

FÉNNYEL HAJTOTT FEHÉRJÉK

Lukács András

Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Biofizikai Intézet

Van-e közös a vándormadarak, a rovarok és a fotoszintetikus baktériumok között? Egy biztosan, mindegyikben van egy flavin alapú fotoreceptor, amely a létükhöz elengedhetetlen. A vándormadarak tájékozódása és a rovarok napi ritmusának kialakítása például egyaránt a kriptokróm nevű kék fény fotoreceptor segítségével valósul meg. A *Rhodobacter sphaeroides* nevű fotoszintetikus baktérium pedig egy BLUF domén fehérje segítségével védekezik a túl sok fénnel szemben.

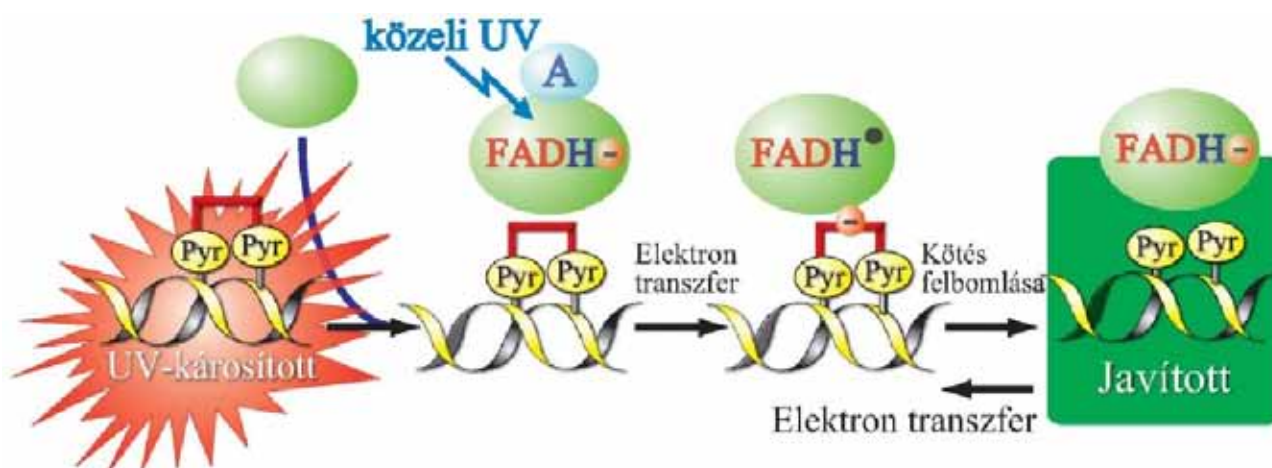
A természetben közel kétszáz flavoproteint ismerünk, amelyek a flavinok változatos redoxállapotainak köszönhetően számos fontos folyamatban játszanak kulcsszerepet, ezek közül azonban csak néhány fotoaktív, vagyis olyan, amelynek működéséhez esszenciális a fényabszorpció. A fototropizmus, a fototaxis, vagy a cirkádián ritmus szabályozása mind olyan folyamat, amelyben fotoaktív flavoproteinek fontos szerepet játszanak.

A növények fototropizmusa – vagyis a fény irányába való fordulása és növekedése – például az úgynevezett LOV (light-oxygen-voltage) típusú fotoaktív flavoproteinekkel valósul meg, amelyekben a fényabszorpciót követően az FMN molekula C4-es atomja és egy közeli cisztein között kovalens kötés jön létre, létrehozva a fehérje szignalling állapotát. Számos élőlény esetében figyelhető meg a fototaxisnak nevezett folyamat – amikor az adott organizmus a fény irányába, vagy a fénnel ellentétes irányba mozog – amely mögött szintén fotoaktív flavoproteinek állnak.

Fotoliázok és kriptokrómok

A fotoaktív flavoproteinek között különleges helyet foglalnak el a kriptokróm/fotoliáz fehérjecsaládba tartozó fehérjék, amelyek számos egzotikus funkciót képesek ellátni. A kriptokróm/fotoliáz fehérjecsalád egyetlen ismert tagja sokáig a fotoliáz volt, amelyről több mint ötven évvel ezelőtt fedezték fel, hogy kék fény hatására képes a DNS-ben létrejött hibák javítására. Claude S. Rupert és munkatársai *H. influenzae* törzsből kivont DNS-t világítottak meg UV fénnel, amelynek következtében a transzformációs határfok jelentősen csökkent. Ezt követően, az UV által károsított DNS-hez sejtmentes *E. coli* kivonatot adtak, majd kék fénnel megvilágították. Ruperték azt vették észre, hogy megvilágítás nélkül az *E. coli* nem gyakorolt semmilyen hatást, kék fény hatására azonban a transzformációs határfok tízszeresére nőtt, amiből arra következtettek, hogy az *E. coli* tartalmaz egy fénnel aktivált enzimet, amelyet fényreaktíváló enzimnek, később pedig fotoliáznak neveztek el. A fotoliáz működésének molekuláris részletei azonban még évtizedekig rejtve maradtak. A fotoliáz működésének megértésében Aziz Sançar nyolcvanas években végzett kísérletei játszottak döntő szerepet, aki kimutatta, hogy a javítás fényindukált elektron transzfer hatására

valósul meg. Az általa végzett kísérletek arra engedtek következtetni, hogy a fotoliáz a fényabszorpciót követően felhasítja az UV fény által létrehozott pirimidin dimereket. E mögött egy elegáns molekuláris folyamat áll: a fényabszorpciót követően a flavin kofaktorról egy elektron „ugrik” a pirimidin (Pyr) dimerre, aminek következtében a kötés felhasad – vagyis a DNS szál javítása megtörténik – majd az elektron visszakerül a flavinra (lásd az 1. ábrán).

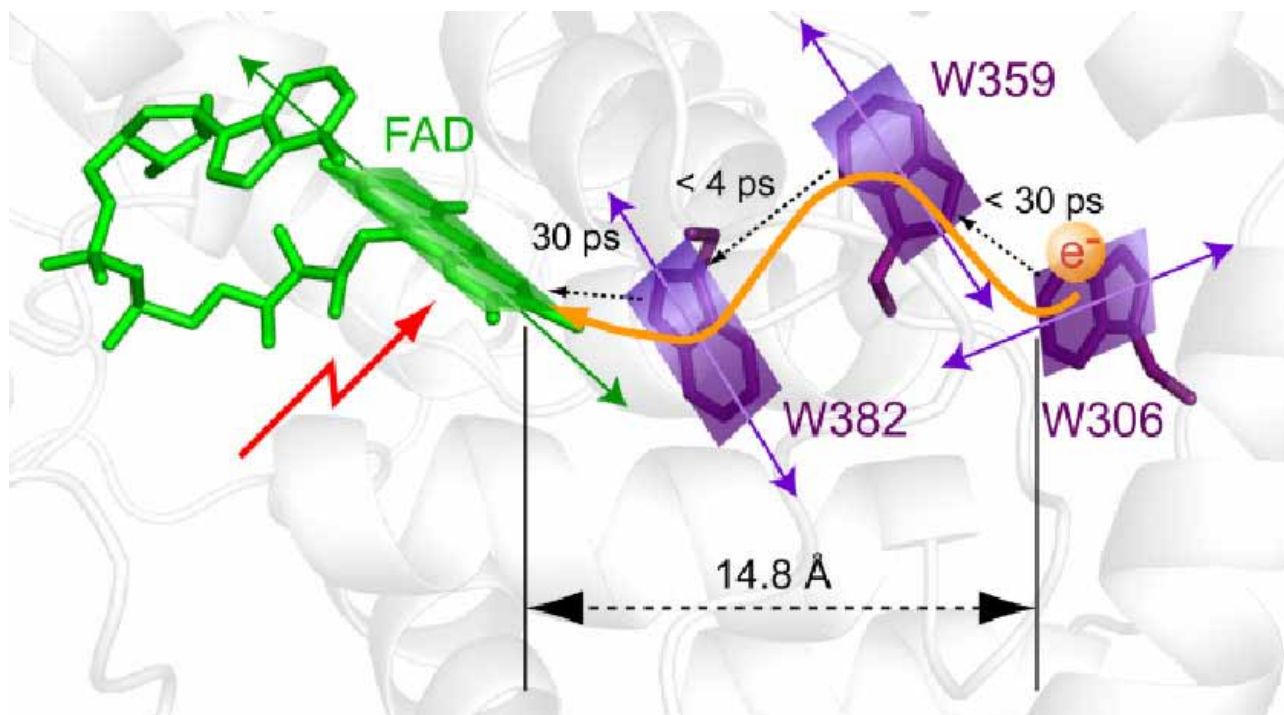


1. ábra. A fotoliáz javítási mechanizmusa.

A javítási folyamat fontos feltétele, hogy a flavin kofaktor (FAD) teljesen redukált (FADH^-) állapotban legyen. A fotoliázban az expresszálast és tisztítást követően a flavin a félig redukált redox állapotában van. Klaus Brettel és Marten Vos kollégáim az ezredfordulón fedezték fel [1], hogy látható fény hatására a flavin teljesen redukálódik, méghozzá egy elektrontranszfer segítségével, amelyben három közeli triptofán vesz részt. A folyamatot fotoaktivációnak nevezték el, amelyet közös munkánk során az elmúlt néhány évben sikerült részletesen jellemeznünk. Kísérleteink során azt sikerült igazolni, hogy a flavin fényabszorpcióját követően a legközelebbi triptofánról (W382) egy elektron ugrik a flavinra, amely (a javításhoz szükséges) FADH^- állapotba kerül. Ezt követően egy elektron ugrik a második (W359) triptofánról az elsőre, majd a terminális triptofánról (W306) a másodikra, hogy pótolja az elektron hiányt. Kísérleteink során azt állapítottuk meg, hogy a fényabszorpciót követő elektron transzfer kaszkád mintegy 30 ps alatt megvalósul, ami tekintettel a flavin és a terminális triptofán közötti 15 Å távolságot, egy igen hatékony nagy hatótávolságú elektron transzfer folyamat.

Fiziológiás körülmények között a fotoliázban nagy valószínűséggel nem kerül sor fotoaktivációra, az általunk leírt jelenségnek a kriptokrómokban van kiemelkedő szerepe. A kriptokrómok ugyanis olyan a fotoliázokkal homológ fehérjék, amelyek nem képesek a DNS szál javítására. Az általunk karakterizált triptofán lánc (vagy nanodrót) viszont az összes kriptokrómban jól konzervált és kulcsszerepet játszik a fehérje működésében.

A kriptokrómok felfedezésekor – a kilencvenes évek kezdete – eleinte az sem volt világos, hogy mi a fehérje funkciója, innen származik az elnevezés is.



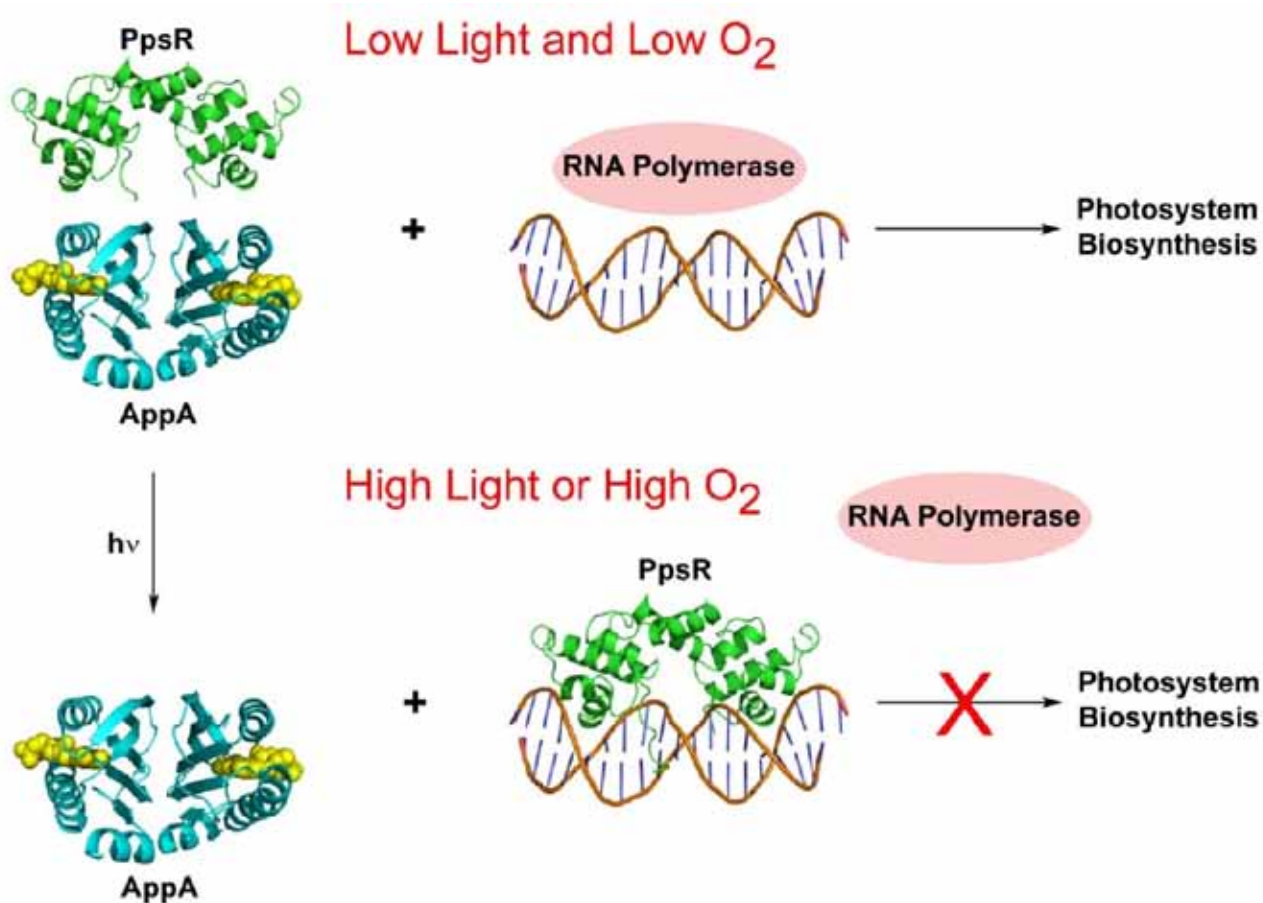
2. ábra. A fotoaktiváció folyamata a triptofán „nanodrót” segítségével [2].

Később kiderült, hogy a fehérje egy kék fény fotoreceptor, amely a növényekben a növekedés szabályozásában vesz részt. 1996-ban fedezték fel, hogy a kriptokrómok emberekben és egerekben is megtalálhatóak, majd 1998-ban sikerült bizonyítani, hogy ezek a fehérjék fénytől függően vagy akár attól függetlenül is a cirkádián ritmus szabályozásában vesznek részt. Nemrégiben vált ismertté a kriptokrómok talán legegzetikusabb funkciója, a föld mágneses terének „érzékelése”, amellyel a költöző madarak tájékozódása megvalósul. A fény abszorpciót követően a kriptokrómokban ugyanis egy flavin és egy triptofán gyök pár jön létre, ami kölcsönhat a föld mágneses terével. A jelenség az elméleti fizikusok fantáziáját is megragadta és besorolták az általuk kvantum biológiának nevezett kategóriájába.

BLUF domén fehérjék

A fotoaktív flavoproteinek másik kiterjedt családját alkotják a BLUF domén fehérjék, ahol az elnevezés (BLUF = blue light using FAD) mindössze arra utal, hogy a kék fény érzékelése az FAD-t tartalmazó domén segítségével valósul meg. A legismertebb és legtöbbet vizsgált BLUF domén fehérje az AppA (activation of photopigment and PUC A protein), amely a *Rhodobacter sphaeroides* nevű fotoszintetikus baktériumban található, feladata a transzkripciók reguláció. Sötétben az AppA hozzákötődik a PpsR (photopigment suppression in *R. sphaeroides*) nevű transzkripciók faktorhoz, intenzív kék színű fény hatására az AppA-PpsR komplex disszociálódik, lehetővé téve a PpsR DNS-hez kötődését, leállítva a fotoszintetikus gének bioszintézisét. Ez a mechanizmus különlegesen érdekes, mivel az N terminálisnál elhelyezkedő BLUF doménben végbemenő fotokémiai folyamatok a C terminálisnál olyan strukturális változásokhoz vezetnek, amelynek eredményeképpen a PpsR leválik az AppA-ról. Saját kísérleteink arra

utalnak, hogy a fényabszorpciót követően az FAD körüli aminosavak hidrogén kötés hálózata átrendeződik [3] és ez indítja el azt a strukturális átrendeződést, amelynek következtében az AppA-PpsR komplex disszociálódik. A fotoaktiválódást és a strukturális átrendeződést különösen érdekessé teszi, hogy a fényabszorpciót követő hidrogén kötés rendszer átrendeződése a pikoszekundumos skálán valósul meg, míg a világos állapotba való teljes átmenet mikroszekundumok alatt jön létre. Az Oxford közeli Rutherford Appleton Laboratory-ban dolgozó kollégáimmal a közelmúltban elsőként végeztünk olyan kísérleteket, amelyek során ugyanazon mérés során a femtoszekundumos-mikroszekundumos skálán tudtuk nyomon követni a fehérjedinamikát tranziens infravörös spektroszkópia segítségével [4] .



3. ábra. Az AppA működése fény hatására [5].

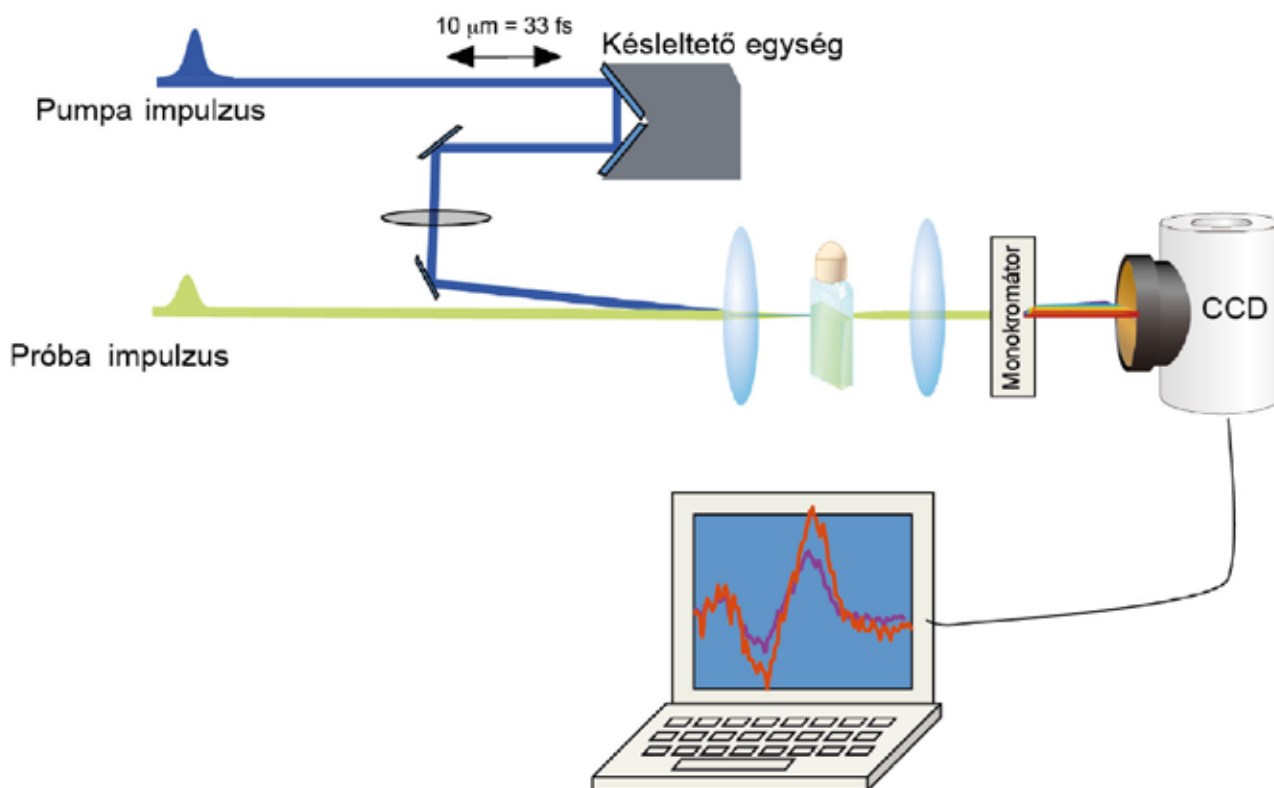
A fotoszintetikus tengeri baktériumok mellett BLUF domén fehérjék végzik el a fény érzékelését például bizonyos organizmusokban a fototaxis során.

A BLUF domén fehérjét tartalmazó proteinek fontos csoportját alkotják az *Acinetobacter* családba tartozó baktériumok. Ez a család azért különösen érdekes, mert több tagja az évek során rezisztens „szuperbaktériummá” vált. Az *A. baumannii* például egy olyan, kórházakban tenyésztő baktérium, amely mára már rezisztenssé vált a legtöbb ismert antibiotikummal szemben. Az *A. baumannii*-ban található BlsA (blue light sensing protein A) fehérjéről néhány éve derült ki, hogy az AppA-hoz hasonló BLUF domént tartalmaz, amely felelős a

baktérium fényérzékeléséért. Kék fény hatására az *A. baumannii* motilitása és a biofilm képződés leáll, virulenciája viszont növekszik. A közelmúltban elsőként végeztük el az *Acinetobacter baumannii* nevű baktérium BlsA nevű fehérjének a spektroszkópiai karakterizálását [6]).

Molekuláris mozi

Tekintettel arra, hogy a fényelnyelést követő molekuláris folyamatok nagyon rövid idő alatt (femto- és pikoszekundum) valósulnak meg, vizsgálatainkhoz ultragyors, úgynevezett femtoszekundumos lézereket – az impulzushossz tízezerszer rövidebb, mint a másodperc milliárdod része – kell használnunk. Ez érthető, ha arra gondolunk, hogy ha egy gyorsan mozgó tárgyról akarunk fényképet készíteni, akkor a zársebességnek nagyon rövidnek kell lennie, hogy a kép ne legyen elmosódott.



4. ábra. Tipikus pumpa-próba spektroszkópiai berendezés. A pumpa és a próba impulzus között eltelt idő egy nagyon érzékeny tükörrendszerrel állítható be. A kísérlet során ezt a távolságot változtatjuk, miközben például az abszorpcióváltozást detektáljuk.

Az ultragyors spektroszkópia során a fényképezőgép szerepét egy úgynevezett próba impulzus játssza; minél rövidebb ez az impulzus, annál rövidebb molekuláris folyamatokat vagyunk képesek megfigyelni. Fotoaktív fehérjéről lévén szó a mérésekhez szükségünk van egy ún. pumpa impulzusra is, ez indítja el a fényaktivált folyamatokat. A mérőrendszer a pumpa – egyben gerjesztő – impulzus elindítása után bizonyos időközönként készít felvételt – abszorpciót mér például – a molekuláról a próba impulzus segítségével. Tekintettel arra,

hogy nagyon rövid időskáláról (femtosekundum-pikosekundum) van szó, a pumpa és a próba impulzus közötti késleltetést nem lehet elektronikusan kontrollálni. Ennek a problémának a kiküszöbölésére egy pontosan állítható mozgatható tükörrendszert alkalmazunk, a fénysebesség ismeretében ugyanis könnyen kiszámolható, hogy a pumpa és a próba impulzus beérkezése között mennyi idő telt el, ha ismerjük az impulzusok által megtett távolságot. Egy 100 mikrométeres hosszkülönbség például a pumpa és a próba impulzus között mintegy 300 femtosekundumnak felel meg. A mérések során tehát ezt a távolságot folyamatosan növelve a próbaimpulzus segítségével számos „pillanatfelvételt” készítünk, amelyekből összeáll végül a molekuláris mozi.

Előretékinítés

A fotoliázokon és a kriptokrómokon végzett kísérleteink során arra a következtetésre jutottunk, hogy ezeknek a fehérjéknek a funkcióját – vagyis, hogy a cirkádián óra szerepét töltik be éppen vagy a DNS szálát javítják – a fehérje által nem kovalensen kötött flavin redox állapota határozza meg. Egy magyar, angol, francia és amerikai együttműködés keretében jelenleg olyan kísérleteket végzünk, amelynek a célja az, hogy a fotoliázt kriptokrómmá kapcsoljuk, a kriptokróмокat pedig fotoliázzá, a flavin redox állapotának megváltoztatásával. Ultragyors spektroszkópiai kísérleteink arra utalnak, hogy ez az átkapcsolás a fotociklusának látványos átalakulásához vezet, miközben elveszti a DNS javításra való képességét.

Irodalomjegyzék

- [1] Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, P., Brettel, K. (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature*, **405**: 586–90.
- [2] Lukacs, A., Eker, A.P.M., Byrdin, M., Brettel, K., 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**: 14394–5.
- [3] 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**: 16893–900.
- [4] Brust, R., Lukacs, A., Haigney, A., Addison, K., Gil, A., Towrie, M., Clark, I. P., Greetham, G.M., Tonge, P.J., Meech, S.R. (2013) Proteins in Action: Femtosecond to Millisecond Structural Dynamics of a Photoactive Flavoprotein. *J Am Chem Soc*, **135(43)**: 16168-16174.

- [5] Anderson, S., Dragnea, V., Masuda, S., Ybe, J., Moffat, K., Bauer, C. (2005) Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **44**: 7998–8005.
- [6] 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 *Acinetobacter baumannii*. *J Phys Chem Lett*, **5(1)**: 220-224.



Lukács András a Budapesti Műszaki Egyetemen szerzett mérnök-fizikus diplomát 1997-ben. 1999-2002 között a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében volt Ph.D. hallgató, 2003-2005 között az R&D Ultrafast Lasers spin-off cégnél dolgozott, 2005-2006 között Marie Curie Ph.D. hallgató volt a franciaországi Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biologie kutatóintézetében. 2007-ben szerzett Ph.D. fokozatot a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán. 2007-2009 között az Ecole Polytechnique, Laboratoire d'Optique et Biologie kutatóintézetében volt posztdoktorális kutató, 2009-2011 között a University of East Anglia vegyész karán dolgozott tudományos főmunkatársként. 2011 óta újra a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében tevékenykedik. Kutatási területe a fotoaktív fehérjék

funkcionális dinamikájának vizsgálata ultragyors spektroszkópiai módszerekkel. Munkáját az elmúlt egy évben az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával megvalósuló TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program Magyar Zoltán posztdoktori ösztöndíjjal támogatta.