

БИОФИЗИКА

УДК 577.25

**LOV- И BLUF-ФЛАВОПРОТЕИНЫ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФОТОРЕЦЕПТОРЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ И ФОТОСЕНСОРНЫЕ АКТИВАТОРЫ
В ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ****Г.Я. Фрайкин¹, М.Г. Страховская^{1,2,*}, Н.С. Беленикина¹, А.Б. Рубин¹**¹ *Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;**Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*² *Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА;**Россия, 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28*** e-mail: marstr@biophys.msu.ru*

В последние годы показано, что LOV (light, oxygen, voltage)- и BLUF (Blue Light sensing Using FAD)-фотосенсорные белки выполняют функции фоторецепторов светорегулируемых процессов не только у эукариот, но и у многих прокариот. У бактериальных фоторецепторов LOV- и BLUF-домены с присоединенными флавиновыми хромофорами часто связаны с разными ферментными и другими эффекторными доменами и составляют модульные системы, переключаемые светом. К настоящему времени достигнут прогресс в раскрытии механизмов фотоактивации таких систем. Они основаны на индуцированных фотореакциями хромофоров изменениях в фотосенсорных доменных структурах и последующей трансдукции сигнала к эффекторным доменам. Знание принципов трансдукции сигнала LOV- и BLUF-фотосенсорами имеет важное значение для создания на их основе фотоперключаемых ферментов и транскрипционных систем, применяемых в оптогенетике — новой и активно развивающейся области клеточной биологии и биотехнологии. Рассматриваются структурные аспекты передачи сигнала светоактивированными LOV- и BLUF-фоторецепторами и их регуляторные функции у бактерий, а также некоторые недавние достижения в использовании LOV-и BLUF-фотосенсоров в качестве активаторов в оптогенетических системах для регуляции клеточных процессов.

Ключевые слова: *LOV- и BLUF-фоторецепторы, трансдукция сигнала, бактерии, регуляция, оптогенетические системы, обзор.*

Фотобиорегуляторные процессы опосредуются специализированными фоторецепторами, которые воспринимают световые сигналы и трансформируют их в биохимические сигнальные каскады, вызывающие физиологические ответы. У растений, грибов и бактерий идентифицировано несколько типов регуляторных фоторецепторов, в том числе чувствительные к красному свету фитохромы, чувствительные к синему свету криптохромы, фототропины и другие белки, содержащие LOV- и BLUF-домены [1].

Фотосенсорные BLUF- и LOV-домены — это короткие (100–140 аминокислотных остатков — а.о.) α/β -модули, способные присоединять в качестве хромофоров флавины (ФАД или ФМН). LOV-доменные белки составляют обширную группу фоторецепторов, первоначально идентифицированные у фототропинов растений, а позднее — у грибов и многочисленных бактерий. Значительно менее распространенные BLUF-доменные белки найдены пока только у некоторых эвгленоидов и бактерий. BLUF-домены отличаются от LOV-доменов осо-

бенностями вторичной структуры и специфическим типом первичных фотопревращений их флавинового хромофора. В BLUF-доменах ФАД в фотовозбужденном состоянии инициирует сопряженный с протоном электронный транспорт между консервативным тирозиновым остатком и хромофором с последующей реорганизацией водородных связей вблизи него (рисунок). В LOV-доменах ФМН под действием синего света подвергается фотоциклу, включающему формирование тиолового аддукта между изоаллоксазиновым кольцом флавина и консервативным цистеиновым остатком белка. Возникающие в фотосенсорных доменах структурные изменения индуцируют модуляцию активности эффекторных доменов или взаимодействующих с фоторецепторами белков [1, 2].

В последнее время достигнут прогресс в понимании механизмов восприятия света и трансдукции сигнала BLUF- и LOV-фоторецепторами, у бактерий выявлены и изучены опосредуемые ими светозависимые регуляторные процессы. Также имеются достижения в разработке на основе LOV- и BLUF-

фотосенсоров оптогенетических систем для световой регуляции клеточных процессов и функций. На этих актуальных вопросах функционирования LOV- и BLUF-фоторецепторов сосредоточено внимание в настоящей обзорной статье.

Регуляторные функции BLUF- и LOV-фоторецепторов

BLUF-фотосенсорные белки. Многие бактериальные фоторецепторы этого класса состоят только из BLUF-домена с двумя С-концевыми α -спиралями; реже они содержат связанные с BLUF-доменом эффекторные домены (см. ниже), активность которых может регулироваться фотовозбужденным BLUF-доменом [3]. Короткие BLUF-фотосенсоры передают сигналы и опосредуют физиологические ответы за счет формирования комплексов с сигнальными белками, т.е. путем светозависимого белок-белкового взаимодействия [4].

Как отмечено выше, в BLUF-доменах фотоцикл ФАД включает сопряженный с протоном перенос

электрона от тирозинового остатка на фотовозбужденный флаavin с переходом его в нейтральный радикал. Это инициирует реориентацию водородных связей вблизи флавинового хромофора, вследствие чего образуется обратимый в темноте интермедиат (ФАД_{red}) со сдвинутым на 10–15 нм в красную область спектром поглощения. Водородная связь, ответственная за образование интермедиата, формируется консервативным глутаминовым остатком, который таутомеризуется при световом возбуждении BLUF-домена [5] (рисунок). Локальные изменения в ориентации водородных связей вызывают конформационные изменения в флавин-связывающем кармане, которые, распространяясь через $\beta 5$ -лист и С-концевые α -спирали BLUF-домена, оказывают модулирующее влияние на активность эффекторных доменов [6].

Согласно недавно полученным данным, фотовозбужденный BLUF-домен регулирует каталитическую активность ферментных эффекторных доменов, участвующих в синтезе и распаде вторич-

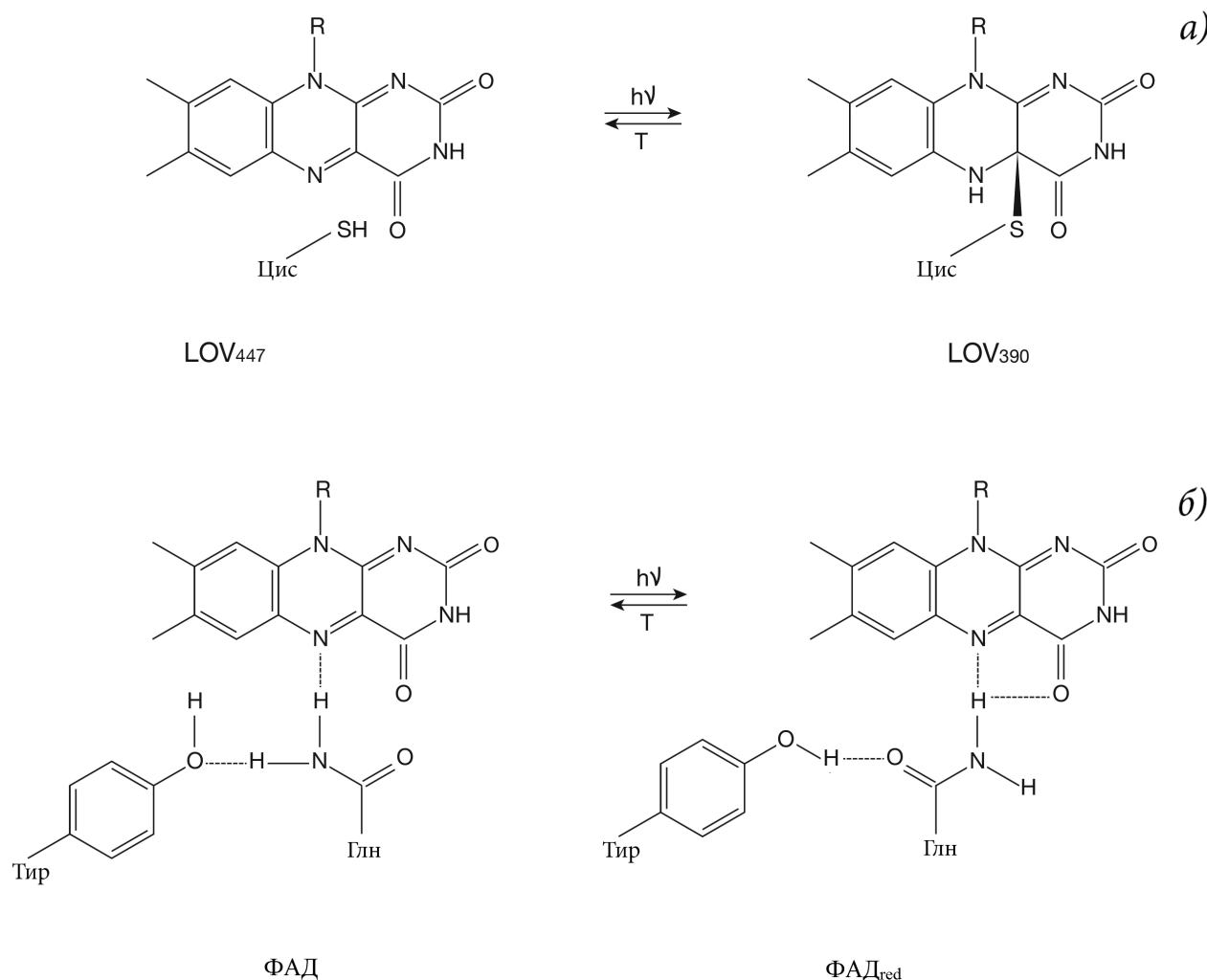


Рисунок. Индуцированное светом ($h\nu$) формирование в LOV-домене обратимого в темноте (T) ФМН-цистеинильного аддукта, выявляемого по сдвигу максимума поглощения от 447 нм (LOV_{447}) к 390 нм (LOV_{390}) (а); индуцированная светом ($h\nu$) реорганизация сети водородных связей между ФАД и тирозиновым/глутаминовым остатками вызывает образование в BLUF-домене обратимого в темноте (T) интермедиата ФАД_{red} (б)

ных мессенджеров. У фотосенсорного белка из бактерий *Klebsiella pneumoniae*, BlrP1 (blue-light regulated phosphodiesterase) (табл. 1), BLUF- домен модулирует ц-ди-ГМФ-фосфодиэстеразную активность ковалентно присоединенного к нему EAL-домена [7]. Кристаллографический анализ BlrP1 свидетельствует о димерном устройстве EAL-доменов с консервативным контактом, создаваемым составной спиралью, формируемой из коротких спиралей каждого протомера. Фотосенсорные BLUF-домены расположены близко к участку димеризации, и при поглощении света BLUF-доменом одной субъединицы антипараллельного гомодимера стимулируется фосфодиэстеразная активность EAL-домена другой субъединицы [7]. Регуляция активности EAL-домена BLUF-сенсором осуществляется посредством двусторонней аллостерической связи между фотоиндуцированными структурными изменениями и активным центром EAL [8]. Световые сигналы от обоих BLUF-доменов объединяются в консервативном участке димеризации EAL и передаются к активному центру ферментного домена, вызывая его активацию.

У выявленного у бактерий *Beggiatoa* sp. фотосенсорного белка, содержащего BLUF-домен, связанный с аденилилциклазой, bPAC (photoactivated adenylyl cyclase) [9] (или BlaC [10]), обнаружено фотоиндуцированное повышение активности этого фермента и уровня клеточного цАМФ (табл. 1). Представляют интерес данные о превращении BlaC в гуанилатциклазу путем сконструированной модели нуклеотидилциклазного домена, в котором заменено несколько а.о. Тройной мутант, BlgC, обладает фотоактивированной гуанилатциклазой *in vitro*. Синий свет вызывает у мутанта *Escherichia coli*, экспрессирующего BlaC, значительное повышение уровня цГМФ [10].

В последнее время появились сведения о фотобиологических функциях BLUF-фоторецепторов, которые контролируют такие биологические ответы, как фототаксис (Pix D у *Synechocystis* sp.), формирование биопленок (YcgF у *E. coli*, PapB у *Rhodospseudomonas palustris*), вирулентность (BlsA у *Acinetobacter baumannii*) и синтез компонентов аппарата фотосинтеза (AppA у *R. sphaeroides*) [6]. Действие отмеченных фоторецепторов основано на светозависимых белок-белковых взаимодействиях. В недавних исследованиях получена новая информация о молекулярных деталях этих светорегулируемых процессов.

Участвующий в контроле фототаксиса у *Synechocystis* sp. короткий BLUF-фотосенсор PixD (табл. 1) взаимодействует в темноте с регуляторным белком PixE, который индуцирует формирование олигомерного комплекса, состоящего из 10 субъединиц PixD и 5 субъединиц PixE [11]. При световом возбуждении PixD происходят конформационные изменения, сопровождаемые распадом комплекса на димеры PixD и мономеры PixE [4]. Предполагается, что именно этот фотоиндуциро-

ванный процесс запускает сигнальный каскад, контролирующий фототаксис бактерий [11].

У другого короткого BLUF-белка — PapB из *R. palustris*, фотобиологическая функция связана с отрицательной регуляцией формирования биопленки. В основе фототаксиса лежит взаимодействие PapB с ц-ди-ГМФ-специфичной фосфодиэстеразой PapA, активность которой повышается при световом возбуждении фотосенсора. PapB, в отличие от рассмотренного выше PixD, образующего комплекс с белком PixE только в темноте [11], взаимодействует с PapA и на свету. Это свидетельствует о различиях в механизмах взаимодействия двух фотосенсоров с соответствующими белками в сигнальных каскадах, контролирующих разные фотобиологические процессы — фототаксис или формирование биопленки [6, 12].

BLUF-белок *E. coli* YcgF (табл. 1) содержит EAL-домен, однако, в отличие от сходного с ним по доменной организации фоторецептора BlrP1 (см. выше), YcgF не связывается с ц-ди-ГМФ и его EAL-домен не обладает фотоиндуцированной фосфодиэстеразной активностью. Установлено, что YcgF функционирует как антагонист транскрипционного регулятора YcgE [13]. Действие YcgE в качестве репрессора осуществляется путем его связывания с промоторами в опероне, кодирующем белки, которые могут активировать вещества матрикса биопленки. Фотовозбужденный YcgF временно формирует гомодимеры, вызывая диссоциацию комплекса YcgE — YcgF и высвобождая репрессор из оперона. Это указывает на фотосенсорную функцию YcgF при модуляции формирования биопленки клетками *E. coli* [13].

Результаты этого исследования показывают, что у BLUF-белка с вырожденным EAL-доменом синий свет может активировать биологическую функцию, отличную от ферментативной, за счет светозависимого белок-белкового взаимодействия.

Фоторецептор бактерий *R. sphaeroides* AppA (табл. 1) — свето- и редокс-регулятор экспрессии фотосинтетических генов, состоит из BLUF-домена и редокс-сенсорного домена SCHIC (Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin) [6]. Свет и кислород воспринимаются посредством AppA — PpsR-регуляторной системы, где PpsR — репрессор фотосинтетических генов, содержащий (НТН)-мотив (helix — turn — helix — motif) для связывания с ДНК, а AppA — антирепрессор, способный через SCHIC-домен образовывать нековалентный AppA — PpsR₂-комплекс.

В недавней работе на основе анализа кристаллических структур обоих белков и их комплекса показано, что световая активация AppA изменяет эффекторную область PpsR внутри комплекса. Кроме того, продемонстрировано формирование светочувствительного тройного комплекса AppA — PpsR — DNA, через который может передаваться сигнал посредством аллостерических структурных изменений. Согласно предложенному механизму,

фотомодифицированный комплекс AppA — PpsR₂ взаимодействует с сайтами связывания PpsR на ДНК, предотвращая формирование PpsR–DNA-репрессорного комплекса, что приводит к активации экспрессии фотосинтетических генов [14].

LOV-фотосенсорные белки. Фотосенсорная функция LOV-домена была впервые выявлена при идентификации фототропина, содержащего два ФМН-связывающих LOV-домена, из которых основным в регуляции активности фоторецептора является LOV2, соединенный Jα-спиралью с эффекторным серин-треонин-киназным доменом. Фотоцикл ФМН с максимумом поглощения при 447 нм (LOV₄₄₇) включает обратимое в темноте образование ФМН-цистеинильного аддукта (LOV₃₉₀) (рисунок). Эта форма является сигнальным состоянием фоторецептора, которое связано с индуцированной формированием аддукта деструктуризацией Jα-спирали и последующим повышением киназной активности [1, 2].

Важно отметить, что аналогичный принцип световой активации LOV-белков (за исключением некоторых деталей структурных механизмов трансдукции сигнала) сохранен среди отдаленных филогенетических групп организмов, включая грибы и бактерии [1, 2, 15, 16]. Все LOV-фоторецепторы грибов и бактерий содержат один LOV-домен, причем у многих прокариот он тесно связан с различными эффекторными доменами, образуя модульные системы, активность которых может регулироваться светом.

У грибов базовыми представителями LOV-фоторецепторной системы являются два ФАД-содержащих LOV-доменных белка: WC-1 (White Collar) и VVD, опосредующие световую регуляцию запуска и фазы циркадного ритма у *Neurospora crassa* [17]. Фотосенсорный белок WC-1 представляет собой транскрипционный фактор, формирующий с другим транскрипционным фактором WC-2 гетеродимерный комплекс WCC. Фотоактивация WC-1 в этом комплексе вызывает гомодимеризацию WCC [18]. Активированный светом WC-комплекс индуцирует транскрипцию многих светоиндуцибельных генов, включая ген, кодирующий фотосенсор VVD, необходимый для правильной регуляции циркадных ритмов [17, 19]. Индуцированные формированием фотоаддукта конформационные изменения в LOV/ VVD сопровождаются гомодимеризацией VVD и его взаимодействием с WCC [20], что определяет образование отрицательной обратной связи с WCC при контроле суточной экспрессии генов.

Современная модель антагонистического действия VVD по отношению к WC-комплексу основана на прямом взаимодействии и конкурентной гетеродимеризации между VVD — VVD/LOV и WC-1/LOV [18, 19]. Образование гетеродимера VVD:WC-1 обеспечивает адаптацию организма к свету, поскольку блокирует первоначально ини-

цированную волну генной экспрессии в условиях продолжающегося освещения, препятствуя тем самым сверхэкспрессии WCC-транскрибируемых генов [18, 19, 21].

У бактериальных LOV-фоторецепторов, содержащих связанные с фотосенсорным доменом различные эффекторные домены, в последние годы выявлена регулируемая светом активность, а для некоторых из них обнаружены фотобиологические функции [2, 15]. LOV-гистидин (H)-киназы, содержащиеся у бактерий *Caulobacter crescentus* (LovK), *Brucella abortus* (LOV-HK) (табл. 2) и *Pseudomonas syringae*, проявляют типичные для LOV-доменов фотоциклы флавинового хромофора, которые сопровождаются изменением третичной структуры и аутофосфорилированием киназ *in vitro*, а также переносом фосфатной группы на соответствующие белки — регуляторы ответов (RRs) (табл. 2). Таким образом, у LOV-киназ RRs составляют двухкомпонентную систему трансдукции светового сигнала [3]. Фотоактивация LovK и LOV-HK вызывает физиологические ответы у бактерий: у *B. abortus* наблюдается 10-кратное повышение уровня пролиферации клеток в макрофагах, а у *C. crescentus* — резкое увеличение адгезии клеток [15].

У цианобактерий *Synechococcus elongatus* LOV-домен, связанный с GGDEF-EAL-доменами, опосредует фотоиндуцированную регуляцию фосфоэстеразной активности EAL *in vitro* [22] (табл. 2). На основании этого факта предполагается, что активированный синим светом LOV-домен может контролировать уровень клеточного ц-ди-ГМФ, который участвует как вторичный мессенджер в регуляции ряда физиологических функций (подвижность, вирулентность и др.).

У бактерий *Bacillus subtilis* LOV-STAS (Sulfate transporter/antisigma-factor antagonist)-белок YtvA (табл. 2) функционирует как фоторецептор *in vitro* и *in vivo*. STAS-домен определяет модулируемое синим светом свойство YtvA связывать *in vitro* ГТФ, который является вторичным мессенджером в ответах на стресс *B. subtilis*. Кроме того, фотоактивированный YtvA *in vivo* действует как положительный регулятор транскрипционного фактора общего стресса σB [23]. Поскольку мутации, нарушающие связывание ГТФ в STAS-домене или междоменное распространение светоиндуцированного сигнала в фоторецепторе, подавляют активированную синим светом σB-зависимую транскрипцию *in vivo*, считается, что связывание ГТФ необходимо для проявления функциональной активности YtvA [23–25].

Исследования структурных изменений, происходящих в LOV-домене YtvA, который соединен с эффекторным STAS-доменом Jα-спиралью, показали, что, в отличие от таковых у фототропинов, они не затрагивают деструктуризацию Jα-спирали [24, 26]. Это связано с различиями в четвертичной структуре и ориентации Jα, которая у YtvA-LOV-домена образует “coiled-coil”-конфигурацию [23]. Изолированные YtvA-LOV-домены представляют

Таблица 1

Первичные фотониндуцированные процессы и регуляторные функции у отдельных BLUF-фоторецепторов бактерий

Тип фоторецептора	Первичные фотониндуцированные процессы в BLUF-фотосенсорах	Структурные основы трансдукции сигнала	Регуляция клеточных процессов и функций
PixD (BLUF)	Сопряжённый с протоном перенос электрона от Тир-остатка на фотовозбуждённый флавин с переходом его в нейтральный радикал; реориентация водородных связей вблизи хромофора и образование интермедиата ФАДгед; конформационные изменения в C-концевых α-спиралях BLUF-домена [1, 2, 6]	Изменение конформации PixD и распад олигомерного комплекса PixD с регуляторным белком PixE [11]	Контроль фототаксиса <i>Synechocystis</i> sp. [11]
BlgP1 (BLUF — EAL)		Аллостерическая двусторонняя связь между изменениями структуры BLUF-домена и активным центром EAL в димерном BlgP1 [8]	Стимуляция фосфодиастеразной активности EAL-домена у <i>K. pneumoniae</i> [7]
YcgF (BLUF — EAL)		Диссоциация комплекса димера YcgF с транскрипционным репрессором YcgE, сопровождаемая его высвобождением из оперона [13]	Формирование биоплёнки клетками <i>E. coli</i> [13]
AppA (BLUF — SCHIC)		Аллостерические структурные изменения в комплексе AppA — PpsR — ДНК. Взаимодействие комплекса AppA — PpsR с сайтами связывания репрессора PpsR на ДНК предотвращает формирование PpsR — ДНК-репрессорного комплекса [14]	Активация экспрессии фотосинтетических генов. Синтез компонентов аппарата фотосинтеза у <i>R. sphaeroides</i> [6, 14]
bPAC (BLUF — AC)		Не исследованы	Повышение активности аденилилизклазы (AC) и уровня cAMP у <i>Beggiatoa</i> sp. [9]

Таблица 2

Первичные фотониндуцированные процессы и регуляторные функции у некоторых выбранных LOV-фоторецепторов бактерий

Тип фоторецептора	Первичные фотониндуцированные процессы в LOV-доменах	Структурные основы трансдукции сигнала	Регуляция клеточных процессов и функций
LovK (LOV — H-киназа)	Фотовозбуждённый ФМН подвергается фотоциклу, который включает образование тиолового аддукта между изоаллоксазинным кольцом хромофора и Цис-остатком белка; конформационные изменения в LOV-домене, инициируемые реориентацией глутаминового остатка и изменением водородных связей с участием периферических а.о. — специфических трансмиттеров сигнала [1, 2, 15]	Изменения третичной структуры H-киназного домена [2, 15]	Фосфорилирование H-киназы и трансфосфорилирование белка — регулятора ответа (RR). Увеличение степени адгезии клеток <i>C. crescentus</i> [3, 15]
LOV — HK (LOV — H-киназа)		Изменения третичной структуры H-киназного домена [2, 15]	Фосфорилирование H-киназы и трансфосфорилирование белка — регулятора ответа (RR). Повышение уровня пролиферации клеток <i>B. abortus</i> [3, 15]
YtrA (LOV — STAS)		Конформационные изменения в LOV-димере вызывают поворот двух мономеров на 4–5° относительно друг друга [26]. Влияние этих структурных изменений на конформацию STAS-домена не исследовано	Связывание ГТФ STAS-доменом. Положительная регуляция транскрипционного фактора общего стресса σB у <i>B. subtilis</i> [23]
LOV — GGDEF-EAL		Не исследованы	Регуляция фосфодиастеразной активности EAL у LOV-фоторецептора из <i>S. elongates in vitro</i> [22]

собой конститутивные димеры, мономеры которых при фотоактивации поворачиваются относительно друг друга на 4–5° [26]. В распространении светоиндуцированных структурных перестроек в YtvA-LOV, как и в LOV-доменах фототропина и VVD, первостепенную роль играет глутаминовый остаток, подвергающийся реориентации в своей боковой цепи.

Анализ данных, полученных при изучении структурных аспектов передачи сигнала в LOV-фоторецепторах, показывает, что у бактериальных, как и эукариотных, LOV-белков трансдукция светового сигнала на начальных стадиях происходит по общему механизму. В его основе лежат вызываемые формированием фотоаддукта конформационные изменения β -листа LOV-ядра. В их инициации важное значение имеет консервативный остаток глутамина, непосредственно взаимодействующий с фотоактивированным флавиновым хромофором. Перестройка глутамина индуцирует изменение водородных связей с участием нескольких периферических а.о., которые отличаются у разных LOV-белков и действуют как специфические транзиттеры сигнала (табл. 2). Также различаются структурные механизмы последующих этапов передачи сигнала, обеспечивающие способность LOV-доменов регулировать активность эффекторных доменов [15].

Применение LOV- и BLUF-фотосенсоров в оптогенетических системах

Оптогенетика — новая область биологии клетки, объединяющая оптические и генетические подходы для регуляции клеточных процессов светом с использованием фотосенсорных белков. В последние годы оптогенетика становится одной из ключевых биотехнологий, поскольку генетически закодированные фотосенсорные активаторы могут быть функционально введены в клетки любого типа, где после световой активации, происходящей с высокой пространственно-временной точностью, они способны индуцировать регуляцию экспрессии генов, ферментативной активности и других биологических функций [27].

LOV- и BLUF-фотосенсоры обладают ключевыми свойствами, идеально подходящими для применения в оптогенетике. Они имеют малый размер и используют в качестве хромофоров фотохимически активные флавиновые кофакторы, присутствующие во всех типах клеток. Кроме того, способность LOV-и BLUF-фотосенсоров образовывать функциональные модульные структуры с эффекторными доменами служит основой для конструирования их комбинаций с другими белками/ферментами, активность которых подлежит светоиндуцированному аллостерическому контролю [28 — 31].

В ряде исследований для аллостерического контроля функций белков использован LOV2-домен растительного фототропина, который подвер-

гается большим структурным изменениям при фотовозбуждении. LOV2- Ja присоединяется к белку — мишени таким образом, что конформационные изменения в LOV2 индуцируют конформационные изменения в белке. По такому механизму LOV2- Ja вызывает светозависимую регуляцию активности ряда ферментов, в том числе при экспрессии в животные клетки [32 — 34].

Особый интерес представляют данные о регуляции светом ГТФазы Rac1 в фибробластах, экспрессирующих гибридный LOV2- Ja –Rac1-белок [33]. Показано, что в темноте LOV2 стерически ингибирует активность Rac1, блокируя его связывание с эффекторными белками. Действие сфокусированного лазерного света вызывает деструктуризацию Ja -спирали, снимая стерическое ингибирование и обеспечивая тем самым взаимодействие Rac1 с эффекторными молекулами. Поскольку Rac1 является ключевым белком, регулирующим динамику цитоскелета, полученные результаты демонстрируют, что световое воздействие может быть использовано для дистанционного контроля подвижности клеток, экспрессирующих фотоактивируемый Rac1 [33].

Фоторегуляторное действие LOV2- Ja показано также в отношении ДНК-связывающей активности гибридного белка, включающего бактериальный репрессор триптофана TrpR [35]. В основе светоиндуцированного связывания лежит отсоединение Ja -спирали от LOV-ядра, сопровождаемое конформационным изменением и активацией эффекторного домена (TrpR).

Отметим, что помимо использования фототропинового LOV2 в качестве светозависимого регулятора биологических процессов, на основе этого домена созданы флуоресцентные репортерные молекулы [2, 27, 30]. Они успешно применяются для контроля популяций бактерий в анаэробных условиях либо вирусных инфекций растений. В этих случаях LOV-доменный репортер с достаточно интенсивной зелёной флуоресценцией флавинового хромофора превосходит GFP (green fluorescent protein), у которого для образования флуоресцирующего хромофора требуется присутствие кислорода. Хотя флуоресценция флавинового хромофора исчезает при фотохимическом образовании цистеинильного аддукта, этот процесс может быть предотвращен путём замены цистеинового остатка на аланин или серин, что обеспечивает постоянно флуоресцирующую молекулу.

Наряду с LOV2- Ja для оптогенетических применений исследуются также бактериальные LOV-фотосенсоры. На основе свойства бактериальных LOV-доменных фоторецепторов включать в состав в качестве эффекторного домена Н-киназу сконструирована синтетическая регулируемая светом Н-киназа, у которой нефоточувствительный PAS-домен от сенсора кислорода FixL из бактерий *Bradyrhizobium japonicum* заменен на LOV-домен фоторецептора YtvA из *B. subtilis* [36]. Дальнейшее применение этого гибридного белка связано с ин-

женерией плазмид для светорегулируемой индукции (pDawn) или репрессии (pDusk) бактериальных генов [37].

Недавно с помощью генной инженерии созданы и другие контролируемые светом транскрипционные системы. Весьма перспективной представляется конструкция, состоящая из LOV-фотосенсорного белка VVD из *N. crassa*, ДНК-связывающего и активационного доменов, которая используется для контроля экспрессии генов в животных клетках [38]. Также значительный интерес вызывает изучение LOV-доменов, идентифицированных недавно в геномах бактерий, выделенных из разных мест обитания, в том числе экстремальных [39]. Соединение этих фотосенсорных модулей с различными эффекторными доменами может предоставить обширный выбор конструкций для оптогенетических систем.

Исследование BLUF-фотосенсоров для применения в оптогенетике инициировали работы с использованием РАС из *Euglena gracilis* — фоторецептора, содержащего цАМФ-циклазу. Экспрессированный в нейроны животных, BLUF-фоторецептор вызывает светозависимую активацию циклазы,

сопровождаемую быстрым повышением уровня цАМФ, который посредством каскада фосфорилирования регулирует генную экспрессию и ряд биологических процессов [40].

Рассмотренная выше BLUF-аденилициклаза (bPAC/BlaC) бактерий *Beggiatoa* sp. перспективна для последующего применения в оптогенетике. Действительно, светоактивированная bPAC проявляет высокую эффективность в цАМФ-регулируемых процессах, включая поведенческие реакции, при интеграции с нейронами некоторых животных [9]. Кроме того, BlaC посредством мутации может быть конвертирована в фотоактивируемую цГМФ-циклазу (BlgC), расширяя область ее применения [10]. Как известно, продукты аденилил- и гуанилилциклаз, цАМФ и цГМФ, являются универсальными вторичными мессенджерами, которые регулируют многие процессы у организмов. Поэтому свойство бактериальных РАС контролировать под действием света синтез цАМФ/цГТФ в сочетании с их малым размером и высокой степенью световой активации открывает перспективы для применения этих BLUF-циклазных фоторецепторов в оптогенетике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes // Biochemistry (Mosc.). 2013. Vol. 78. N 11. P. 1238–1253.
2. Losi A., Gartner W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors // Photochem. Photobiol. 2011. Vol. 87. N 3. P. 491–510.
3. Losi A., Gartner W. Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. Vol. 7. N 10. P. 1168–1178.
4. Yuan H., Dragnea V., Wu Q., Gardner K.H., Bauer C.E. Mutational and structure studies of the PixD BLUF output signal that affects light-regulated interaction with PixE // Biochemistry. 2011. Vol. 50. N 29. P. 6365–6375.
5. Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Domratheva T. Photoinduced electron transfer facilitates tautomerization of the conserved signaling glutamine side chain in BLUF protein light sensors // J. Phys. Chem. B. 2013. Vol. 117. N 8. P. 2369–2377.
6. Masuda S. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors // Plant Cell Physiol. 2013. Vol. 54. N 2. P. 171–179.
7. Barends T.R.M., Hartmann E., Griesse J.J., Beitlich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase // Nature. 2009. Vol. 459. N 7249. P. 1015–1018.
8. Winkler A., Udvardhelyi A., Hartmann E., Reinstein J., Menzel A., Shoeman R.L., Schlichting I. Characterization of elements involved in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states // J. Mol. Biol. 2014. Vol. 426. N 4. P. 853–868.
9. Stierl M., Stumpf P., Udvari D., Gueta R., Hagedorn R., Losi A., Gartner W., Peterleit L., Efetova M., Schwarzel M., Oertner T.G., Nagel G., Hegemann P. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa* // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. N 2. P. 1181–1188.
10. Ryu M.-H., Moskvina O.V., Siltberg-Liberles J., Gomelsky M. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. N 53. P. 41501–41508.
11. Tanaka K., Nakasone Y., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. Time-resolved tracking of inter-protein signal transduction: *Synechocystis* PixD — PixE complex as a sensor of light intensity // J. Amer. Chem. Soc. 2012. Vol. 134. N 20. P. 8336–8339.
12. Ren S., Sawada M., Hasegawa K., Hayakawa Y., Ohta H., Masuda S.A. PixD — PapB chimeric protein reveals the function of the BLUF domain C-terminal α -helices for light-signal transduction // Plant Cell Physiol. 2012. Vol. 53. N 9. P. 1638–1647.
13. Tschowri N., Linderberg S., Hengge R. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signaling pathway of *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2012. Vol. 85. N 5. P. 893–906.
14. Winkler A., Heintz U., Lindner R., Reinstein J., Shoeman R.L., Schlichting I. A ternary AppA — PpsR — DNA complex mediates light-regulation of photosynthesis-related gene expression // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. Vol. 20. N 7. P. 859–867.
15. Herrou J., Crosson S. Function, structure, and mechanism in bacterial photosensory LOV proteins // Nat. Rev. Microbiol. 2011. Vol. 9. N 10. P. 713–723.
16. Losi A., Gartner W. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // Ann. Rev. Plant Biol. 2012. Vol. 63. P. 49–72.
17. Chen C.-H., Loros J.J. *Neurospora* sees the light // Commun. Integrat. Biol. 2009. Vol. 2. N 5. P. 448–451.
18. Malzahn E., Ciprianidis S., Kaldi K., Schafmeier T., Brunner M. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains // Cell. 2010. Vol. 142. N 5. P. 762–772.
19. Chen C.H., DeMay B.S., Gladfelter A.S., Dunlap J.C., Loros J.J. Physical interaction between VIVID and white

- collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. N 38. P. 16715–1672.
20. Zoltowski B.D., Crane B.R. Light activation of the LOV protein VIVID generates a rapidly exchanging dimer // Biochemistry. 2008. Vol. 47. N 27. P. 7012–7019.
21. Hunt S., Thompson S., Elvin M., Heintzen C. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. N 38. P. 16709–16714.
22. Cao Z., Livoti E., Losi A., Gartner W. A blue light-inducible phosphodiesterase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* // Photochem. Photobiol. 2010. Vol. 86. N 5. P. 606–611.
23. Avila-Perez M., Vreede J., Tang Y., Bende O., Losi A., Gartner W., Hellingwerf K. In vivo mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*: mechanism of light activation of the general stress response // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. N 37. P. 24958–24964.
24. Tang Y., Cao Z., Livoti E., Krauss U., Jaeger K.-E., Gartner W., Losi A. Interdomain signaling in the blue-light sensing and GTP-binding protein YtvA: a mutagenesis study uncovering the importance of specific protein sites // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. N 1. P. 47–56.
25. Nakasone Y., Hellingwerf K.J. On the binding of BODIPY — GTP by the photosensory protein YtvA from the common soil bacterium *Bacillus subtilis* // Photochem. Photobiol. 2011. Vol. 87. N 3. P. 542–547.
26. Jurk M., Dorn M., Kekhney A., Svergun D., Gartner W., Schmieder P. The switch that does not flip: the blue-light receptor YtvA from *Bacillus subtilis* adopts an elongated dimer conformation independent of the activation state as revealed by combined AUC and SAXS study // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 403. N 1. P. 78–87.
27. Pathak G.P., Vrana J.D., Tucker C.L. Optogenetic control of cell function using engineered photoreceptors // Biol. Cell. 2013. Vol. 105. N 2. P. 59–72.
28. Moglich A., Moffat K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. N 10. P. 1286–1300.
29. Zoltowski B.D., Gardner K.H. Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein — protein interactions // Biochemistry. 2011. Vol. 50. N 1. P. 4–16.
30. Christie J.M., Gawthorne J., Young G., Fraser N.J., Roe A.J. LOV to BLUF: flavoproteins contributions to the optogenetic toolkit // Mol. Plant. 2012. Vol. 5. N 3. P. 533–544.
31. Krauss U., Drepper T., Jaeger K.E. Enlightened enzymes: strategies to create novel photoresponsive proteins // Chem. Eur. J. 2011. Vol. 17. N 9. P. 2552–2560.
32. Krauss U., Lee J., Benkovic S.J., Jaeger K.E. LOVely enzymes — towards engineering light-controllable biocatalysts // Microb. Biotech. 2010. Vol. 3. N 1. P. 15–23.
33. Wu Y.I., Frey D., Lungu O.I., Jaehrig A., Schlichting I., Kuhlman B., Hahn K.M. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells // Nature. 2009. Vol. 461. N 7260. P. 104–108.
34. Wang X., He L., Wu Y.I., Hahn K.M., Montell D.J. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement *in vivo* // Nat. Cell Biol. 2010. Vol. 12. N 6. P. 591–597.
35. Strickland D., Yao X., Gawlak G., Rosen M.K., Gardner K.H., Sosnick T.R. Rationally improving LOV domain-based photoswitches // Nat. Methods. 2010. Vol. 7. N 8. P. 623–626.
36. Moglich A., Ayers R.A., Moffat K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 385. N 7. P. 1433–1444.
37. Ohlendorf R., Vidavski R.R., Eldar A., Moffat K., Moglich A. From Dusk till Dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 416. N 3. P. 534–542.
38. Wang X., Chen X., Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. N 3. P. 266–269.
39. Pathak G.P., Losi A., Gartner W. Metagenome-based screening reveals worldwide distribution of LOV-domain proteins // Photochem. Photobiol. 2012. Vol. 88. N 1. P. 107–118.
40. Weissenberger S., Schultheis C., Liewald J.F., Erbguth K., Nagal G., Gottschalk A. PACa — an optogenetic tool for *in vivo* manipulation of cellular cAMP levels, neurotransmitter release, and behavior in *Caenorhabditis elegans* // J. Neurochem. 2011. Vol. 116. N 6. P. 616–625.

Поступила в редакцию
06.07.2015 г.

LOV AND BLUF FLAVOPROTEINS: REGULATORY PHOTORECEPTORS OF MICROORGANISMS AND PHOTSENSORY ACTUATORS IN OPTOGENETIC SYSTEMS

G.Ya. Fraikin¹, M.G. Strakhovskaya^{1,2,*}, N.S. Belenikina¹, A.B. Rubin¹

¹ Department of Biophysics, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Service
and Medical Technologies FMBA, Orekhovii bulvar 28, Moscow, 115682, Russia;

*e-mail: marstr@biophys.msu.ru

In recent years, it has been shown that LOV (light, oxygen, voltage) and BLUF (Blue Light sensing Using FAD) photosensory proteins are functioning as photoreceptors of light-regulated processes not only in eukaryotes but also in numerous prokaryotes. In bacterial photoreceptors, LOV and BLUF domains with attached flavin chromophores are often associated with different effector domains, which possess enzymatic and other functions, constituting modular light-switchable systems. Nowadays, progress has been achieved in uncovering the photoactivation mechanisms of such systems, which based on the chromophore photoreaction-induced changes

in the photosensory domain structures and subsequent signal transduction to the effector domains. Knowledge of signal transduction principles in LOV and BLUF photosensors is important for designing on their basis photo-switchable enzymes and transcriptional systems, which have been applied in optogenetics — a new field in cell biology and biotechnology. The structural aspects of signal transduction by light-activated LOV and BLUF photoreceptors and their regulatory functions in bacteria as well as on some recent advances in using LOV and BLUF photosensors as actuators in optogenetic systems for regulation of cellular processes are discussed.

Key words: *LOV and BLUF photoreceptors, signal transduction, bacteria, regulation, optogenetic systems, review.*

Сведения об авторах:

Фрайкин Григорий Яковлевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: gfraikin@yandex.ru

Страховская Марина Глебовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: marstr@biophys.msu.ru

Беленикина Наталья Серафимовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: nata.belenikina@ya.ru

Рубин Андрей Борисович — докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, проф., зав. кафедрой биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: rubin@biophys.msu.ru