

PhD értekezés tézisei

Funkcionális fehérjedinamikai vizsgálatok fluoreszcencia- és ultragyors spektroszkópai módszerekkel

Kilián Balázsné Raics Katalin



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

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

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

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Dr. Lukács András, Dr. Bódis Emőke

Pécs, 2024

Bevezetés

Fotoaktív flavoproteinek

A fotoaktív flavoproteinek kék fényt érzékelő növényi fotoreceptorok, amelyek riboflavin származékokat kötnek; flavin segítségével reagálnak a megvilágításra. A flavint tartalmazó fehérjék töredéke fotoaktív; három csoportba soroljuk őket aszerint, hogyan reagálnak a fényre: 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. 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. A szerkezetváltozást keltő mechanizmus azonban nem minden esetben teljesen tisztázott, ugyanis az ismert BLUF domén fehérjék mintegy felénél fényindukált elektrontranszfer (valójában proton kapcsolt elektrontranszfer) folyamatok jelenléte is igazolt a hidrogénkötés rendszer átalakulásával párhuzamosan vagy azt megelőzően.

Számos kék fényt érzékelő fotoreceptor kromofórként flavint használ, ahol a fényelnyelés a flavin (izoalloxazin) gyűrűben lokalizálódik. A semleges vagy anionos formában előforduló flavinok három különböző redoxállapot között képesek váltani elektron felvételével vagy leadásával: a teljesen oxidált (FAD_{ox}), az egy elektronnal redukált vagy szemikinon ($FADH^{\bullet}$) forma és a hidrokinon ($FADH_2$), a két elektronnal teljesen redukált forma között. Két redoxpár, az oxidált flavin/anionos szemikinon (FAD_{ox} és $FAD^{\bullet-}$) és a semleges szemikinon/anionos hidrokinon ($FADH^{\bullet}$ 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 abszorpció és fluoreszcencia spektroszkópiával. A FAD minden egyes redoxállapota eltérő abszorpció spektrummal rendelkezik, így könnyen megfigyelhető az oxidációs állapot változása.

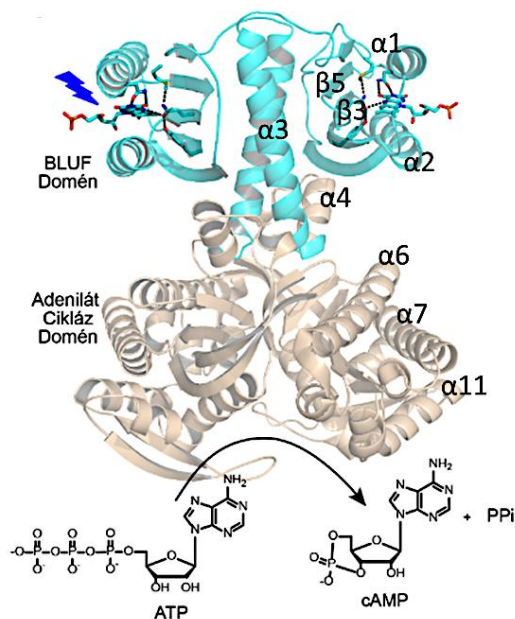
Az oxidált flavinok legnagyobb elnyelése 450 nm körül van, és ~515-520 nm-en fluoreszkálnak. A flavinok fotokémiájának megértéséhez alapvető paraméter a fotogerjesztés hatására bekövetkező redoxpotenciál-változás (kb. -0,3 V-ról kb. +1,9 V-ra), ami azt jelzi, hogy a flavinok a gerjesztett állapotban sokkal erősebb oxidálószer, mint alapállapotban. A flavinok a fehérjékben és még oldatban is elektron akceptorként viselkednek, vagyis gerjesztett állapotban a környezetükből (közeli molekuláktól) elektront vesznek fel.

A BLUF domén fehérjék

A BLUF-domén egy olyan moduláris egység, amely számos kék fényt érzékelő fehérjében megtalálható; a baktériumok mintegy tizede rendelkezik BLUF fehérjékkel. A kék fény érzékeléséhez flavint használó fehérjecsaldába (BLUF) tartozók funkciója lehet az enzimaktivitás, a fototaxis, a fotofób válasz, vagy a génexpresszió szabályozása^{15,20-24}. Mindegyik BLUF esetben megfigyelhető a flavin 450 nm körüli abszorpciós csúcsának 10-15 nm-es eltolódása a megvilágítás hatására a FAD körüli hidrogénkötés rendszer átrendeződése miatt; ezt tekintjük a fotoaktivitásra való képesség markerének. Az összes BLUF domén szerkezetében megtalálható egy flavinhoz közeli tirozin, glutamin és egy kivétellel egy triptofán.

Az OaPAC fehérje szerkezete és fotofizikája

A fényvel 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 fotoaktivált adenilát-ciklázok (PAC) családjába tartozó OaPAC (az „Oa” a fotoszintetizáló cianobaktériumból, az *Oscillatoria acuminatá*ból való származásra utal) egy N-terminális BLUF doménből és egy C-terminális III. típusú adenil-cikláz (AC) doménből álló homodimer fehérje (1. ábra)^{27,28}.



1. 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.)

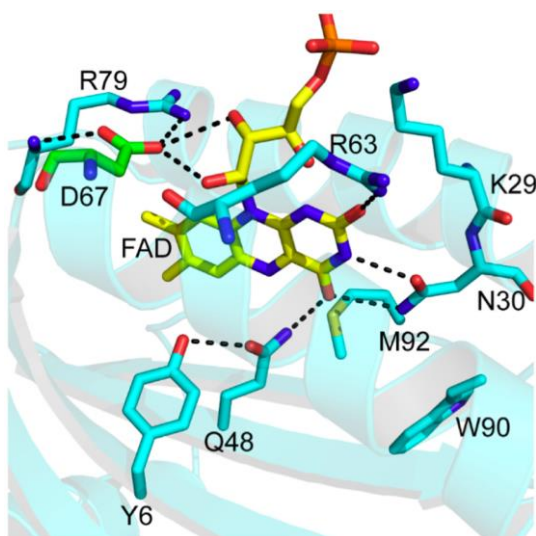
A fotoaktiválást az enzim N-terminális végén található BLUF domén vezérli. A katalitikus domén az adenilát-cikláz (AC), amelyben ATP-kötő hely található. A BLUF egység flavin közvetítésével reagál a kék fényre és ezáltal szabályozza a hozzá kapcsolt enzim aktivitását. Így a fehérjének sötét (inaktív) 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.

A BLUF doménhez kapcsolt adenilát-cikláz ATP-ből cAMP-t képez, amely 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.

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. Az OaPAC fehérjében a fénygerjesztés aktiválta adenilát-cikláz hirtelen megnöveli az ATP cAMP-vé való átalakulásának sebességét, amely az intracelluláris cAMP szint növekedéséhez vezet. 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.)

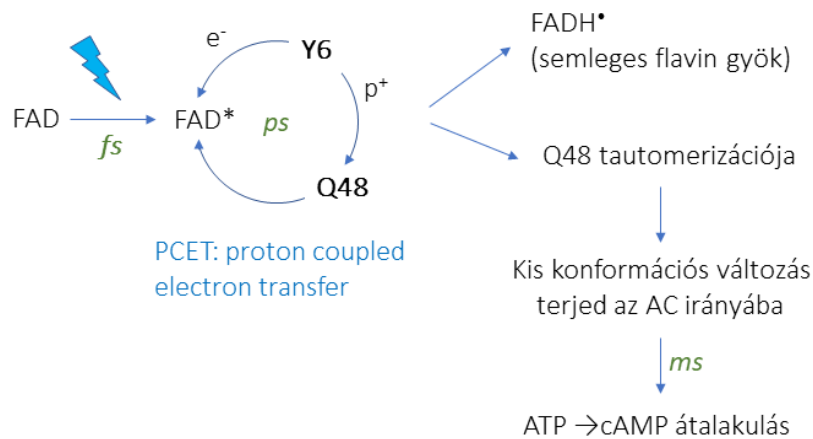
A kék fény hatására bekövetkező változások az OaPAC fehérjében az FMN izoalloxazin gyűrűje és a $\beta 3$ redőn levő közeli aminosavak közötti kölcsönhatásokon múlnak (2. ábra). Az OaPAC BLUF-doménjének kékfény-gerjesztése protonhoz kapcsolt elektrontranszfer-folyamatot eredményez, ahol az elsődleges 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. 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 (3. ábra): a kék fény

fotonjának elnyelésekor egy elektron a közeli tirozinról (Y6) átkerül a flavinra - az elektronátadási lépés után a flavin környezetétől függően anionos ($\text{FAD}^{\bullet-}$) vagy semleges (FADH^{\bullet}) flavin gyök keletkezik - 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.



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

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 enzimatiságokra, a D67N kiváló jelöltnek tűnik hatékonyabb optogenetikai rendszerek előállítására, annak ellenére, hogy a Y6-tól messze van a D67.

Célkitűzés

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 mutásának 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.

Anyagok és módszerek

Ultragyors spektroszkópiai módszerek

A nagyon rövid, pikoszekundumos-femtoszekundumos időskálán zajló abszorpciós spektrumbeli változások követésére – és ezen spektrális nagyítón keresztül a flavoproteinek elektronátviteli folyamatainak jellemzésére – a pumpa-próba elven alapuló látható tranziens abszorpciós (TA) technikát és a Kerr-kapuzott (KK) fluoreszcencia spektroszkópiát használtuk.

A flavin kromofór a fehérjekörnyezettől és a fotokémiától függő redoxállapotai jól elkülönülő abszorpciós spektrummal rendelkeznek, így jól kimutathatók. A TA technika során a mintát viszonylag nagy intenzitású lézerimpulzussal (pumpa) gerjesztjük. Az így kiváltott hatás időbeli nyomonkövetésére meghatározott időközönként érkező, jóval kisebb energiájú próbaimpulzusok sorozata világítja át a mintát, így a gerjesztett állapotbeli abszorpció vizsgálható. 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. Az általunk alkalmazott pumpanyaláb a frekvenciakétszerező BBO (béta bárium borát) kristállyal létrehozott 400 nm-es 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 egy Nd:YLF lézerrel pumpált Spectra-Physics Mai Tai típusú Ti:Sa (100 fs impulzushosszú, 100 MHz ismétlési frekvenciájú, 1,5 W átlagos teljesítményű, 1 nJ energiájú) lézer oszcillátor. Ez világítja meg a lézererősítő (Spectra-Physics Spitfire Ace) Ti:Sa közeget, 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. A kettéosztott lézernyaláb egyik fele 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 két nyaláb a mintában találkozik: így a 400 nm-es pumpa impulzus által keltett hatást az időben lépésenként késleltetett fehér fényvel „tapogatjuk le”. Az abszorpciós spektrumokat egy -80°C-on működő Andor Newton CCD rögzíti. Az abszorpciós adatmátrixokat, a NI LabVIEW szoftverrel írt saját fejlesztésű program számolta ki. A kapott adatmátrixot a Glotaran nevű² szoftverrel elemeztük.

A Kerr-kapuzott fluoreszcencia spektroszkópia technikánál a próbaimpulzus nem a mintában találkozik a pumpával, hanem az ún. Kerr-közegben. Ennek szerepe a mintabeli fluoreszcens folyamat megfelelő időablakának kinyitása, amely után az emittált fotonok intenzitása és hullámhossza mérhető. A próbaimpulzus nagy intenzitásának hatására a kettőtörővé vált Kerr-közegen áthaladó, síkban poláros (jelen esetben fluoreszcens) fény polarizációs síkja elfordul. A mintából kijövő fluoreszcens fény polarizátoron áthaladva válik síkban polárossá. Egy másik 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-közéget kinyitja. Ekkor a fluoreszcens fény síkja elfordul, tehát a fény egy része átjut. A fényáteresztés pontos idejének vezérlésével a fluoreszcencia intenzitásának mérése által a lecsengés menete rekonstruálható.

A saját építésű berendezés lehetővé teszi a fluoreszcencia-spektrumok mérését 100 fs-ig terjedő időbeli felbontással és akár ns-os időskálán is. A 390 nm-es gerjesztő impulzust egy BBO kristály segítségével a 780 nm-es lézerpulzus egy részének frekvenciakétszerezésével 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. 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.

Pirofoszfát esszé – cAMP hozam mérések

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-merkopto-7-metilpurin 360 nm-en történő fényelnyelésének pirofoszfát függő emelkedésén alapszik. Az 1 µM koncentrációban kimért OaPAC vad típus és D67N mutáns ATP-áz aktivitását sötétben és folyamatos, 473 nm-es, 9 mW-os lézertény megvilágítás mellett mértük

500 μM 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 $\mu\text{M}/\text{ml}$), 1 mM MESG-t (20 μM), PNP-t (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$), 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-metipurin) reakciósebességét ($\mu\text{M}/\text{s}$ -ban), amely pontosan megegyezik az ATP-ből származó pirofoszfát reakciósebességével. A Michaelis-Menten-állandó meghatározásához a vizsgálatot 1 μM vad típuson és a D67N mutáns on végeztük el 0-500 μM ATP-koncentráció jelenlétében, kilenc különböző koncentráció értéken. 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 értéket, ami a maximális reakciósebesség feléhez tartozó ATP koncentráció.

Differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) mérések

A DSC méréseket SETARAM Micro DSC-III kaloriméterrel, 20 és 100°C közötti tartományban végeztük 0,3 $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$ fűtési sebességgel. A mintát (vad típusú és D67N fehérje) és a referenciát (puffer) $\pm 0,05$ mg pontossággal kiegyensúlyoztuk, 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.

Nukleotid-kötési vizsgálatok anizotrópia mérésekkel

A fluoreszcencia anizotrópia érzékeny a ligandok fehérjékhez való kötődésére⁴. Az anizotrópia változásait a fluorofór mozgékonyságának változása okozza. Az OaPAC hozzáadása a MANT-ATP-hez növeli az N-metilantranilol (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 μM 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:

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

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.

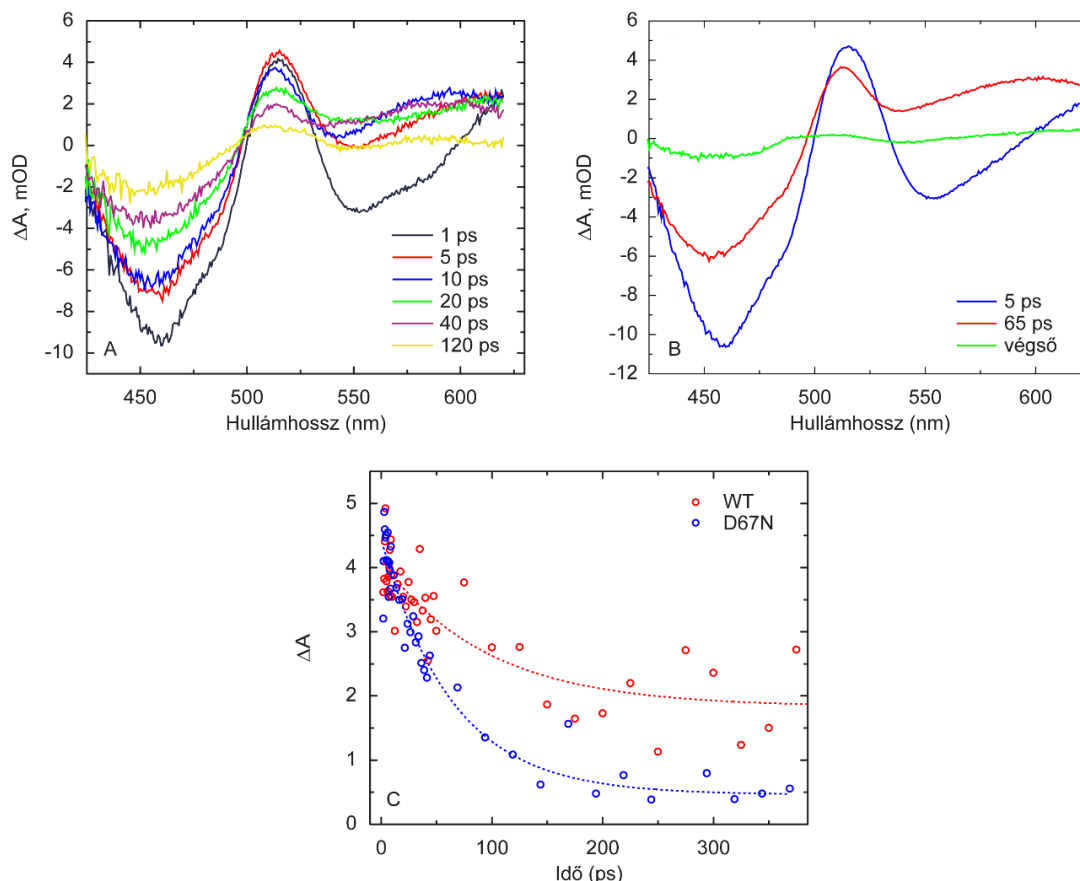
Eredmények

Tranziens abszorpciós mérések

A D67N mutáns elsődleges fotokémiájának jellemzésére tranziens abszorpciós méréseket végeztünk. A flavin kromofór különböző redoxállapotainak határozottan eltérő abszorpciós spektrumai 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. Az OaPAC D67N-es mutánsa esetében mért tranziens abszorpciós spektrumok hasonlóak 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 $S_0 \rightarrow S_1$ 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 (4A. ábra).

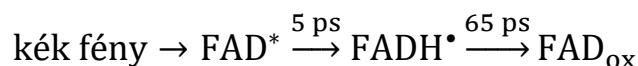
A globális elemzéshez szekvenciális sémát feltételezve három különböző időállandóval (5 ps, 65 ps és végtelen) illeszthettük az adatokat (4B. ábra), úgy, mint a vad típusú fehérje esetében³³. A vad típusú mérésekhez hasonlóan az első EAS időállandóját 5 ps-nak találtuk és ennek eredményeként az EAS1-et a gerjesztett és oxidált flavin (FAD*-FADox) különbségspektrumához rendelhetjük. A D67N mutáns 65 ps-os EAS2 időállandója a vad típusúhoz (EAS2 = 83 ps) képest gyorsabb fázisra utal. A 65 ps-os komponens a (FADH•-FAD) és (FAD*-FADox) spektrumok lineáris kombinációjaként illesztettük, mivel a fluoreszcencia mérésekből látható, hogy a gerjesztett állapot a hosszabb időállandónál is jelen van. A 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 gyökpár 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 vöröseltolódott 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 (4C. 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.



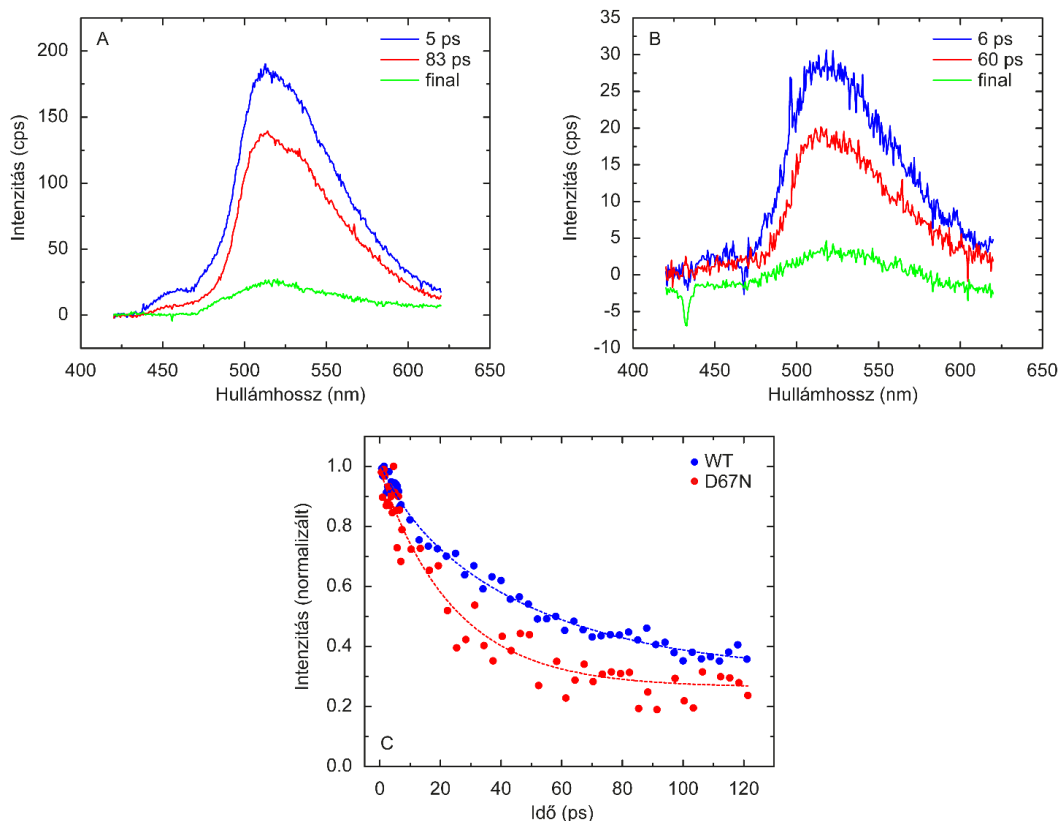
4. ábra. A) Tranziens abszorpciós mérések a D67N mutánsban a különböző időbeli késleltetéseknél. B) Globális elemzés után kapott EAS spektrumok. C) A vad típusú és a D67N OaPAC 505 nm-en mért egyedi kinetikája. Monoexponenciális illesztést alkalmazva a vad típusú és a D67N időállandója 90 ± 30 ps illetve 64 ± 8 ps-nak adódott.

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



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. Az 5.A és B ábrán a tranziens fluoreszcencia-adatsor globális illesztésével kapott EAS-spektrumok láthatók. A fluoreszcencia emisszió maximuma ~513 nm-nél jelentkezett, ami magasabb, mint az AppA fehérje esetén megfigyelt érték (~500 nm) és lényegesen alacsonyabb, mint a szabad flaviné (~530 nm)⁶⁸. A fluoreszcencia emisszió hullámhossza azt mutatja, hogy a flavin kompakt 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. A globális illesztés mindkét mintában, a TA kísérletekkel analóg három EAS-komponenssel írható le, a D67N esetében a vad típushoz képest kisebb időállandóval. A tranziens fluoreszcencia adatsor tehát jól leírható volt ugyanazzal a három élettartammal (5 ps, 83 ps és ∞ a vad típusú, illetve 5 ps, 60 ps és ∞ a mutáns fehérje esetén), mint a TA kísérletekben.

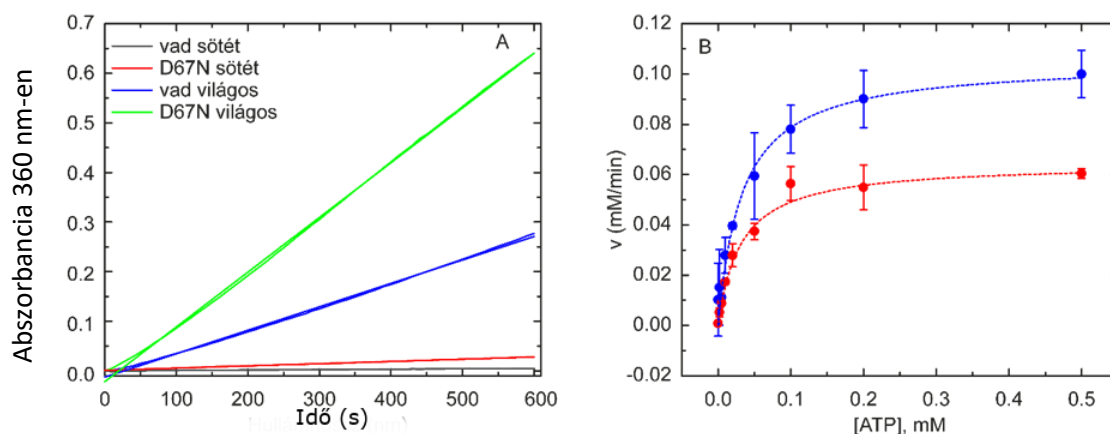


5. ábra. A) A vad típusú tranziens fluoreszcencia-adatainak globális elemzésével kapott EAS-spektrumok. A globális illesztés eredménye a flavin heterogén relaxációját mutatja B) A D67N mutáns tranziens fluoreszcencia-adatainak globális elemzésével kapott EAS-spektrumok C) Az 513 nm-en megfigyelt fluoreszcencia-csökkenés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

A megfelelő EAS (szekvenciális sémát feltételező (1→2→3)) spektrumok mindegyikének 513 nm környékén van a maximuma, ami arra utal, hogy fehérjéhez kötött flavinból származnak. A vad típusú és a D67N mutáns fehérje fluoreszcencia emissziójának lecsengése közötti közvetlen összehasonlítás érdekében összevetettük az 513 nm-en megfigyelt kinetikát. Az 5. 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, 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 (az Y6-ra visszafelé irányuló proton- és elektrontranszfer) miatt.

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 (OD₃₆₀), amikor az ATP-t átalakítja cAMP-vé. A 6A. ábra az 1 μM vad típusú OaPAC, illetve az 1 μM D67N mutáns OaPAC sötét- és fényindukált enzimaktivitását mutatja 500 μM ATP jelenlétében. Sötétben az enzimaktivitás 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.

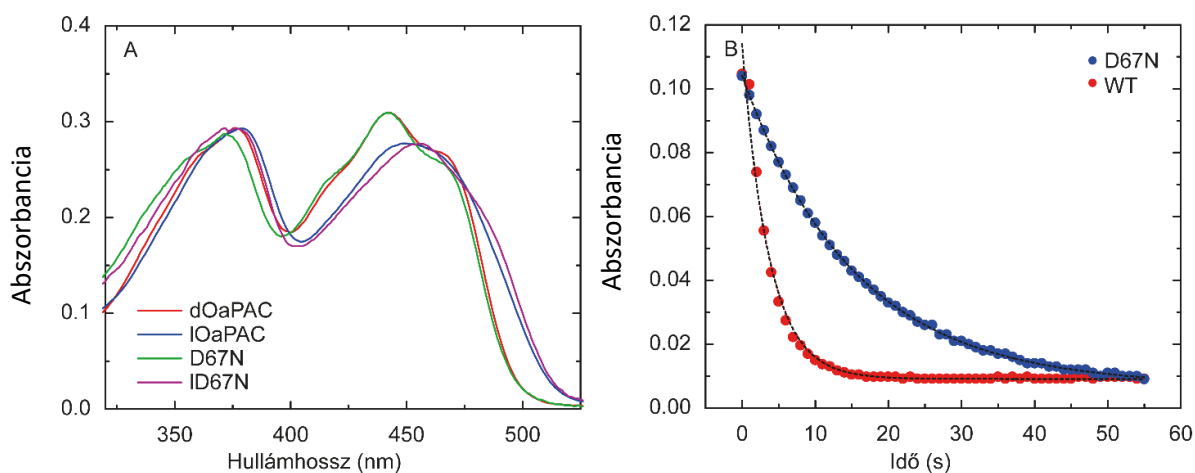


6. ábra. A) az ATP átalakításának kinetikája a vad típusú és a D67N OaPAC sötét és fényadaptált állapotában. A sötét állapotban a D67N mutánsban az ATP-átalakulás sebessége kissé nagyobb, mint a vad típusban. A világos állapotban 0,5 mM ATP jelenlétében az átalakulás sebessége a mutáns esetében nagyobb volt, mint a vad típusú fehérje esetében. B) A vad típusú (alsó görbe) és a D67N (felső görbe) enzimaktivitásának Michaelis-Menten-diagramja. Megvilágítás hatására a v_{max} megnövekedett a D67N mutánsban.

A kinetikai állandók meghatározásához növekvő mennyiségű szubsztrát (ATP) felhasználásával végeztünk enzimatikus vizsgálatot. Az eredményeket a klasszikus Michaelis-Menten függvény segítségével értékeltük ki (6B. ábra). 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 félmáximális 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 enzimek által egységnyi idő alatt termékké alakítható szubsztrátmolekulák számát - $\sim 1,5$ -szer magasabb a D67N-ben ($50,05$ 1/perc), mint a vad típusú OaPAC-ban ($32,2$ 1/perc).

Visszatérési kísérletek

Más BLUF domén fehérjékhez hasonlóan a D67N mutáns abszorpciós spektruma az S_0 - S_1 átmenetet jellemző abszorpciós csúcs tipikus vöröseltolódását mutatja (442 nm-ről 455 nm-re) kék fényvel 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 néhány száz percig is terjedhet; 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, mint a vad típusú OaPAC esetén mért visszatérési sebesség (7B. ábra).



7. 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 7. 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 spektrumok alapján a vad típusú és a mutáns fehérje abszorpciós értékei nagyon hasonlóak a sötét állapotban: az S_0-S_1 átmenet csúcsa mindkét fehérjénél azonos, maximuma 442 nm-nél van. A mutáns esetében az S_0-S_2 átmenet 4 nm-es kékeltolódása figyelhető meg (376 nm a vad típusú esetében és 372 nm a mutáns esetében). Világos állapotban az S_0-S_1 csúcs a vad típusban 452 nm-re, a mutánsban pedig 456 nm-re tolódik. Az S_0-S_2 csúcs a vad típusban 376 nm-ről 379 nm-re, a mutánsban 372 nm-ről 376 nm-re tolódik. A D67N lassabb regenerálódása arra utal, hogy a fehérje a fénygerjesztés után több időt tölt olyan szerkezetű állapotban, amely lehetővé teszi a cAMP termelését. Összességében a mutáns olyan szerkezetet vesz fel, amely nemcsak kedvezőbb az ATP-cAMP átalakuláshoz, hanem lassítja is az eredeti szerkezetbe való visszarendeződést.

DSC mérések

Az enzimatis 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 mutattak a mutáns és a vad típusú OaPAC között. 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 eredményezett (62,1°C), alacsonyabb ΔH -val (0,069 J/g). 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 hátterében a flexibilisebb szerkezet, vagyis a kedvezőbb struktúra áll és nem az elektrontranszfer folyamatban megfigyelt különbségek.

Nukleotid-kötési vizsgálatok fluoreszcencia anizotrópia mérésekkel

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 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. Mivel az OaPAC 350 nm-en gerjesztve 500 nm felett emittál, ezért a flavin emisszió nem járul hozzá az anizotrópia mérésekhez. 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.

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 mutagenézissel 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 enzimaktivitást 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 anizotrópia 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.

Mérési eljárás	Mért paraméter neve, jele, mértékegysége	Mérési eredmények			
		Vad típusú OaPAC	D67N mutáns	Változás, tendencia	Értelmezés
Enzimatisz aktivitás mérés: cAMP hozam mérése abszorpciós spektrofotometriával (pirofoszfát esszé)	Átalakulás maximális sebessége v_{max} [mM/perc]	0,064 ±0,007	0,1 ±0,002	↑~1,6×	Nagyobb enzimaktivitás a mutáns esetén
	Katalitikus állandó k_{cat} [1/perc]	32,2	50,05	↑~1,6×	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	↑~1,3×	Nagyobb enzimaktivitás a mutáns esetén
Időfüggő abszorpciós spektrofotometria	Sötét állapotba való visszatérés ideje [s]	3,6	15,3	↑~ 4×	A mutáns hosszabban tartózkodik a világos állapotban, azaz az ATP-cAMP átalakulást elősegítő szerkezetben
Ultragyors tranziens abszorpciós spektroszkópia	Gerjesztett állapotú relaxáció ideje [ps]	90±30	64±8	↓~ 0,7×	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	↓~ 0,6×	
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	↓~ 0,9×	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	↑~3,5×	A mutáció olyan szerkezeti változást idézett elő, amely befolyásolta az ATP kötési affinitását, valamint a cAMP termelés hozamát.

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 Pecs, Kinga Pozsonyi Ujfalusi, Elek Telek, Yin Li, Jinnette Tolentino Collado, Peter J. Tonge, Stephen R. Meech, Marten H. Vos, Emoke 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 Pecs, 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, Emoke Bodis, Ildiko Pecs, 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

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., Laptенок, 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 Laptенок, S. P., Nuernberger, P., Lukacs, A. & Vos, M. H. Subpicosecond Kerr-gate spectrofluorometry. *Methods Mol Biol* **1076**, 321-336 (2014). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_13
- 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 adenylyl 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 Adenylyl Cyclase Using Ultrafast Spectroscopy Coupled with Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *Acs Chemical Biology* **17**, 2643-2654 (2022). <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00575>
- 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., Szölloši, 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 fluorophores. *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 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 Laptенок, 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>