

## ***Fotoreceptorok funkcionális dinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópai módszerekkel***

### *Tranziens abszorpciós mérések AppA mutánsok esetében*

Előzetes hipotézisünk szerint a tirozin lecserélése blokkolja az elektron transzfert, amely a gerjesztést követően léphet fel a Y21-es tirozin és az FAD között. Ennek tanulmányozása érdekében ultragyors tranziens abszorpciós méréseket végeztünk – látható és infravörös tartományban egyaránt – több AppA mutánson, amelyek esetében a potenciális elektron donor tirozint más aminosavakra cseréltük. A mutáció következtében a fehérje fotoinaktívává vált, vagyis nem volt megfigyelhető az FAD spektrumában a gerjesztést követő látványos tíz nanométeres eltolódás 450 nm körül. A tranziens infravörös spektrumokat vizsgálva megfigyelhető, hogy a legmagasabb frekvenciájú csúcs ( $1701\text{ cm}^{-1}$ ) nem tolódik el a mutáció következtében. Tekintettel arra, hogy ezt a csúcsot mint az FAD  $\text{C}_4=\text{O}$  karbonil rezgési módusaként azonosítottuk, amely rendkívül érzékeny a hidrogén kötések átrendeződésére, arra következtettünk, hogy mutáció következtében – annak ellenére, hogy a fehérje fotoinaktívává vált – a flavint stabilizáló hidrogénkötések nem rendeződtek át a mutáció következtében. Ezzel szemben az összes Y21 mutáns esetében eltűnt az  $1666\text{ cm}^{-1}$ -nél megfigyelt tranziens abszorpciós csúcs, amelyet korábban a fotoaktivitás egyik markereként azonosítottunk be. Az Y21S mutánson végzett tranziens abszorpciós mérések érdekes eredményt hoztak a feltételezett elektron transzfer szempontjából. Összehasonlítva a gerjesztett állapot egyik markereként beazonosított  $1380\text{ cm}^{-1}$  és az fő alapállapot rezgési módus ( $1548\text{ cm}^{-1}$ ) időbeli lecsengését, azt tapasztaljuk, hogy a gerjesztett állapot gyorsabban tűnik el, mint ahogy a fő rezgési módus visszatér az alapállapotba, ami azt igazolja, hogy elektron transzferre kerül sor, ez az oka a gerjesztett állapot gyorsabb lecsengésének. Az adatok további elemzéséből kiderül az is, hogy az általunk korábban az FAD gyök markereként azonosított  $1531\text{ cm}^{-1}$  módus esetében egy lassú növekedés figyelhető meg, ami arra utal, hogy az elektron transzfer sokkal lassabban valósul meg, mint az a korábban tanulmányozott Y21W mutáns esetében (Lukacs et al, *JACS*, 2014) ahol a tirozint egy szintén elektron donor triptofánra cseréltük. Az  $1531\text{ cm}^{-1}$  csúcs megjelenése alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az Y21 mutánsok (Y21I, Y21S, Y21C) esetében is sor kerül elektron transzferre, az elektron donor viszont a W104-es triptofán (mivel nincs más potenciális elektron donor a flavin környezetében).

Az a tény, hogy az elektron transzfer az Y21S, Y21I és Y21C mutánsok esetében lassabb volt, mint az Y21W esetében könnyen érthető, hiszen a 104-es pozícióban található triptofán távolabb helyezkedik el flavintól, mint amikor a 21-es pozícióban volt. A W104 triptofán elektron donor szerepét erősíti meg az a megfigyelésünk is, hogy az Y21IW104F mutáns esetében már egyáltalán nem jön létre az  $1531\text{ cm}^{-1}$ -es tranziens, vagyis nincsen gyökképződés.

Tekintettel arra, hogy kísérleteink azt bizonyították, hogy a 104-es pozíciójú triptofán szerepet játszik az elektron transzferben, arra kerestük a választ, hogy milyen szerepet játszik a fehérje fotociklusában. Ennek érdekében létrehoztunk több olyan mutánst (W104A, W104T, W104Y), amelyek esetében a triptofánt egy másik aminosavra cseréltük. Ezeknek a mutánsoknak az egyik érdekessége, hogy fotoaktívak, vagyis a gerjesztést követően megfigyelhető a vöröseltolódás, kérdéses azonban, hogy ugyanolyan funkcionálisak-e mint a

vad típusú AppA. Az összes W104 mutáns esetében ugyanis megfigyelhető, hogy a triptofán kicserélése nagy mértékben befolyásolja a gerjesztést követő világos állapotból az alap vagyis sötét állapotba való visszatérést. Vad típus esetében a kék fényvel való gerjesztést követően erre mintegy 30 percre van szükség, a W104 mutánsok esetében ez pár percre vagy extrém esetben néhány másodpercre rövidül le. Felvetődik tehát a kérdés, hogy annak ellenére, hogy spektrális szempontból ezek a mutánsok fotoaktívnak tűnnek, nem biztos, hogy ténylegesen funkcionálisak is.

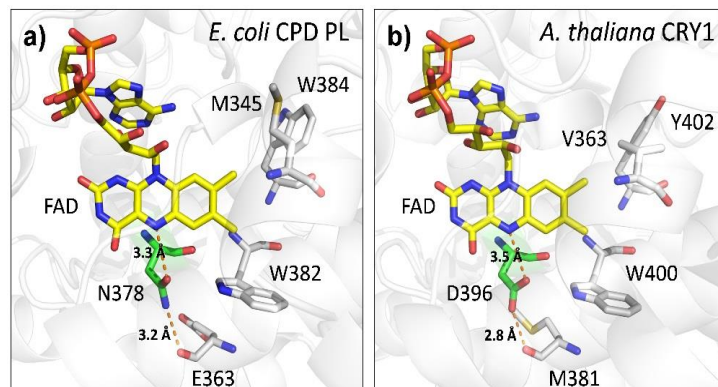
A fent ismertetett eredményeinket a következő közleményünkben ismertettük: Laptenok SP , Lukacs A , Brust R , Haigney A , Gil A , Towrie M , Greetham GM , Tonge PJ , Meech SR Electron transfer quenching in light adapted and mutant forms of the AppA BLUF domain *FARADAY DISCUSSIONS* 177: pp. 293-311. (2015) IF: 4.606

A projekt során sikerült leírunk az AppA fotociklusának azt a részét, amelynek során a fehérje a világos állapotból visszakerül sötét állapotba. Ezt a munkát a JACS-ben jelentettük meg, a hektikus szerkesztés során azonban a cikkből lemaradt a NKFI-nak szóló köszönetnyilvánítás.

A. Gil, A. L. Haigney, S. P. Laptenok, R. Brust, A. Lukacs, J. Iuliano, J. Jeng, E. Melief, R. Zhao, E. Yoon, I. P. Clark, M. Towrie, G. M Greetham, A. Ng, J. J. Truglio, J. B. French, S. R. Meech, Peter J Tonge: 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, *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 138:(3) pp. 926-935. (2016), 2016 IF:13,038

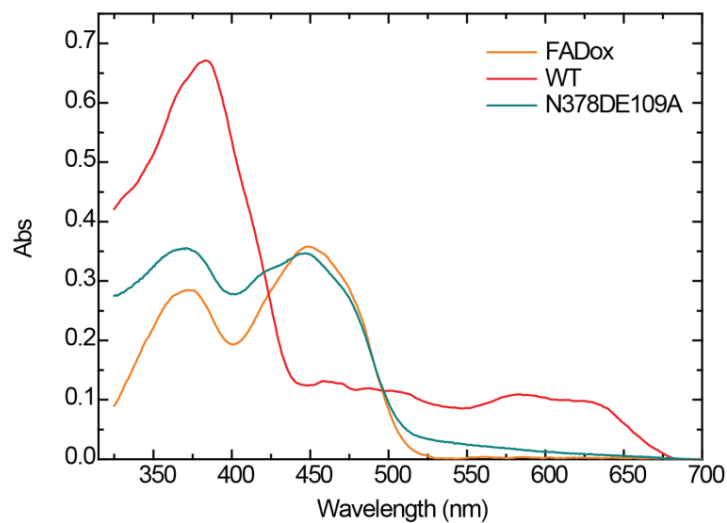
*Tranziens látható és infravörös abszorpciós és tranziens fluoreszcencia spektroszkópai mérések az N378DE109A fotoliáz mutánson*

A fotoliázok és a kriptokrómok ugyanahhoz a fehérjecsaldhoz tartozó fehérjék, amelyek nagy fokú homológiát mutatnak. Ennek ellenére a funkciójuk teljesen eltérő: a fotoliázok az UV-indukált DNS hibák javítását, a kriptokrómok viszont a cirkadián ritmus vagy a madarak mágneses tájékozódásáért felelős. Kiinduló hipotézisünk szerint a funkcióban megtalálható különbségért elsősorban a fehérje által nem kovalensen kötött flavin oxidációs állapota felelős. Az FAD redox állapotát viszont az befolyásolja, hogy milyen aminosav található az izoalloxazin gyűrű N5-ös atomjához közel.

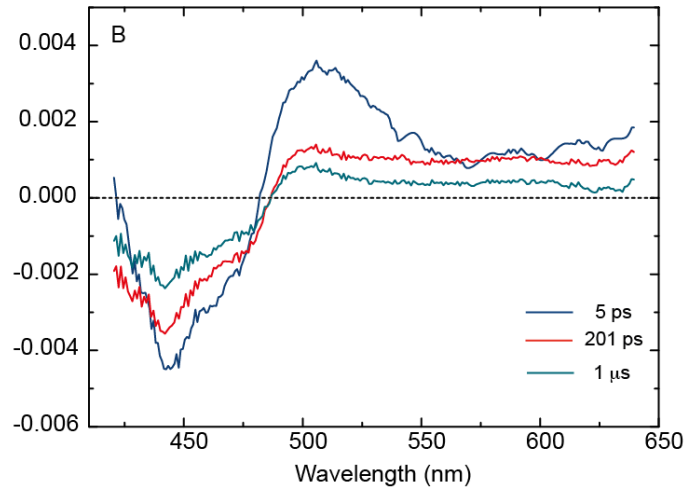


Ahogy a fenti ábrán látható a kriptokrómokban ez egy aszpartát, a fotoliázban pedig egy aszparagin. Elsőként tehát létrehoztuk az N378D fotoliáz mutánst, amelynek esetében az aszparagint egy aszpartátra cseréltük. Ennek eredményeként az FAD oxidált állapotba került, szemben a vad típusnál megfigyelt félig redukált állapottal.

A tranziens abszorpciós és a fluoreszcencia spektroszkópiai mérések előtt létrehoztuk az N378DE109A mutánst. A 109-es pozícióban található glutamin alaninra cserélése következtében ugyanis a fotoliáz elveszíti a MTHF antennáját. Erre azért volt szükség, mert az antenna hatékonyan abszorbeál a 400 nm körüli tartományban és Förster típusú energia transzfer segítségével adja át energiáját a FAD-nak. A fotociklus vizsgálatát ez a folyamat nagy mértékben akadályozta volna, ezért az antennát eltávolítottuk (lásd az alábbi ábrát).



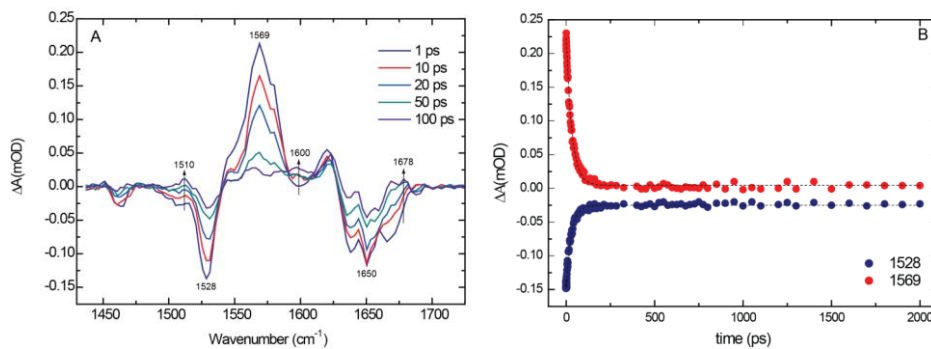
A látható tranziens abszorpciós mérések eredményeként kapott tranziens spektrumok hasonlítottak az oxidált FAD esetében kapott spektrumokhoz, jelentős eltérést az 520 – 620 nm-es tartományban sikerült megfigyelni. Ennek az oka, hogy a fényabszorpciót követően a gerjesztett állapotba került FAD egy elektron von el a legközelebbi elektron donortól, jelen esetben triptofántól. A triptofán kation gyök viszont egy széles abszorpciós spektrummal rendelkezik az említett hullámhossz tartományban. A megfigyelt különbség az oxidált FAD spektrumához képest tehát az keletkező triptofán gyök abszorpciója miatt jön létre. A mért adatokon spektrális és globális analízist hajtottunk végre. A spektrális analízis során, azt figyeltük meg hogy 1ps-mal a gerjesztést követően az N378DE109A mutáns tranziens spektruma az anionos FAD gyök és a triptofán kation gyök spektrumával illeszthető. Ez azt jelenti, hogy a töltésszétválasztás nagyon hamar, már 1 ps-mal a gerjesztést követően megvalósul. A globális illesztés során két – egy 5 ps-os és egy 200 ps-os – időállandót kaptunk.



A spektrumok alakját elemezve pedig azt állapítottuk meg, hogy a gerjesztést követő FAD anionos gyök – triptofán kation gyök pár fennmarad a mérés időhatárának végéig (2 ns).

*Tranziens infravörös mérések a Rutherford Appleton Laboratory, Central Laser Facility nevű kutatóintézetben*

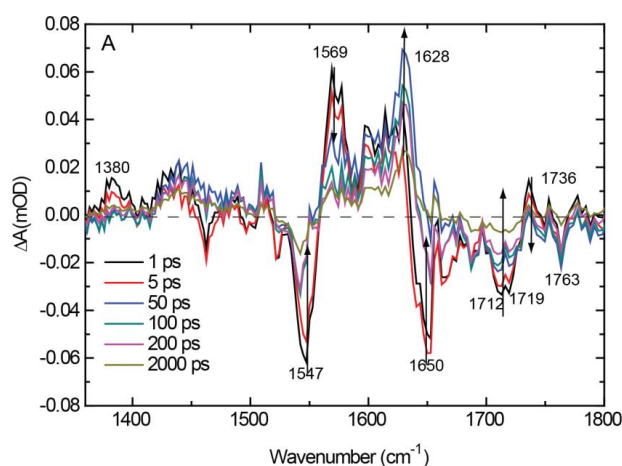
Ultragyors tranziens infravörös méréseket végeztünk a vad típusú és az N378D fotoliáz mintákon (még publikálatlan adatok).



A fenti ábrán látható vad típusú fotoliáz spektrumán a félig redukált állapotban levő FAD tipikus rezgési módusai figyelhetőek meg (Lukacs et al., J Phys. Chem. B., 2012). A fő rezgési módusoknál a látható tranziens abszorpciónál is mért kinetikákat (Lukacs et al., JACS, 2008) figyelhetjük meg. E szerint (mint ahogyan az a fenti ábrán is látható) a teljes elektron transzfer mintegy 30 ps alatt végbemegy.

A mutáció következtében az infravörös spektrum jelentősen megváltozott és jól hasonlít azoknak a flavoproteineknek a tranziens infravörös spektrumához, amelyek esetében a flavin oxidált állapotban van (lásd Lukacs et al., 2012). Lényeges különbség azonban a magas frekvenciás rezgési módusok ( $> 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) megjelenése. Ez ugyanis sem a vad típusú AppA esetében, sem a glükóz oxidáz esetében nem volt megfigyelhető. A legtöbb fehérje esetében ugyanis a legmagasabb frekvencia  $1700 \text{ cm}^{-1}$  körül jelenik meg és a C4=O karbonil rezgésének

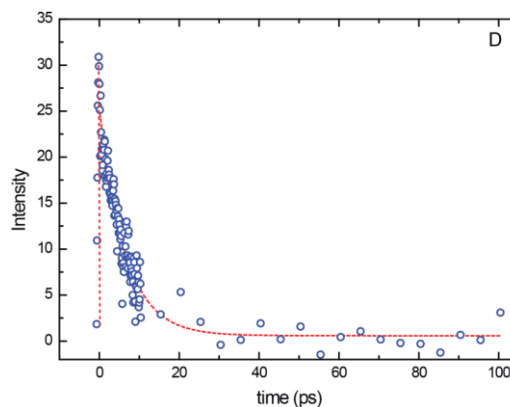
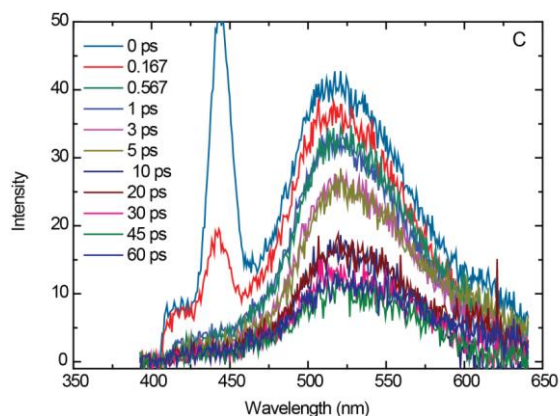
felel meg. A különbség (a mutáció jellegéből adódóan) az aszpartát miatt jön létre és valószínűleg (de ez még további elemzés tárgya) az aszpartát deprotonációja miatt jelenik meg.



### *Ultragyors tranziens fluoreszcencia spektroszkópai mérések*

A tranziens abszorpciós mérések mellett tranziens fluoreszcencia méréseket is végeztünk az általunk épített Kerr-kapus spektrométeren (Laptenok Sergey P, Nürnberger Patrick, Lukacs Andras, Vos Marten H Subpicosecond Kerr-Gate Spectrofluorometry In: Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols. Springer, 2014. pp. 321-336. (Methods in Molecular Biology) (2014)

A mérések értelmezése még nem teljes. Ahogyan az alábbi ábrán látható az N378D mutáns fluoreszcenciája gyorsan, mintegy 6 ps alatt lecseng. Ez azonban ellentmond annak, hogy az oxidált FAD gerjesztett állapota kevesebb mint egy ps alatt eltűnik, ennyi kell ugyanis ahhoz, hogy a közeli W382-es triptofántól elvont elektron kioltsa a gerjesztett állapotot. A tranziens fluoreszcens mérésekből ez a gyors fázis azonban hiányzik (pedig az ábrán 440 nm környékén például jól látszik a Raman szórás megjelenése majd eltűnése).



### *Tranziens abszorpciós mérések a $\mu$ s – ms skálán*

A hosszabb időskálán végzett tranziens abszorpciós mérésekre a franciaország Saclay-ban található Commissariat d’Energie Atomique nevű kutatóközpont Bioenergetika, Struktruális Biológia és Mechanizmus nevű laboratóriumában mértük meg.

Ezeknek a méréseknek a során sikerült a fotociklusnak a gerjesztést követő néhány mikroszekundumtól a néhány milliszekundumig terjedő szakaszát megvizsgálnunk.

A kísérletek során készítettünk egy olyan vad típusú fotoliázt, amelyben 0.5 mM-os imidazol koncentrációval elértük azt, hogy az FAD oxidálódott. Ennek megfelelően párhuzamos méréseket végeztünk a vad típusú mintán és az N378D mutáns. A vad típusú mintán végzett mérésekből kiderült, hogy a flavin oxidálása nem változtatta meg a fehérje fotociklusát, ugyanazokat az időállandókat sikerült megfigyelnünk, mint korábbi tranziens abszorpciós méréseink során a félig redukált flavin esetében (Aubert et al., Nature, 2000; Byrdin et al. PNAS, 2003).

A mutáns fotoliáz esetében a fotociklus jelentősen megváltozott: 3 mikroszekundummal a gerjesztést követően a flavin egy újfajta (általunk FAD<sub>x</sub>-nek elnevezett) redox állapotba került és mintegy 22 ms-ra volt szükség a töltés rekombinációra szemben a vad típuson megfigyelt 2 ms-mal szemben.

Ezeket az eredményeket a következő publikációban sikerült leírunk: Klaus Brettel, Pavel Müller, Laszlo Grama, Miklos Nyitrai, Andras Lukacs Photochemistry of Wild Type and N378D Mutant E. coli DNA Photolyase with Oxidized FAD Cofactor Studied by Transient Absorption Spectroscopy *CHEMPHYSICHEM* 17:(9) pp. 1329-1340. (2016) IF: 3,138

### *Tranziens infravörös mérések vad típusú GFP-n, valamint a T203V és S205V mutánsokon*

A GFP a fluoreszcens fehérjék prototípusa, amelynek esetében a fluoreszcenciát okozó kromofór két különböző állapotban fordulhat elő: egy semleges protonált (A) valamint egy anionos deprotonált (B) állapotban, mindkettő gerjesztése zöld fluoreszcenciához vezet. Fluoreszcencia spektroszkópiai mérések már korábban megmutatták, hogy ez a két állapot proton transzferrel áll egymással kapcsolatban. Munkánk során egy új mérési módszerrel a teljes fotociklust sikerült karakterizálnunk (elsőként a világon) a femtoszekundumos-mikroszekundumos időskálán. A TRMPS (Time Resolved Multiple Probe Spectroscopy) nevű módszer szintén pumpa-próba típusú módszer, a gerjesztést követően azonban nem csak egyszer, hanem elektronikus késleltetést (is) használva többször átvilágítjuk a mintát. Ennek az eredménye a széles időskála, amelyen a tranziens abszorpciós mérések elvégezhetőek. Méréseink igazolták azt a korábbi feltételezést, hogy a fluoreszcencia egy gerjesztett állapotú proton transzfer eredménye, amelynek során a proton transzfer a kromofórtól egy víz molekulán majd az S205-ös szerinen át, az E222-es glutaminon keresztül valósul meg. A fotociklus vizsgálata érdekében több mutáns is készítettünk: az S205V mutáns esetében, annak ellenére, hogy a proton „drótot” szakítottuk meg, a proton transzferre továbbra is sor kerül csak mintegy 30-szor lassabban. Ennek az oka az, hogy a proton transzfer a T203-as treoninon keresztül valósul meg, amely azonban távolabb helyezkedik el a víz molekulától.

Ezt a munkánkat az Angewandte Chemistry International című szaklapban jelentettük meg: Laptanok, Lukacs et al., (IF: 11.261)