacterial light-regulated adenylyl cyclase. *J. Mol. Biol.* **429**, 1336–1351
35. Collado, J., Iuliano, J., Pirisi, K., Jewlikar, S., Adamczyk, K., Greetham, G., et al. (2022) Unraveling the photoactivation mechanism of a light-activated adenylyl cyclase using ultrafast spectroscopy coupled with unnatural amino acid mutagenesis. *ACS Chem. Biol.* **17**, 2643–2654
36. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, NY
37. Bonetti, C., Mathes, T., van Stokkum, I. H., Mullen, K. M., Groot, M. L., van Grondelle, R., et al. (2008) Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the BLUF photoreceptor observed by ultrafast infrared spectroscopy. *Biophys. J.* **95**, 4790–4802
38. Goings, J., and Hammes-Schiffer, S. (2019) Early photocycle of Slr1694 blue-light using flavin photoreceptor unraveled through adiabatic excited-state quantum mechanical/molecular mechanical dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 20470–20479
39. Lukacs, A., Eker, A., Byrdin, M., Villette, S., Pan, J., Brettel, K., et al. (2006) Role of the middle residue in the triple tryptophan electron transfer chain of DNA photolyase: ultrafast spectroscopy of a Trp → Phe mutant. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15654–15658
40. Lukacs, A., Eker, A. P., Byrdin, M., Brettel, K., and Vos, M. H. (2008) Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14394–14395
41. Zhuang, B., Liebl, U., and Vos, M. H. (2022) Flavoprotein photochemistry: fundamental processes and photocatalytic perspectives. *J. Phys. Chem. B* **126**, 3199–3207
42. Zhuang, B., Vos, M. H., and Aleksandrov, A. (2022) Photochemical and molecular dynamics studies of halide binding in flavoenzyme glucose oxidase. *ChemBiochem* **23**, e202200227
43. Zhuang, B., Ramodiharilafy, R., Liebl, U., Aleksandrov, A., and Vos, M. H. (2022) Ultrafast photooxidation of protein-bound anionic flavin radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2118924119
44. Kao, Y., Saxena, C., He, T., Guo, L., Wang, L., Sancar, A., et al. (2008) Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13132–13139
45. Brazard, J., Usman, A., Lacombe, F., Ley, C., Martin, M. M., Plaza, P., et al. (2010) Spectro-temporal characterization of the photoactivation mechanism of two new oxidized cryptochrome/photolyase photoreceptors. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4935–4945
46. Nag, L., Sournia, P., Myllykallio, H., Liebl, U., and Vos, M. (2017) Identification of the TyrOH(center dot+) radical cation in the flavoenzyme TrmFO. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11500–11505
47. Laptanok, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A., and Vos, M. H. (2014) Subpicosecond kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol. Biol.* **1076**, 321–336
48. Karadi, K., Kapetanaki, S. M., Raics, K., Pecs, I., Kapronczai, R., Fekete, Z., et al. (2020) Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy. *Sci. Rep.* **10**, 2061
49. Zhou, Z., Chen, Z., Kang, X. W., Zhou, Y., Wang, B., Tang, S., et al. (2022) The nature of proton-coupled electron transfer in a blue light using flavin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, e2203996119
50. Gil, A., Haigney, A., Laptanok, S. P., Brust, R., Lukacs, A., Iuliano, J., et al. (2016) Mechanism of the AppABLUF photocycle probed by site-specific incorporation of fluorotyrosine residues: effect of the Y21 pKa on the forward and reverse ground-state reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 926–935
51. van Stokkum, I. H., Larsen, D. S., and van Grondelle, R. (2004) Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**, 82–104
52. Snellenburg, J., Laptanok, S., Seger, R., Mullen, K., and van Stokkum, I. (2012) Glotaran: a java-based graphical user interface for the R package TIMP. *J. Stat. Softw.* **49**, 1–22
53. Liu, B., Liu, H., Zhong, D., and Lin, C. (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 578–586
54. Liu, Z., Zhang, M., Guo, X., Tan, C., Li, J., Wang, L., et al. (2013) Dynamic determination of the functional state in photolyase and the implication for cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12972–12977
55. Solar, S., Gtoff, N., Surdhar, P. S., Armstrong, D. A., and Singh, A. (1991) Oxidation of tryptophan and N-methylindole by N³•, Br²•- and (SCN)²•- radicals in light- and heavy-water solutions: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem* **95**, 3639–36434



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Fluorescence lifetime distributions report on protein destabilisation in quenching experiments



Emőke Bódis^{a,1}, Katalin Raics^{a,b,e,1}, Miklós Nyitrai^{a,b,c}, Zsuzsa Majer^d, András Lukács^{a,b,*}

^aUniversity of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, Szigeti str. 12, Pécs H-7624, Hungary

^bSzentágotthai Research Center, Ifjúság str. 34, Pécs H-7624, Hungary

^cMTA-PTE Nuclear and Mitochondrial Interactions Research Group, Szigeti str. 12, H-7624 Pécs, Hungary

^dEötvös Loránd University, Institute of Chemistry, Laboratory of Chiroptical Structural Analyses, Pázmány P. str. 1/A, Budapest H-1117, Hungary

^eMTA-PTE High Intensity Terahertz Radiation Research Group, Ifjúság str. 6, H-7624 Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2013

Received in revised form 7 October 2013

Accepted 8 October 2013

Available online 23 October 2013

Keywords:

Tryptophan

Protein stability

Fluorescence quenching

Fluorescence lifetime distribution

Circular dichroism

Protein denaturation

ABSTRACT

Tryptophan is the most often investigated intrinsic fluorophore due to its abundance in proteins and its sensitivity to different environmental conditions. Fluorescence quenching is a powerful method to study proteins and acrylamide is a frequently applied quencher in these investigations. Quenching experiments are sometimes distorted by the undesired protein–quencher interactions that can result in a misinterpretation of the results. Here we focused on the identification of the possible side-effects of acrylamide applying fluorescence lifetime measurements. To provide reference data for protein denaturation the fluorescence parameters were also recorded in the presence of different concentrations of guanidine hydrochloride. In circular dichroism experiments we characterized directly the acrylamide effect on the tertiary structure of the proteins. According to the obtained data in experiments with seven tryptophan-containing proteins the full width at half maximum (*FWHM*) of the fluorescence lifetime distribution is an appropriate parameter to monitor the undesired effects of acrylamide on the proteins.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The method of fluorescence quenching was proved to be a powerful tool to provide information about protein dynamics and conformational changes [1–11]. The quenching of the intrinsic fluorescence of tryptophan by the neutral quencher acrylamide is commonly applied to characterize the microenvironment of fluorophores. Although both the theoretical background and the experimental protocols are well developed to perform and analyze such experiments, much less attention has been paid to the possible role of the direct interaction between the protein matrix and the acrylamide molecule. This interaction can result in the denaturation of the protein. In other cases the quencher induced changes of the environmental parameters of the solution, such as for example viscosity, can introduce artefacts to the experiments, and thus can lead to wrong conclusions.

Acrylamide and the protein matrix can interact in many ways: it was proposed that acrylamide could perform its effect by penetrating

* Corresponding author at: University of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, Szigeti str. 12, Pécs H-7624, Hungary. Tel.: +36 72 536 439; fax: +36 72 536 261.

E-mail address: andras.lukacs@ok.pte.hu (A. Lukács).

¹ E.B. and K.R. equally contributed as first authors.

to the protein matrix [12,13]. Equilibrium dialysis measurements also provided evidences that proteins are able to bind acrylamide [14–17]. The binding of a considerable amount of acrylamide to human serum albumin, ovalbumin and cod parvalbumin III is in good agreement with the suggestions of the penetrating model [18]. It was also demonstrated that the number of binding sites is usually different for different proteins and sensitive to the pH and the presence of co-solvents such as glycerol [15]. Accordingly, it seems to be important to identify and consider the effect of acrylamide binding to the proteins. In these cases the interpretation of the results has to include the complexity of the quenching processes, i.e. the appearance of mechanisms different from simple collisional quenching.

Proteins in solution can adapt a number of conformational sub-states [19–21]. We used fluorescence lifetime distributions to characterize the conformational heterogeneity of the investigated proteins as described previously [22,23]. The theoretical basis of the correlation of the parameters resolved in the analysis assuming continuous lifetime distribution to the properties of proteins is provided by the landscape model, which was first proposed by Frauenfelder and co-workers [24]. The full width at half maximum (*FWHM*) of the fluorescence lifetime distributions was shown to be related to the distribution of the protein sub-states and to the dynamics of inter-conversion between them [25–29]. The width

of these distributions measures the heterogeneity of the fluorophore population, i.e. the presence of a number of sub-states, which can be characterized by different fluorescence lifetimes. However, even a single tryptophan residue possess lifetime distributions indicating that the interpretation of these fluorescence parameters should involve the fundamental characteristic of the fluorophore itself.

The effect of guanidine hydrochloride (GuHCl) is well characterized by means of various experimental methods [30,31]. The conclusion of these experiments is that GuHCl can denature even relatively stable proteins. Nearby emission fluorescence and near-UV CD spectroscopy are simple and commonly used techniques to study the conformational changes in proteins. Both methods are sensitive to the local environment of the aromatic amino acids, e.g. Trp groups [32,33]. If the protein had more Trp residues, the measured fluorescence and CD signals are a superposition of the individual Trp-signals.

In this work our aim was to identify a parameter, which is informative concerning the undesired effects of acrylamide binding to proteins. This parameter was also aimed to be convenient to use in a sense that it can always be obtained in fluorescence lifetime quenching experiments without performing extra experiments. For this reason the set of fluorescence lifetime quenching and circular dichroism experiments were carried out. The influence of a denaturing agent (guanidine hydrochloride) was also studied to provide a reference system for the interpretation of the acrylamide effect. We found that the full width at half maximum (*FWHM*) of the fluorescence lifetime distributions is an appropriate parameter to monitor the effect of acrylamide on the proteins.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

HSA, BSA, lysozyme (from chicken egg white), hexokinase (Type III, Baker Yeast), phosphorylase b (from rabbit muscle), glycogen (Type III. From Rabbit Liver), tris-(hydroxy-methyl)amino-methane (Tris), acrylamide, L-tryptophan were obtained from SIGMA Chem. Co. (St. Louis, MO) and RNase T1 from Thermo Scientific. Adenosine-5'-triphosphate (ATP) and β -mercaptoethanol (MEA) were obtained from MERCK (Darmstadt, Germany), and sodium azide (NaN_3) from FLUKA (Switzerland).

2.2. Protein preparation

The proteins purchased from SIGMA Chem. Co. and Thermo Scientific were used without further purification. Prior to the fluorescence experiments the lyophilized HSA, BSA, lysozyme, RNase T1, phosphorylase b and hexokinase were dissolved into 4 mM TRIS buffer, pH 7.4. Actin was purified according to Spudich and Watt [34], and stored in 4 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MEA and 0.005% NaN_3 (buffer A). Glycogen as a reference protein was dissolved in distilled water just before usage to exploit its Trp-free nature in Trp fluorescent lifetime measurements. The protein concentration was 25–30 μM in the samples.

2.3. Fluorescence lifetime measurements

Fluorescence lifetimes were measured as a function of acrylamide or guanidine hydrochloride concentration at 20 °C. Fluorescence lifetime measurements were carried out on a Horiba Jobin-Yvon Nanolog spectrofluorometer operating in time correlated single photon counting (TCSPC) mode. To excite the protein sample a 295 nm peak wavelength pulsed LED (NanoLED 295,

Horiba Jobin Yvon) was used that generated ~ 1 ns pulses. After exciting tryptophan the fluorescence emission was collected at 340 nm. The instrument response function (IRF) had a *FWHM* of ~ 1 ns measured by using freshly prepared glycogen solution. Measurements were completed when 10,000 counts were collected in the peak channel (Fig. 1). The temperature of the cuvette holder was controlled by Thermo Scientific AC200 – A25 bath circulatory system. We used 10 mm \times 3 mm quartz cuvettes for the measurements.

2.4. Data analysis

The analysis of the raw data was performed using FluoFit (PicoQuant) analysis software, that implements nonlinear least square minimization based on the Levenberg–Marquardt algorithm. The data of fluorescence lifetime measurements were fit by continuous (Gaussian) lifetime distributions. Gaussian distribution (ρ_G) of lifetime of the tryptophans was resolved from the intensity (*I*) decay curves according to the following equation:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \int_{-\infty}^{\infty} \rho_G(\tau) e^{-\frac{t-t'}{\tau}} dt' d\tau$$

$$\rho_G(\tau) = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{\sigma_i(2\pi)^{0.5}} e^{-\frac{1}{2}(\frac{\tau-\tau_i}{\sigma_i})^2}; \quad \sigma_i = \frac{\text{FWHM}_i}{(8\ln 2)^{0.5}}$$

where τ_i and A_i are the centre lifetime and amplitude of the *i*th distributed component, respectively with a distribution width of *FWHM*_{*i*}. σ_i represents the standard deviation of the Gaussian of the *i*th component. The fit was obtained by assuming one lifetime component in all cases.

The goodness of fitting was determined from the value of the reduced χ^2 [35]. The full width at half maximum (*FWHM*) is 2.345σ , which value can reflect the distribution of the protein conformations (sub-states) [25–27].

2.5. Fluorescence quenching experiments

In quenching experiments, the fluorescence lifetime of tryptophans of seven different proteins was measured by titrating acrylamide (to the protein samples) by increasing the concentration from 0 M to 2 M. Time resolved fluorescence experiments are sensitive only for the dynamic quenching. To describe the dynamic quenching of fluorescence, the classical Stern–Volmer equation can be used [36]:

$$\tau_0/\tau = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

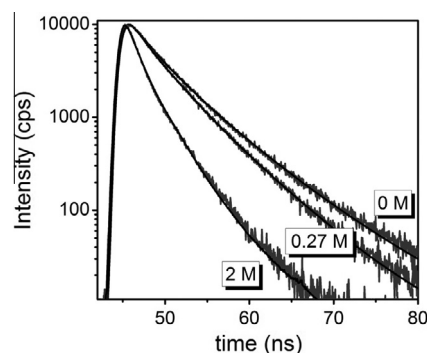


Fig. 1a. Fluorescence decay of tryptophan emission in hexokinase in the presence of 0, 0.27 and 2.0 M acrylamide at 20 °C. Gaussian fits to the experimental data are also shown and gave fluorescence lifetimes of 3.31 ns, 2.95 ns and 1.31 ns with *FWHM* values of 6.76 ns, 3.03 ns and 3.86 ns, respectively.

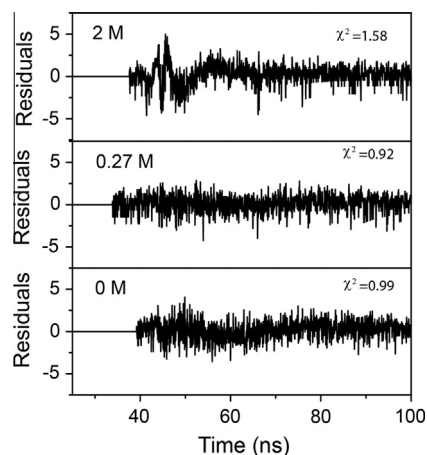


Fig. 1b. The weighted residuals of the Gaussian fits at different acrylamide concentrations.

where K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant, τ_0 is the lifetime of the fluorophore in the absence of quencher and τ is the lifetime at different quencher concentrations $[Q]$.

2.6. Experiments with guanidine hydrochloride

The effect of guanidine hydrochloride (GuHCl) was investigated by measuring the fluorescence parameters in the presence of 0–7 M concentrations of GuHCl. The denaturant chemical was added to the protein solution in its crystal form in the appropriate quantity (0–7 M) to adjust the desired final concentration. The protein solution with the GuHCl was incubated overnight at 4 °C before the fluorescence lifetime and CD spectroscopic experiments were performed. The *FWHM*, which is given in nanoseconds, was determined at all GuHCl concentrations.

2.7. Circular dichroism spectroscopy measurements

Circular dichroism measurements on lysozyme were performed with a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Ltd., Tokyo, Japan). CD spectra were recorded in the 250–350 nm range at room temperature in 0.1 M Na-phosphate using 0.2 mm path length quartz cell. The following parameters were used: spectral band width 1 nm, response time 8 s, data pitch 0.1 nm, scanning speed 20 nm/min. All spectra were corrected with baseline. Protein concentration was approximately 8 mg/ml. CD band intensities were expressed in mean residue ellipticity ($[Q]_{MR}$, deg cm²/dmol).

3. Results and discussion

3.1. Fluorescence quenching experiments

In quenching experiments, chemicals – such as acrylamide – are often used to quench the fluorescence. These chemicals can have effects on the proteins different from the quenching. One of these important side effects is often the denaturation of the proteins. In a general case protein denaturation is not detected in the experiments, so the influence of denaturation – though included in the raw data – is not considered in the interpretation of the experiments. Although it is a prerequisite for the analysis of acrylamide quenching data that this small and neutral quencher molecule has no effect on the conformation or dynamics of the proteins, it has been shown previously that the binding of acrylamide to proteins may induce conformational modifications [37]. Therefore, it

is important to identify and describe these effects of acrylamide on the investigated proteins.

In order to characterize the influence of acrylamide on the stability and/or conformation of proteins we applied fluorescence lifetime and CD spectroscopic measurements. Fluorescence lifetimes were determined using the method of time correlated single photon counting and the analysis was carried out assuming single Gaussian lifetime distributions (Fig. 1). The concentration of acrylamide in these experiments was set between 0 and 2 M. As our aim was to highlight and enlarge the possible effects of acrylamide the upper limit was set to a concentration higher than usually used in quenching experiments. The following seven proteins were investigated in the fluorescence measurements: RNase T1, HSA, BSA, G-actin (monomeric actin), lysozyme, phosphorylase b and hexokinase. These proteins show large diversity in their size, secondary and tertiary structure, and also in the number and location of the tryptophans. We used classical Stern–Volmer plots to analyze the results (Figs. 2a,b). At higher acrylamide concentrations nonlinear tendencies appeared in these plots for most of the investigated proteins. We excluded the effects of static quenching mechanisms in the interpretation because fluorescence lifetimes were collected, which are not sensitive to these static quenching processes. Except actin and RNase T1, all proteins showed downward curvature in the Stern–Volmer plots (Figs. 2a,b). This non-linear tendency was in connection with the internal change/denaturation of the proteins and can be well explained by the partial or complete denaturation of the investigated protein. This possibility was further investigated using the inherent properties of the accumulated fluorescence lifetime data. In the cases of actin and RNase T1 the Stern–Volmer plots were linear, suggesting that the integrity of these proteins were not influenced substantially by acrylamide.

3.2. Analysis of fluorescence lifetime distributions

To gain further insights into the mechanism by which acrylamide effects the proteins the fluorescence data collected in the quenching experiments were also analyzed using the *FWHM* (full width at half maximum) values of the lifetime distributions. This parameter was suggested to be suitable to follow the physico-chemical changes in the microenvironment of the fluorophore [25–27]. There are two important effects, which are usually considered to be critical for the control of the distributional width of fluorescence lifetimes. Both the change in the number of populated sub-states and the alteration in the inter-conversion between them

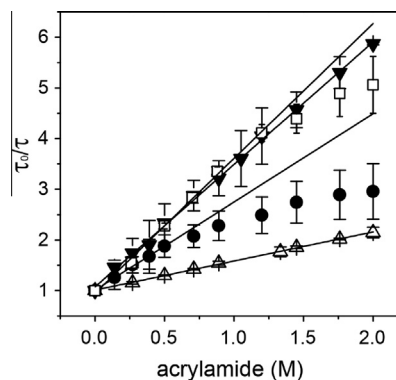


Fig. 2a. Stern–Volmer plots of the time-resolved fluorescence quenching experiments in the case of BSA (empty square), G-actin (filled downward triangle), HSA (filled circle) and RNase T1 (empty upward triangle). The fits were performed on the initial linear parts of the plots. The calculated K_{SV} values were $2.66 \pm 0.07 \text{ M}^{-1}$ (BSA), $2.42 \pm 0.03 \text{ M}^{-1}$ (G-actin), $1.74 \pm 0.05 \text{ M}^{-1}$ (HSA) and $0.57 \pm 0.06 \text{ M}^{-1}$ (RNase T1).

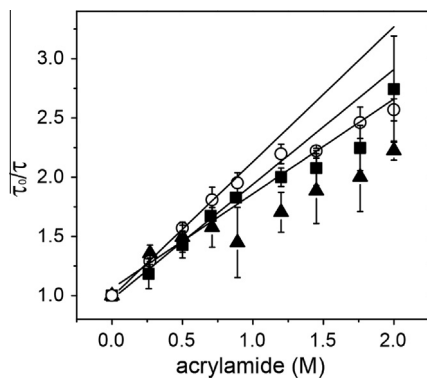


Fig. 2b. Stern–Volmer plots of the time-resolved fluorescence quenching experiments in the case of hexokinase (filled square), lysozyme (filled upward triangle) and phosphorylase b (empty circle). The calculated K_{SV} are $0.97 \pm 0.05 \text{ M}^{-1}$ (hexokinase), $0.8 \pm 0.16 \text{ M}^{-1}$ (lysozyme) and $1.14 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}$ (phosphorylase b).

could modify the value of the width of the distribution. Therefore, in general the analysis and interpretation of these data should involve a consideration regarding the possible tendencies in both of these two processes. The tendencies observed in the Stern–Volmer plots and the *FWHM* values were compared to identify the possible correlations.

The lifetime data were analyzed assuming continuous – Gaussian – lifetime distributions as the width of the Gaussian function was shown to be a practical tool to map the heterogeneity of the protein populations in solutions [25–27]. In all of these cases the goodness of fit was not worse for the Gaussian distributions than using discrete distributions.

In the case of RNase T1 and actin there were only very little acrylamide dependent changes in the value of the *FWHM* (Fig. 3a) over 1 M in correlation with the observation that there was no deviation from linearity in the corresponding Stern–Volmer plot (Fig. 2a). In all the other proteins the *FWHM* changed substantially at elevated acrylamide concentrations (Figs. 3a,b). For HSA and BSA the *FWHM* increased at lower acrylamide concentration and decreased at higher quencher concentrations (above 0.5 and 1 M, respectively) (Fig. 3a). At lower acrylamide concentrations a sharp decrease was observed for actin, hexokinase, phosphorylase b and lysozyme (Figs. 3a,b), which was followed by further increasing and decreasing tendencies in the case of hexokinase and by quasi constant tendencies for phosphorylase b and lysozyme (Fig. 3b).

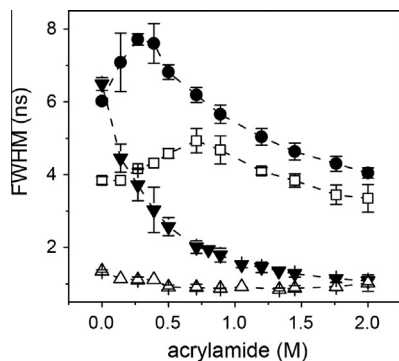


Fig. 3a. The full width at half maximum (*FWHM*) values for the fluorescence lifetime distributions as the function of the acrylamide concentration in the case of BSA (empty square), G-actin (filled downward triangle), HSA (filled circle) and RNase T1 (empty upward triangle).

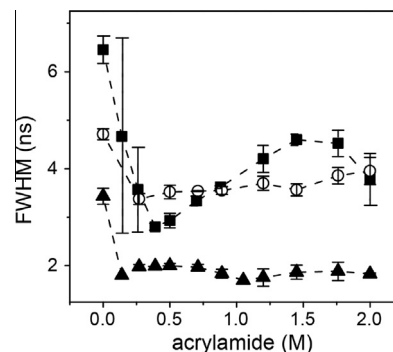


Fig. 3b. The *FWHM* values for the fluorescence lifetime distributions as the function of the acrylamide concentration in the case of hexokinase (filled square), lysozyme (filled upward triangle) and phosphorylase b (empty circle).

3.3. The denaturing effect of GuHCl

Guanidine hydrochloride (GuHCl) is known to denature proteins at high concentrations. We tested whether the *FWHM* of the investigated proteins is sensitive to the denaturation. Fluorescence lifetime of Trp was measured of the same proteins as a function of GuHCl concentration in the range of 0–7 M. GuHCl was applied in higher concentrations (0–7 M) than acrylamide (0–2 M) because of the different nature of their effects on the proteins. The *FWHM* values were plotted as the function of GuHCl concentration (Figs. 4a,b). Based on these plots all the seven proteins showed a broadening of the *FWHM* at low GuHCl concentrations. This broadening started at different GuHCl concentrations. At high GuHCl concentration (the value also depended on the choice of protein) the *FWHM* decreased and all together the plots resembled Gaussian distributions. The maximum of these distributions appeared at relatively high GuHCl concentrations for lysozyme (5–6 M) and RNase T1 (6–7 M) indicating that these two proteins were the most stable ones against GuHCl induced denaturation among the seven investigated proteins.

It is interesting to note that a similar approach was used recently in apoflavodoxin by Laptinok and colleagues [38], where the authors performed fluorescence anisotropy decay measurements at different GuHCl concentrations. Assuming a biexponential anisotropy decay ($\beta_1 \exp(-t/\Phi_1) + \beta_2 \exp(-t/\Phi_2)$) the authors observed that by increasing GuHCl concentrations the ratio of β_1/β_2 also increased peaking at a concentration around 2.5 M. The β_1/β_2 values follow GuHCl dependence similar to that

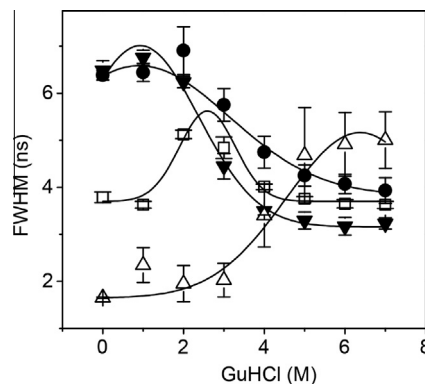


Fig. 4a. The *FWHM* values for fluorescence lifetime distribution as the function of the GuHCl concentration in the case of G-actin (filled downward triangle), BSA (empty square), HSA (filled circle) and RNase T1 (empty upward triangle). The data were fit with a Gaussian function and indicated with solid lines.

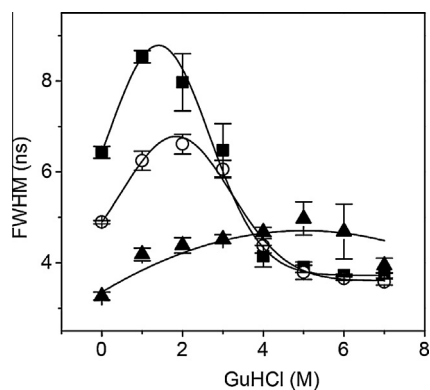


Fig. 4b. The *FWHM* the fluorescence lifetimes as the function of the GuHCl concentration in the case of hexokinase (filled square), lysozyme (filled upward triangle) and phosphorylase b (empty circle). Gaussian fits are indicated with solid lines.

we observed by monitoring the *FWHM* of the lifetime distributions (Fig. 4).

Taking into account the considerations above, we concluded that the *FWHM* was sensitive to the modification of the conformational heterogeneity of the investigated proteins. The acrylamide and GuHCl concentration dependence of this parameter was different for the individual proteins. The data also suggested that the interpretation of such experimental data requires relatively complex approaches.

3.4. CD experiments

To provide direct evidence for the denaturing effect of acrylamide we also measured CD spectra in the presence of the quencher. CD spectroscopy is sensitive to the changes of the secondary and tertiary protein structure. In control experiments the CD spectra of lysozyme was measured in the absence or presence of 7 M GuHCl (Fig. 5). These two spectra outlined the extreme protein stability conditions and showed that the well structured spectra (solid line) of the protein disappeared (dashed line) in the presence of denaturing agent. Then the experiments were repeated with 2 M acrylamide (dotted line). The CD spectra observed in the presence of acrylamide was less structured – smaller intensities at $\lambda \sim 285$ nm and $\lambda \sim 290$ nm – than that in the absence of these

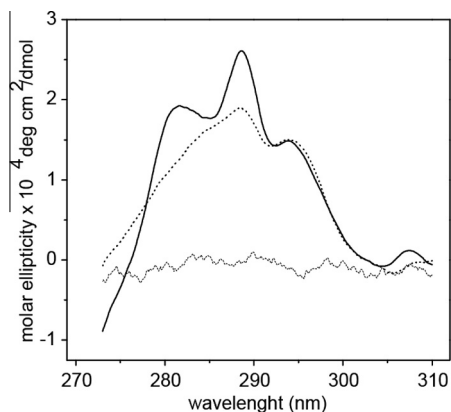
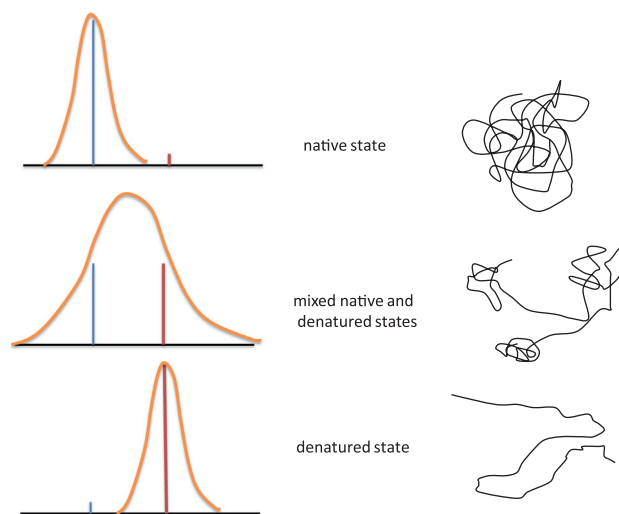


Fig. 5. CD measurements on lysozyme (black line), lysozyme incubated with 2 M of acrylamide (dotted line) and lysozyme incubated with 7 M of GuHCl are seen (dashed line). The peaks of the CD spectra of lysozyme are 293.9 nm, 288.6 nm, 281.4 nm and 274 nm. In case of lysozyme incubated with acrylamide the peaks are 294 nm, 287.2 nm, 280 nm, 267.6 nm. In case of lysozyme incubated with GuHCl the peaks are disappeared.

chemicals (i.e. acrylamide or GuHCl). The data showed that acrylamide was indeed able to partially denature the protein matrix, though its effect was much smaller than that of GuHCl. This observation was in correlation with our results from the fluorescence quenching experiments.

3.5. Model for the interpretation of the data

For the understanding of the various tendencies observed for the *FWHM* a simple model could serve as a framework. In this model we assume that the completely native or the completely unfolded states of a protein would possess a low number of conformational sub-states, which is reflected by narrow conformational distributions (Scheme 1). The native and the denatured conformations coexist under any conditions. At low concentrations of the denaturing agent the native, at high concentrations the denatured state dominates the distribution. At intermediate concentrations both protein states are present in comparable concentrations and the mixture of these subpopulations determines the *FWHM*. Provided that the investigated fluorophore has different fluorescence lifetimes in the native and denatured states of the protein, the experimental data reflects the changes in the distributions of these populations. For the lifetime values one would expect a shift from the value characteristic for the native protein to that corresponding to the denatured one. To test this expectation we plotted the lifetimes as the function of the GuHCl concentration in Fig. 6. Note, that similar plot for the acrylamide data would be very complicated due to the direct quenching effect of this chemical. Although the nature of the transition was different for the proteins (Fig. 6), the expectation regarding the appearance of the transition was fulfilled for all proteins, except actin. In the other six proteins the transition of the lifetimes occurred from a higher to a lower value, indicating that denaturation decreased the fluorescence lifetimes, probably due to the appearance of quenching processes from the surrounding solvent. Actin represented a special case as the fluorescence lifetime increased up to 2 M GuHCl, and decreased at greater concentrations. The proper explanation is difficult to find for the initial increase. However, in similar perturbation experiments, when temperature was used, actin has already shown transient conformational transitions previously. When calcium-bound



Scheme 1. The investigated fluorophore has different fluorescence lifetimes in the native and denatured states of the protein. The 'Half Denaturation Lifetime Distribution Broadening Model' represents the characteristic lifetime distributions of the fluorophore belonging to the different state of the tertiary structure of the investigated proteins.

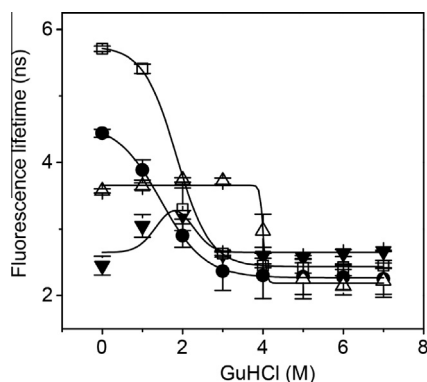


Fig. 6a. The fluorescence lifetime as the function of the GuHCl concentration in the case of G-actin (filled downward triangle), BSA (empty square), HSA (filled circle) and RNase T1 (empty upward triangle). The data were fitted with sigmoidal functions (except for the G-actin, that was fitted with Gaussian function).

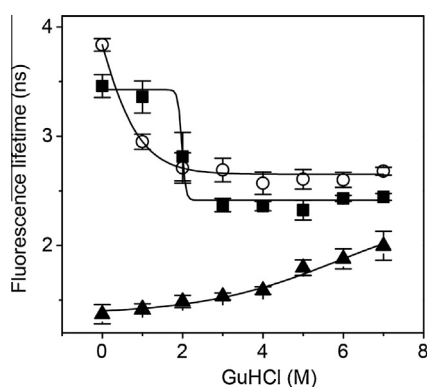


Fig. 6b. The fluorescence lifetime as the function of the GuHCl concentration in the case of hexokinase (filled square), lyzosome (filled upward triangle) and phosphor-ylase b (empty circle). The data were fitted with sigmoidal function.

actin was studied, a major conformational change appeared at around 25 °C [39] indicating that the conformational transitions are complex and non-monotonic in this protein. Our observation may also reflect this special property of actin.

The investigation of the *FWHM* in these cases shows an aspect and tendency different from that considered for the lifetimes. When either the native or denatured form of the protein is dominating, one expects a relatively narrow distribution of the lifetimes, that are centered to the corresponding lifetime values (Scheme 1). When both of the native and denatured sub-states are present in substantial populations, i.e. their relative contributions are comparable, the two different lifetimes stretch the overall lifetime distributions resulting in greater *FWHM* values (Scheme 1, middle panel). In these cases the analyses aiming to properly describe the physically veritable lifetimes would involve more than one component of the used fitting function. However, in our case the most important information is the actual broadening, and thus the analysis with mono Gaussian distribution is the right choice. The correlation described above for the GuHCl induced changes in lifetimes and *FWHM* values is represented for the case of hexokinase in Fig. 7.

Taking into account these considerations there is then a direct link between the acrylamide or GuHCl induced denaturation and the values of the *FWHM* obtained from single Gaussian component fits. When the protein samples a narrow conformational range – either native or completely denatured sub-state dominates – the *FWHM* is relatively small, while in the concentration range of

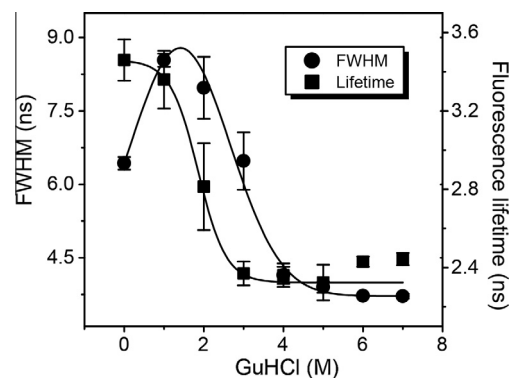


Fig. 7. The fluorescence lifetimes (right axis) and *FWHM* values (left axis) obtained for hexokinase. Sigmoidal fit to the lifetimes gave 1.86 M for the inflection point, and the maximum of the Gaussian fit for the *FWHM* values was at 1.41 M GuHCl.

transition between these states it broadens. This simple model explains how the *FWHM* of the proteins can function as a sensitive probe to follow the process of denaturation.

Due to the difference in the structure and dynamics of the proteins their resistance to external denaturants is different. Therefore, the concentrations of acrylamide or GuHCl at which the effects of protein denaturation appear in the plots are also different, and the interpretation of the data requires special considerations in each individual case. In an experiment one would only sample part of the theoretical Gaussian curves describing the expected *FWHM* tendencies. Accordingly, the individual proteins studied in this work fit to this general scheme, but due to the virtual window determined by the applied acrylamide or GuHCl concentrations and the different nature of the proteins they cover different parts of the Gaussian. We also note that in more complex cases the application of complementary methods – such as CD spectroscopy here – to describe the underlying molecular interactions may also be required for the proper understanding of the fluorescence data.

4. Conclusions

Our aim was to provide a tool, which is relatively easy to use for the identification of the undesired effects of acrylamide in fluorescence quenching experiments. We measured the acrylamide and GuHCl concentration dependence of the *FWHM* of fluorescence lifetime distributions and correlated them with the obtained Stern-Volmer plots. We also provided a direct correlation between the acrylamide effect and denaturation using CD spectroscopy. We found that acrylamide has perturbed the conformational states of the investigated proteins. Based on the experimental data we concluded that the determination and analysis of the *FWHM* – which can be obtained from the collected experimental quenching data – provide a powerful analytical tool for the identification and description of the undesired effects of acrylamide in quenching experiments. The importance of this analysis is underlined by the fact that these undesired effects could lead to the misinterpretation of the quenching results.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Hungarian Science Foundation (OTKA Grants NN 107776 to MN and K100720 to MZs), grants from the Hungarian National Office for Research and Technology, the European Union co-financed by the European Social Fund (TAMOP 4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0003 to MK). This work was also supported by ‘Science, Please! Research Team on

Innovation' (SR0P-4.2.2/08/1/2008-0011). A.L. is grateful for the "Zoltán Magyary postdoctoral grant in the convergence regions".

References

- [1] L. Matyus, J. Szollosi, A. Jenei, Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics, *J. Photochem. Photobiol. B* 83 (2006) 223–236.
- [2] M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Dynamics of a protein matrix revealed by fluorescence quenching, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3290–3294.
- [3] B. Somogyi, Z. Lakos, Protein dynamics and fluorescence quenching, *J. Photochem. Photobiol. B* 18 (1993) 3–16.
- [4] B. Somogyi, S. Papp, A. Rosenberg, I. Seres, J. Matko, G.R. Welch, P. Nagy, A double-quenching method for studying protein dynamics: separation of the fluorescence quenching parameters characteristic of solvent-exposed and solvent-masked fluorophores, *Biochemistry* 24 (1985) 6674–6679.
- [5] M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Fluorescence quenching studies with proteins, *Anal. Biochem.* 114 (1981) 199–227.
- [6] B. Somogyi, M. Nyitrai, G. Hild, Steady-state quenching of fluorescence to study protein structure and dynamics, in: E.A.P. Vladimir, N. Uversky (Eds.), *Luminescence Spectroscopy and Circular Dichroism*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2007, pp. 153–185.
- [7] Z. Song, X. Zheng, B. Yang, Conformational stability of CopC and roles of residues Tyr79 and Trp83, *Protein Sci.* (2013).
- [8] M. Amaro, J. Brezovsky, S. Kovacova, L. Maier, R. Chaloupkova, J. Sykora, K. Paruch, J. Damborsky, M. Hof, Are time-dependent fluorescence shifts at the tunnel mouth of haloalkane dehalogenase enzymes dependent on the choice of the chromophore?, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 7898–7906.
- [9] N. Stanciu, I. Aprodu, G. Rapeanu, I. van der Plancken, G. Bahrim, M. Hendrickx, Analysis of the thermally induced structural changes of bovine lactoferrin, *J. Agric. Food Chem.* (2013).
- [10] E. Gabellieri, M. Bucciattini, M. Stefani, P. Cioni, Does azurin bind to the transactivation domain of p53? A Trp phosphorescence study, *Biophys. Chem.* 159 (2011) 287–293.
- [11] V. Dragnea, A.I. Arunkumar, H. Yuan, D.P. Giedroc, C.E. Bauer, Spectroscopic studies of the AppA BLUF domain from *Rhodobacter sphaeroides*: addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state, *Biochem.-Us* 48 (2009) 9969–9979.
- [12] E. Gratton, D.M. Jameson, G. Weber, B. Alpert, A model of dynamic quenching of fluorescence in globular proteins, *Biophys. J.* 45 (1984) 789–794.
- [13] D.B. Calhoun, J.M. Vanderkooi, G.R. Holtom, S.W. Englander, Protein fluorescence quenching by small molecules: protein penetration versus solvent exposure, *Proteins* 1 (1986) 109–115.
- [14] M.R. Eftink, C.A. Ghiron, Does the fluorescence quencher acrylamide bind to proteins?, *Biochim Biophys. Acta* 916 (1987) 343–349.
- [15] C.D. Carrington, D.M. Lapadula, L. Dulak, M. Friedman, M.B. Abou-Donia, In vivo binding of [(14)C]acrylamide to proteins in the mouse nervous system, *Neurochem. Int.* 18 (1991) 191–197.
- [16] B. Somogyi, J.A. Norman, M. Punyiczki, A. Rosenberg, Viscosity dependence of acrylamide quenching of ribonuclease T1 fluorescence. The gating mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* 1119 (1992) 81–89.
- [17] B. Somogyi, M. Punyiczki, J. Hedstrom, J.A. Norman, F.G. Prendergast, A. Rosenberg, Coupling between external viscosity and the intramolecular dynamics of ribonuclease T1: a two-phase model for the quenching of protein fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 1209 (1994) 61–68.
- [18] M. Punyiczki, J.A. Norman, A. Rosenberg, Interaction of acrylamide with proteins in the concentration range used for fluorescence quenching studies, *Biophys. Chem.* 47 (1993) 9–19.
- [19] D.L. Stein, A model of protein conformational substates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3670–3672.
- [20] H. Frauenfelder, G.A. Petsko, D. Tsernoglou, Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics, *Nature* 280 (1979) 558–563.
- [21] M.K. Hong, D. Braunstein, B.R. Cowen, H. Frauenfelder, I.E. Iben, J.R. Mourant, P. Ormos, R. Scholl, A. Schulte, P.J. Steinbach, et al., Conformational substates and motions in myoglobin. External influences on structure and dynamics, *Biophys. J.* 58 (1990) 429–436.
- [22] M. Lee, J. Kim, J. Tang, R.M. Hochstrasser, Fluorescence quenching and lifetime distributions of single molecules on glass surfaces, *Chem. Phys. Lett.* 359 (2002) 412–419.
- [23] D.R. James, W.R. Ware, A fallacy in the interpretation of fluorescence decay parameters, *Chem. Phys. Lett.* 120 (1985) 455–459.
- [24] H. Frauenfelder, F. Parak, R.D. Young, Conformational substates in proteins, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17 (1988) 451–479.
- [25] J.R. Alcalá, E. Gratton, F.G. Prendergast, Interpretation of fluorescence decays in proteins using continuous lifetime distributions, *Biophys. J.* 51 (1987) 925–936.
- [26] J.R. Alcalá, E. Gratton, F.G. Prendergast, Fluorescence lifetime distributions in proteins, *Biophys. J.* 51 (1987) 597–604.
- [27] J.R. Alcalá, E. Gratton, F.G. Prendergast, Resolvability of fluorescence lifetime distributions using phase fluorometry, *Biophys. J.* 51 (1987) 587–596.
- [28] R.M. Fiorini, M. Valentino, M. Glaser, E. Gratton, G. Curatola, Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene reveal the effect of cholesterol on the microheterogeneity of erythrocyte membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 939 (1988) 485–492.
- [29] E. Bismuto, E. Gratton, G. Irace, Effect of unfolding on the tryptophanyl fluorescence lifetime distribution in apomyoglobin, *Biochemistry* 27 (1988) 2132–2136.
- [30] B.A. Shirley, Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Mol. Biol.* 40 (1995) 177–190.
- [31] C.N. Pace, Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266–280.
- [32] P.L. Clark, Z.P. Liu, J. Zhang, L.M. Gierasch, Intrinsic tryptophans of CRABPI as probes of structure and folding, *Protein Sci.* 5 (1996) 1108–1117.
- [33] W.Q. Wang, Q. Xu, Y.F. Shan, G.J. Xu, Probing local conformational changes during equilibrium unfolding of firefly luciferase: fluorescence and circular dichroism studies of single tryptophan mutants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 28–33.
- [34] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4866–4871.
- [35] J.R. Lakowicz, S. Keating, Binding of an indole derivative to micelles as quantified by phase-sensitive detection of fluorescence, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5519–5524.
- [36] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.
- [37] M. Punyiczki, A. Rosenberg, The effect of viscosity on the accessibility of the single tryptophan in human serum albumin, *Biophys. Chem.* 42 (1992) 93–100.
- [38] S.P. Liptenok, N.V. Visser, R. Engel, A.H. Westphal, A. van Hoek, C.P. van Mierlo, I.H. van Stokkum, H. van Amerongen, A.J. Visser, A general approach for detecting folding intermediates from steady-state and time-resolved fluorescence of single-tryptophan-containing proteins, *Biochemistry* 50 (2011) 3441–3450.
- [39] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, B. Somogyi, Effect of Ca²⁺–Mg²⁺ exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin, *Biophys. J.* 74 (1998) 2474–2481.