

ОБЗОР

УДК 577.25

Фотосенсорные и сигнальные свойства криптохромов

Г.Я. Фрайкин 

*Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: gfraikin@yandex.ru*

Белковые сенсоры синего света криптохромы составляют обширный класс фоторецепторов, которые регулируют процессы развития у растений и циркадные ритмы у животных и растений. Также эти фоторецепторы могут функционировать как магниторецепторы. В последнее время у нескольких фотосинтезирующих водорослей открыты и охарактеризованы криптохромы, которые могут действовать не только как регуляторные фоторецепторы, но и как фотолиазы, катализирующие репарацию повреждений ДНК ультрафиолетовым излучением. Все криптохромные белки связывают в качестве хромофора флавинадениндинуклеотид (ФАД) в гомологичном фотолизе домене (photolyase homology region, PNR). Кроме того, они содержат C-концевое удлинение (cryptochrome C-terminal extension, CCE), которое присоединено к PNR вблизи ФАД-связывающего сайта. Хромофор ответственен за фотосенсорные свойства криптохромов, а CCE-домен необходим для их сигнальной активности. Фотосенсорные процессы инициируются фотохимическими превращениями ФАД, включающими перенос электрона/протона и формирование редокс-форм. Эти реакции приводят к изменениям в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка составляют молекулярную основу сигнальной активности криптохромов в живых системах. У криптохромов растений белок с фотовосстановленным ФАД подвергается конформационному изменению, вызывающему разобщение PNR-домена и CCE, что сопровождается образованием функционально активных димеров/тетрамеров криптохромных молекул. Фотоолигомеризация рассматривается как ключевой процесс, необходимый для сигнальной активности криптохромов, поскольку олигомеры обеспечивают формирование их комплексов с разнообразными белками — компонентами сигнальных путей фоторецепторов. Взаимодействия «криптохром—белок» в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, что приводит к изменению экспрессии генов и фотоморфогенезу. В обзоре обсуждаются современные представления о фотосенсорных и сигнальных свойствах криптохромов.

Ключевые слова: криптохромы, фоторецепторы, ФАД-хромофор, редокс-формы, фотоактивация, сигнальные механизмы

Свет ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областей электромагнитного спектра солнца (290–800 нм) — ключевой стимул окружающей среды, который воспринимается организмами всего биологического царства. Помимо его роли как основного источника энергии в фотосинтезе, свет несет жизненно важную информацию о пространстве и времени, способствуя организмам адаптироваться в условиях среды обитания. Широко распространенными видами физиологической адаптации к поглощению света являются поведенческие реакции, процессы развития и запуск циркадных ритмов.

Живые системы детектируют световые стимулы посредством сенсорных фоторецепторов, которые конвертируют физический сигнал в биохимические сигнальные каскады и последующие фотобиологические ответы. Сенсорные фоторе-

цепторные белки обычно содержат молекулы хромофоров, чувствительных к фотонам разной энергии. Поглощение фотона хромофором фоторецептора в адаптированном к темноте состоянии инициирует серию фотохимических реакций («фотоцикл»), которые связывают хромофор с окружающей белковой структурой. Возникающие изменения проявляются в переходе фоторецептора из «темнового» (неактивного) состояния в адаптированное к свету, или «сигнальное», конформационное состояние. Такой переход означает фотоактивацию фоторецептора. Обычно фотоцикл полностью обратим, т.е. метастабильное сигнальное состояние спонтанно распадается в термальной реакции в исходное темновое состояние. На основе конкретной природы и фотоцикла хромофора сенсорные фоторецепторы подразделяются на несколько различных классов. К ним

относятся фитохромы – сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм), криптохромы и белки light-oxygen-voltage (LOV) – сенсоры ультрафиолетового света (УФ-света) в А-области (УФА)/синего света (320–400 нм/400–500 нм), а также белок UV resistance locus 8 (UVR8) – сенсор фотонов УФ-света в В-области (УФВ, 290–320 нм) [1]. За исключением белка UVR8, который не содержит специального хромофора, каждый фоторецептор может быть функционально разделен на фотосенсорный модуль, содержащий хромофор и обеспечивающий поглощение света, и эффекторный (сигнальный) модуль, опосредующий трансдукцию сигнала и физиологический ответ. В настоящем обзоре рассматриваются флавопротеиновые фоторецепторы криптохромы с флавинадениндинуклеотидом (ФАД) в качестве хромофора.

Свойства фотовозбужденных состояний флавиновых хромофоров

Известно, что фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства флавинов определяются системой сопряженных двойных связей их изоаллоксазинового кольца (рис. 1А). При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения, вовлекающие перенос электрона/протона

и образование радикальных форм. Результаты теоретического изучения изоаллоксазинового кольца свидетельствуют, что как первое синглетное (S_1), так и триплетное (T_1) возбужденные состояния флавинов соответствуют π – π^* -переходам. Однако свойства этих состояний ФАД и флавиномонуклеотида (ФМН), служащего хромофором у LOV-фоторецепторов, различаются. У ФМН T_1 -состояние формируется с высоким квантовым выходом ($\phi = 0,5$ – $0,7$). При этом эффективное заселение T_1 -уровня ФМН, ответственное за фотохимическую активность этого хромофора, определяется исключительно внутренним свойством изоаллоксазинового кольца. Хромофор криптохромов ФАД отличается от ФМН тем, что на проявление свойств фотовозбужденного изоаллоксазина влияет пространственная близость второго гетероцикла – аденина. Создаваемое ими стэкинг-расположение (стопочная U-образная конфигурация) обуславливает фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электрона, приводящий к тушению S_1 -состояния, снижению интенсивности флуоресценции с максимумом при 520–530 нм и значительному ослаблению формирования T_1 -состояния ФАД [2].

У криптохромов растений ФАД может существовать в четырех формах: полностью окисленной (ФАД), анион-радикальной (ФАД $^{\cdot-}$), нейтральной радикальной (ФАДН $^{\cdot}$) и анион-восстановленной (ФАДН $^-$). Восстановление фото-

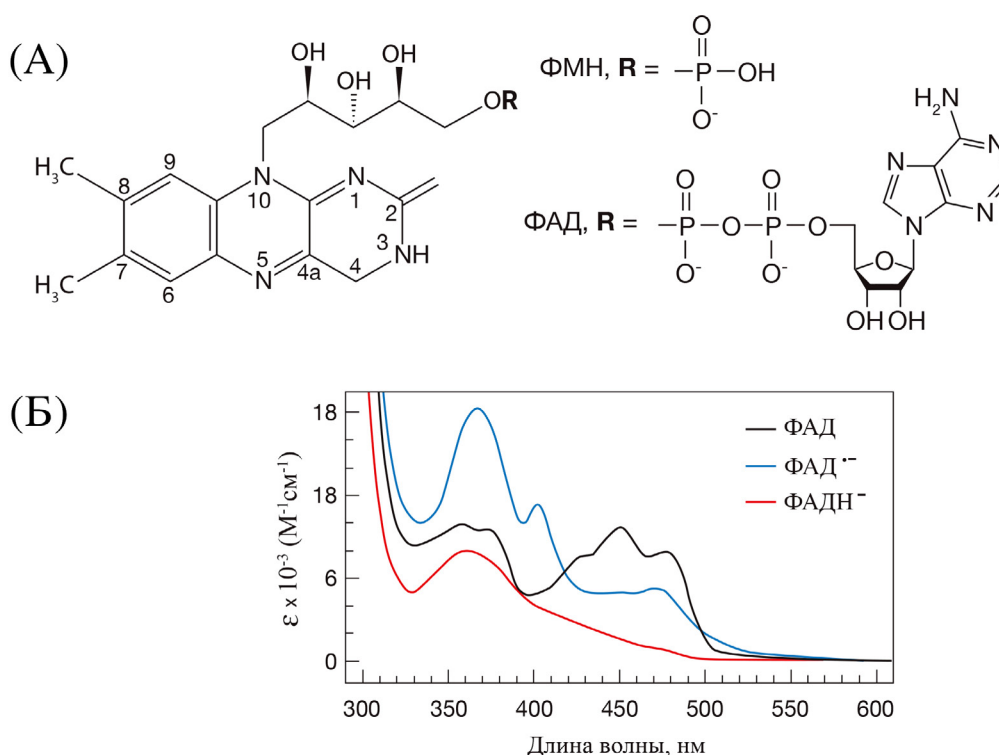


Рис. 1. Изоаллоксазиновое кольцо флавинов (А) определяет их спектроскопические свойства; фотофизические и фотохимические свойства у ФАД и ФМН отличаются. Абсорбционные спектры трех редокс-форм ФАД криптохрома (Б). У окисленной формы ФАД и анион-радикала ФАД $^{\cdot-}$ максимумы в видимой области расположены при 450 нм и при 410 и 470 нм соответственно, у анион-восстановленной формы ФАДН $^-$ максимум в видимой области отсутствует. У формы ФАДН $^{\cdot}$ максимумы поглощения расположены в области 500–650 нм.

возбужденного флавина (ФАД*) включает следующие реакции: $\text{ФАД}^* + e^- \rightarrow \text{ФАД}^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ФАДН}^{\cdot-} + e^- \rightarrow \text{ФАДН}^-$ [3]. Молекулярная орбиталь, вовлекаемая в переход $\text{ФАД} \rightarrow \text{ФАДН}^-$ после последовательного присоединения второго электрона, является антисвязывающей между $\text{N}_5\text{—C}_{4a}$ и связывающей между $\text{C}_{4a}\text{—C}_{10a}$. Это трансформирует связи $\text{N}_5=\text{C}_{4a}\text{—C}_{10a}=\text{N}_1$ у полностью окисленной формы флавина в связи $\text{N}_5\text{—C}_{4a}=\text{C}_{10a}\text{—N}_1$ у анион-восстановленной формы (ФАДН⁻) [3]. Согласно теоретически рассчитанным абсорбционным электронным спектрам с колебательно разрешенной структурой, у всех редокс-форм ФАД энергетически наинизший максимум представлен одним электронным переходом типа $\pi\text{—}\pi^*$, сосредоточенным в центре изоаллоксазинового кольца. Анализ этих спектров показывает, что в целом они согласуются с экспериментальными абсорбционными спектрами ФАД (рис. 1Б). Все редокс-формы ФАД имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм. У анион-восстановленной формы (ФАДН⁻) максимум в этой области единственный (видимый свет ФАДН⁻ поглощает очень слабо). У полностью окисленной формы ФАД максимум в видимой области спектра расположен при 450 нм, анион-радикал ФАД^{·-} имеет максимумы при 410 нм и 470 нм. У ФАДН^{·-} максимумы сильно сдвинуты из синей области в зеленую и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от ФАД и ФАД^{·-} [4]. Приведенные данные показывают, что каждая редокс-форма ФАД характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения. Поэтому абсорбционные спектры в области УФА и видимой области предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора ФАД в фоторецепторных белках.

Как отмечено выше, при поглощении фотона хромофор ФАД криптохромов подвергается редокс-реакциям. Эти реакции инициируют фотосенсорный процесс, который включает изменения в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофор, распространяются внутри фоторецепторов, что составляет молекулярную основу их сигнальной активности в живых системах. В течение нескольких последних лет опубликовано много работ с новой более детальной информацией о первичных механизмах фотосенсорных и сигнальных процессов, опосредуемых криптохромами у разных организмов. На анализе данных, содержащихся в этих работах, сосредоточено основное внимание в настоящем обзоре.

Белки семейства криптохромы/фотолиазы: общие сведения

Первыми были идентифицированы криптохромы (cryptochromes: CRY1/CRY2) из растения *Arabidopsis thaliana*. Позднее гены родственных им белков были найдены в геномах многих организмов из разных филогенетических групп – бактерий, водорослей, грибов и животных [2, 5–7]. Все криптохромные белки объединяет значительное структурное сходство с фотолиазами. Эти светочувствительные ферменты содержат кофактор ФАД в форме ФАДН⁻. В фотовозбужденном состоянии ФАДН⁻ непосредственно участвует в репарации двух главных УФ-индуцированных повреждений ДНК – циклобутановых пиримидиновых димеров (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) или пиримидин (6-4) пиримидиновых фотопродуктов (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts, 6-4PP) (рис. 2). Ферменты, репарирующие CPD или 6-4PP, названы соответственно

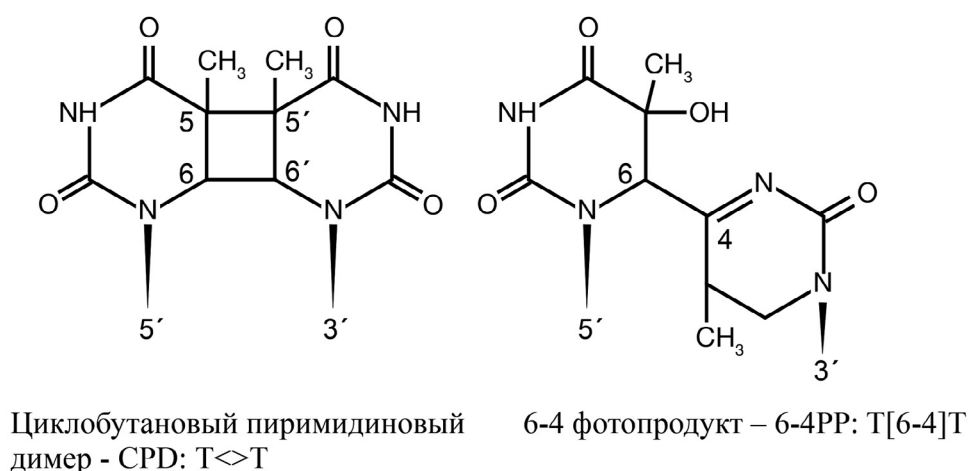


Рис. 2. Основные типы индуцированных УФ-излучением повреждений ДНК на примере оснований тимина (Т), расположенных в одной цепи ДНК. В CPD два соседних основания ковалентно связаны, образуя циклобутановое кольцо; у 6-4PP формируется сложная химическая структура, где атомы кислорода и водорода в одном основании переносятся к другому основанию, а затем между ними образуется одинарная ковалентная связь. Этим объясняется значительно более низкий квантовый выход фоторепарации ДНК (6-4)-фототиазы по сравнению с квантовым выходом фоторепарации CPD-фототиазы.

CPD-фотолиазами или (6-4)-фотолиазами [8]. Несмотря на сходство структур двух типов фотолиз и первичной фотохимии их кофактора ФАД, квантовый выход фоторепарации (6-4)-фотолиазами ($\phi = 0,1$) значительно меньше квантового выхода фоторепарации CPD-фотолиазами ($\phi = 0,7-0,9$). Это обусловлено тем, что фоторепарация 6-4PP по сравнению с фоторепарацией CPD более сложная реакция. Подробнее этот вопрос рассматривается в следующем разделе.

Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника, причем разделение генов криптохромов и фотолиаз произошло до дивергенции прокариот и эукариот. В пользу этого свидетельствуют данные о наличии генов как фотолиз, так и криптохромов в бактериальных геномах. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиз и криптохромов может служить открытие у грибов, диатомей и зеленых водорослей белков с двойной функцией – фотолиазной и регуляторной [9–11].

Криптохромы, как и фотолиазы, содержат в качестве основного хромофора ФАД, но, в отличие от его каталитической функции у фотолиз, у криптохромов ФАД определяет главным образом их фотосенсорные и сигнальные свойства. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к семейству криптохромов/фотолиз (cryptochrome/photolyase family, CPF), сохраняют эту способность. Согласно современной филогенетической и функциональной классификации [7, 9], белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы и подобные им белки (plant-like, pCRY) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like, aCRY). Криптохромы растений и зеленых водорослей (например, CPN1 *Chlamydomonas reinhardtii*) действуют в основном как сенсорные фоторецепторы, тогда как криптохромы животных могут выполнять функции либо фоторецепторов (тип I), либо не реагирующих на свет регуляторов циркадных ритмов (тип II). Криптохромы типа I найдены у насекомых (их прототипом считается криптохром *Drosophila melanogaster*, dCRY), а криптохромы типа II – у млекопитающих. Недавно у птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся выявлен еще один тип криптохромов, которые содержат ФАД и обладают фотохимической активностью [12].

Кроме того, открыты и охарактеризованы подобные животным криптохромы вне царства животных – главным образом, у фотосинтезирующих водорослей, где они могут действовать не только как сигнальные фоторецепторы, но и как (6-4)-фотолиазы [10, 11]. Зеленая водоросль *C. reinhardtii* содержит помимо белка pCRY (CPN1) белок aCRY (CraCRY), который на 40–50% гомо-

логичен по последовательности белкам aCRY из зеленой водоросли *Ostreococcus tauri* (OtCPF1) и диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* (PtCPF1), а также (6-4)-фотолиазе из зеленой водоросли *Dunaliella salina*. Криптохромы PtCPF1, OtCPF1 и CraCRY являются бифункциональными белками, проявляющими (6-4)-фотолиазную активность и функцию регуляторов экспрессии генов. Интересно, что регуляторная функция белка CraCRY выявлена не только при действии синего света, поглощаемого хромофором ФАД в окисленной форме, но и при действии красного света, поглощаемого ФАДН⁺ [11].

Почти все белки CPF подвергаются светоиндуцированной реакции, называемой фотоактивацией, в которой каталитически неактивный ФАД при фотовозбуждении отрывает электрон от соседнего триптофана. В восстановленном состоянии флавиновый хромофор либо инициирует трансдукцию сигнала (ФАДН⁺), либо после дальнейшего поглощения фотона катализирует репарацию ДНК (ФАДН⁻). Быстрый перенос электрона с поверхности белка на ФАД обеспечивается триадой триптофанов. Этот внутримолекулярный путь переноса электрона удлиняется у CraCRY и криптохромов животных типа I за счет четвертого ароматического остатка [13, 14] – тирозина (CraCRY) или триптофана (dCRY). Удлиненный электрон-транспортный путь необходим не только для реакций фотовосстановления ФАД у белков aCRY, но также для функционирования (6-4)-фотолиз.

Все криптохромы определяются по их схожей двухдоменной структурной организации, включающей N-концевой α/β -домен, который содержит β -лист, и C-концевой α -спиральный домен, связывающий хромофор ФАД. Вместе они составляют высококонсервативную гомологичную фотолиазе область (photolyase homology region, PHR), называемую также PHR-доменом. Кроме того, в структуру криптохромов входит различающееся по числу аминокислотных остатков C-концевое удлинение (CRY C-terminal extension, CCE), называемое также CCE-доменом [15]. У CRY1 и CRY2 CCE-домен состоит из 180 и 110 остатков соответственно. В темноте CCE-домен сильно связан PHR-доменом, но после фотоактивации высвобождается из ядра PHR и переходит в неупорядоченное состояние. Деструктурированная часть CCE из 80 остатков становится затем доступной для взаимодействия с некоторыми белками – компонентами сигнальных путей криптохромов. У фотолиз CCE-домен отсутствует, а у криптохромов играет роль эффекторного домена. Ранее считалось, что PHR криптохромов растений действует только как фотосенсорный домен. Однако полученные недавно данные о физическом взаимодействии большинства известных в настоящее время сигнальных белков с PHR-доменом крип-

тохромов позволяют считать, что PNR, как и CSE, тоже может выполнять функцию эффекторного домена [16].

Впервые определенная кристаллическая структура PNR-домена CRY1 проявляет удивительное сходство со структурой CPD-фотолиазы *Escherichia coli*, несмотря на их эволюционную отдаленность. Однако кристаллическая структура растительного криптохрома полной длины из-за технической трудности кристаллизации белка с большим внутренне неупорядоченным CSE-доменом пока не получена. У криптохрома дрозофилы dCRY, содержащего сравнительно малый CSE-домен, удалось определить не только кристаллическую структуру полной длины, но и его комплексов с соответствующими сигнальными белками. Результаты этого исследования демонстрируют центральную роль ФАД-связывающего кармана и физических взаимодействий между PNR- и CSE-доменами в функционировании криптохромов животных [17]. Существует общее согласие в том, что и у криптохромов растений светозависимые изменения во взаимодействии между PNR- и CSE-доменами могут объяснить фотоиндуцированные конформационные переходы. Однако конкретные сайты взаимодействия между PNR и CSE еще предстоит идентифицировать.

По современным представлениям, фотоактивация криптохромов растений начинается с поглощения фотона синего света хромофором ФАД и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PNR- и CSE-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым CSE-доменом в конформацию с открытым CSE-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием гомодимеров и гомотетрамеров криптохромов, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии генов и программ развития растений. При изучении перечисленных процессов в последние годы получены новые результаты, которые рассматриваются ниже.

Фотохимические процессы в белках CPF и фотоактивация криптохромов

Структурное сходство между PNR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем флавин, определяет общий принцип их реагирования на свет: у обоих типов белков фотоиндуцированное возбуждение хромофора инициирует реакции переноса электрона. Однако механизмы фотохимических процессов у криптохромов и фотолиаз фундаментально различаются. Это, в частности, выражается в редокс-формах хромофора ФАД в ходе его фото-

циклов. Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров: каталитического ФАД, существующего в основном состоянии в анион-восстановленной форме (ФАДН⁻), а также антенного хромофора. У большинства фотолиаз функцию антенного хромофора выполняют 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate, MTHF) или 8-гидроксидезафлавин (8-hydroxydeazaflavin, 8-HDF). Указанные хромофоры имеют более высокие коэффициенты молярного поглощения в области УФА ($\epsilon_{370\text{nm}} = 29000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ у MTHF или $\epsilon_{400\text{nm}} = 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ у 8-HDF) по сравнению с ФАДН⁻ ($\epsilon_{370\text{nm}} = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ или $\epsilon_{400\text{nm}} = 2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Это увеличивает количество поглощенных фотонов, используемых для фотофизического резонансного переноса энергии возбуждения к ФАДН⁻, повышая его потенциал восстанавливать CPD или 6-4PP для последующей их репарации. Кроме того, может значительно возрастать скорость репарации ДНК, что важно в условиях слабой освещенности. При связывании фотолиазы с участком ДНК, содержащим CPD или 6-4PP, образуется стабильный комплекс, в котором эти фотопродукты оказываются в тесном (в пределах действия ван-дер-ваальсовых сил) контакте с ФАДН⁻. В каталитическом акте происходит перенос электрона от ФАДН⁻ в синглетно-возбужденном состоянии к повреждению ДНК, что приводит к образованию комплекса с переносом заряда между нейтральным радикалом флавина (ФАДН[•]) и анион-радикалом CPD или 6-4PP. Далее в анион-радикале CPD происходят перераспределение электронной плотности и расщепление циклобутанового кольца на два исходных пиримидина, а ФАДН[•] восстанавливается обратным переносом избыточного электрона в активную форму ФАДН⁻, участвующую в последующих фотокаталитических циклах.

В анион-радикале 6-4PP C6 5'-основания соединены с C4 3'-основания; при этом ОН-группа при C4 3'-основания перемещена к C5 5'-основания (рис. 2). В отличие от CPD, в котором разрыв 5–6-связей восстанавливает основания в их исходные формы, в анион-радикале 6-4PP разрыв связей C6–C4 и C5–ОН приводил бы к формированию двух поврежденных оснований, т.е. репарации ДНК не происходило бы. Поэтому для репарации 6-4PP фермент должен катализировать не только реакции разрыва связей, но и реакцию переноса ОН-группы. Однако, поскольку интермедиат в форме анион-радикала 6-4PP не может подвергаться этим двум согласованным реакциям, была предложена модель, согласно которой формирование неповрежденных пиримидинов (после разрыва связей C4–C6 и C5–ОН) возможно при условии превращения анион-радикала в другой интермедиат — оксетан. Недавно этот механизм подтвержден данными кристаллографического

При поглощении фотона синего света в области 400–500 нм ($h\nu-1$) ФАД переходит в фотовозбужденное состояние ФАД* и на него переносится электрон от остатка триптофана, включенного в триаду триптофанов. Образующийся катион-радикал ФАД^{•+} протонируется до нейтрального радикала ФАДН[•]. После поглощения нейтральным радикалом фотона длинноволнового видимого света в области 500–650 нм ($h\nu-2$) и переноса на него электрона формируется восстановленный анион ФАДН⁻. Цикл завершается окислением этой формы флавина молекулярным кислородом в исходную форму ФАД. На первой стадии окисления интермедиатом может быть радикальная пара [ФАДН[•] + O₂⁻]. На второй стадии в радикальной паре супероксид O₂⁻ заменен на свою протонированную форму HO₂[•], с которой он находится в равновесии и которая окисляет ФАДН[•] в ФАД с выходом H₂O₂ [25].

Как уже было отмечено, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их ССЕ-доменом, тогда как PNR-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией ССЕ. После фотоактивации ССЕ-домен высвобождается и может взаимодействовать с компонентами сигнальных путей криптохрома. Однако до недавнего времени вопрос о том, как высвобождение ССЕ связано с фотохимией криптохрома, оставался невыясненным.

В исследовании с применением инфракрасной спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы ФАДН[•] в N-концевом α/β - субдомене PNR фоторецептора CPN1 в течение 500 мкс происходит заметное изменение структуры β -листа. Этот факт рассматривается как свидетельство ключевой роли β -листа во взаимодействии PNR и ССЕ, а также роли его деструктуризации в сигнальном процессе [23]. Интересно, что у CRY1 переход ССЕ в неупорядоченное состояние происходит за время 100 мс после формирования ФАДН[•], т.е. намного позже. В предложенной на основе этих данных модели [23] показано, как структурные изменения согласуются во времени с фотохимией флавинового хромофора у криптохромов растений.

Структурные аспекты трансдукции сигнала криптохромами: фотоолигомеризация и взаимодействие с сигнальными белками

Как следует из рассмотренных выше данных, криптохромы с фотовосстановленным ФАД подвергаются конформационным изменениям, приводящим к разобщению PNR- и ССЕ-доменов. В последнее время показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые их гомеолигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для физиологической активности криптохромов растений, так как обеспечивает повышение

их сродства к сигнальным белкам, таким как транскрипционные факторы CRY-interacting basic helix-loop-helix – bHLHs (CIBs), комплекс репрессоров фотоморфогенеза constitutive photomorphogenic1 (COP1)/ suppressors of phytochrome A (SPAs) и ингибиторы криптохромов blue-light inhibitors of CRYs (BICs). В результате взаимодействия в комплексе гомеолигомера криптохрома с этими белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений [26]. Следует отметить, что ключевые детали этой модели не были точно определены. Особенно это касается структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера.

Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структуры и функции у криптохромов растений [27, 28]. Показано, что мутации остатков триптофана Три-триады (Trp triad) у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, но не влияют на физиологическую активность мутантов *in vivo*. Некоторые мутанты, а именно, Три374Ала у CRY2 или его эквивалент Три377Ала у CRY1, проявляют конститутивную, т.е. независимую от света, физиологическую активность. Используя преимущество таких мутантов, недавно определили структуры активных гомеолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант Три374Ала CRY2 проявляет гомеолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2 и что мутант Три374Ала CRY2 конститутивно активен *in vivo* [26].

Методом низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта Три374Ала CRY2, у которого эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностей PNR-доменов. Мутации в интерфейсе CRY2 приводили к уменьшению сродства гомодимера к сигнальному белку CIB1. На основании этого факта предположили, что CIB1 взаимодействует с CRY2 в интерфейсе гомодимера, и, вероятно, поэтому именно олигомеры, а не мономеры являются активными формами криптохромов [29]. Следует отметить, что большинство остатков, находящихся в одном из двух интерфейсов CRY-тетрамера, являются консервативными у криптохромов растений, но не у криптохромов животных. В этой связи было бы интересно определить, требуется ли гомеолигомеризация для функционирования данной группы криптохромов, которые могли развить иные структуры интерфейсов, или зависимый от димеризации механизм фотоактивации криптохромов растений уникален.

Известно, что фотоактивированные криптохромы растений могут подвергаться инактивации по трем механизмам, включая спонтанную темновую реверсию гомоолигомеров в мономеры, взаимодействие с ингибиторами (BICs) и убиквитин-зависимый протеолиз. Среди этих механизмов только ингибирование криптохромов, вызываемое BICs, является светочувствительным процессом. Это предполагает, что взаимодействие CRY–BIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету. Недавно проведенный анализ кристаллической структуры комплекса PHR–CRY2 с BIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки BIC могут инактивировать криптохромы растений [30]. Во-первых, BIC может ингибировать фотовосстановление ФАД. Порядка десяти остатков CRY2 находятся в непосредственной близости от ФАД. Связывание BIC2 с PHR–CRY2 увеличивает расстояние между донором электрона (Три397) и акцептором (изоаллоксазиновое кольцо ФАД), что может затруднить перенос электрона. Кроме того, такое связывание может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (Асп393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре. Такое изменение делает протонирование практически невозможным. Соответственно, BIC2 может блокировать фотовосстановление ФАД в ФАД[–] и его протонирование в ФАДH⁺. Во-вторых, BICs могут действовать как конкурентные ингибиторы гомоолигомеризации CRY2. В комплексе PHR–CRY2 с BIC2 структура фрагмента BIC2 определяет его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена CRY2. PHR–CRY2 и BIC2 имеют по 16 остатков, которые вовлекаются в формирование комплекса между ними. Индивидуальные мутации нескольких остатков в интерфейсе комплекса снижали выраженное сродство между PHR–CRY2 и BIC2 *in vitro*. Интерфейсы гетеродимера CRY–BIC и гомодимера CRY–CRY содержат два остатка CRY2 – Три349 и аргинин (Арг208). В гетеродимере остаток Три349 гидрофобно взаимодействует с изолейцином (Иле57) BIC2, тогда как Арг208 формирует солевой мостик и водородную связь с глутамином (Глу50) BIC2. В гомодимере CRY2–CRY2 Три349 и Арг208 находятся в интерфейсе. Эти данные убеждают, что связывание BICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRY, блокируя тем самым его фотоактивацию.

В заключение можно констатировать, что понимание первичных механизмов восприятия света криптохромами и принципов их функционирования у разных организмов значительно улучшилось за последние несколько лет. Особого внимания заслуживают результаты исследования крипто-

хромных фоторецепторов, выявленных недавно у зеленой водоросли *C. reinhardtii* (CPH1, CraCRY) и у позвоночных животных (CRY4). Эти фоторецепторы охарактеризованы в отношении структуры и разнообразных функций; у них детально изучены фотоциклы флавиновых хромофоров, которые отличаются из-за природы и числа ароматических остатков и других аминокислот, участвующих в каскаде переноса электрона/протона при фотовосстановлении флавина [11, 31]. У криптохромов растений поглощение света хромофором инициирует перенос электрона к флавину через триаду триптофанов. У криптохромов животных типа I и подобных криптохромам животных (aCRY) этот электронно-транспортный путь включает четвертый ароматический остаток, который может быть либо триптофаном (dCRY), либо тирозином (CraCRY). У криптохрома голубя *Columba livia* (ClCRY4) цепь из Три-триады удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина. Этим определяется наиболее высокий квантовый выход фотовосстановления флавинового хромофора у ClCRY4 по сравнению с другими криптохромами.

Несмотря на то, что механизм фотовосстановления ФАД детально изучен *in vitro*, вопрос о том, как конкретно перенос электрона к ФАД вовлекается в фотоактивацию криптохромов, остается нерешенным. Показано, что мутации остатков Три-триады у CRY1/CRY2, которые блокируют перенос электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, не влияют на их биохимическую и физиологическую активность *in vivo* [27, 28]. Иными словами, зависимое от Три-триады фотовосстановление ФАД не требуется для функционирования криптохромов. Очевидно, для раскрытия механизма фотоактивации криптохромных белков необходимо дальнейшее исследование альтернативного пути переноса электрона с применением новых и инновационных подходов. Другой вопрос, связанный с фотоциклом ФАД, относится к магнитоувствительной функции криптохромов.

Радикальные пары в фотоцикле ФАД и магнитоувствительность криптохромов

Принято считать, что в основе магнитоувствительности криптохромных белков лежит формирование радикальных пар, на которые могут влиять слабые магнитные поля [32]. Следствием этого может быть изменение химических констант скоростей редокс-реакций ФАД, создающее отличие в концентрации активированного состояния фоторецептора и, соответственно, измененную биологическую активность. Однако природа магнитоувствительных радикальных пар и стадии, на которых они действуют в течение редокс-цикла криптохромов, пока точно не определены и являются предметом дискуссий. На основании боль-

шого числа экспериментальных и теоретических работ предложены две альтернативные модели формирования разных радикальных пар, определяющих магниточувствительность криптохромов. Согласно модели 1, радикальная пара [ФАД⁻ Три⁺] образуется путем иницирующей реакции переноса электрона к фотовозбужденному ФАД от остатка триптофана, включенного в триаду (тетраду) триптофанов. Эта радикальная пара подвергается магниточувствительной интерконверсии между синглетным и триплетным состояниями: $^1[\text{ФАД}^{\cdot-} \text{Три}^{\cdot+}] \leftrightarrow ^3[\text{ФАД}^{\cdot-} \text{Три}^{\cdot+}]$. При протонировании ФАД⁻ может переходить в форму ФАДН⁻ и после фотовосстановления — в неактивную форму ФАДН⁻.

Темновое реокисление ФАДН⁻ в реакции с кислородом принято за основу в модели 2, предполагающей, что интермедиатом в этом процессе может быть радикальная пара [ФАДН⁻ О₂⁻]. Она также может подвергаться магниточувствительному взаимопревращению между синглетным и триплетным состояниями; при этом синглетное состояние переходит в исходную форму ФАД после высвобождения перекиси водорода, как показано на приведенной выше схеме редокс-фотоцикла ФАД-хромофора. В недавнем исследовании получено частичное подтверждение такого механизма [33]. Показано, что ответы CRY1 на свет *in vivo* усиливаются в магнитном поле, причем даже в случае его воздействия во время темновых интервалов между освещением. Поэтому считается, что магниточувствительная реакция в фотоцикле криптохрома происходит на стадии реокисления ФАДН⁻ и может вовлекать активные формы кислорода. Однако их конкретная природа пока не определена. Кроме того, в соответствии с данными теоретического анализа, радикальная пара флавин/супероксид кислорода вряд ли может быть магниточувствительным интермедиатом у криптохромов из-за очень быстрой релаксации спина супероксида. Очевидно, для идентификации магниточувствительных интермедиатов требуются дальнейшие исследования.

Главный проблемный вопрос, касающийся отмеченной выше модели 1, состоит в том, что она включает некоторые результаты, являющиеся спорными из-за существования противоречий

между фотохимическими и биологическими данными. Кроме того, в ряде работ по ориентации птиц в магнитном поле получены данные, которые не согласуются с обсуждаемой моделью. В одной из них продемонстрировано, что птицы могут ориентироваться в магнитном поле при действии зеленого света, фотоны которого ФАД не поглощает, а поглощает только ФАДН⁻. Вследствие этого он может восстанавливаться в ФАДН⁻, что исключает возможность формирования радикальной пары флавин/триптофан и ее модификации магнитным полем. Для прояснения вопроса о несоответствии фотохимических и биологических данных в недавней работе проведен детальный фотохимический и структурный анализ криптохрома из *C. livia* (C/CRY4). В полученных кристаллических структурах выявлены модификации в эволюционно консервативной триаде триптофанов: у C/CRY4 цепь триптофанов удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина [31]. Это обеспечивает высокий квантовый выход реакции фотовосстановления ФАД ($\phi \sim 0,4$), превышающий соответствующие квантовые выходы у других криптохромов ($\phi \sim 0,2$). Высокий квантовый выход повышает чувствительность C/CRY4 к свету низкой интенсивности, что согласуется с наблюдением поведенческих реакций у птиц при их ориентации в магнитном поле. В целом результаты работы совместимы с ночным поведением мигрирующих позвоночных животных в условиях слабой освещенности и предсказывают фотохимические пути, которые могут обеспечивать магниточувствительность живых систем. Однако некоторые вопросы в этом направлении остаются нерешенными. Для их прояснения необходимы новые подходы к изучению поведенческих реакций организмов, а также дальнейшие фотохимические исследования криптохромов у мигрирующих птиц, которые помогут глубже понять механизмы биологической адаптации разных организмов.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

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. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. Vol. 63. P. 49–72.
3. Schwinn K., Ferre N., Huix-Rotllant M. UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. Vol. 22. N 22. P. 12447–12455.
4. Liu B., Liu H., Zhong D., Lin C. Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010. Vol. 13. N 5. P. 578–586.

5. *Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L.-O., van der Horst G.T., Batschauer A., Ahmad M.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. Vol. 62. P. 335–364.
6. *Dasgupta A., Fuller K.K., Dunlap J.C., Loros J.J.* Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of two model fungi // *Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 18. N 1. P. 5–20.
7. *Ozturk N.* Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 1. P. 104–111.
8. *Zhang M., Wang L., Zhong D.* Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair // *Arch. Biochem. Biophys.* 2017. Vol. 632. P. 158–174.
9. *Vechtomova Y.L., Telegina T.A., Kritsky M.S.* Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. Vol. 85. N 1. P. 131–153.
10. *Konig S., Juhas M., Jager S., Kottke T., Buchel C.* The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms // *J. Plant Physiol.* 2017. Vol. 217. N 1. P. 15–19.
11. *Kottke T., Oldemeyer S., Wenzel S., Zou Y., Mittag M.* Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions // *J. Plant Physiol.* 2017. Vol. 217. N 1. P. 4–14.
12. *Michael A.K., Fribourgh J.L., Van Gelder R.N., Parth C.L.* Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping and beyond // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 1. P. 128–140.
13. *Oldemeyer S., Franz S., Wenzel S., Essen L.-O., Mittag M., Kottke T.* Essential role of an unusual long-lived tyrosyl radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. N 27. P. 14062–14071.
14. *Paulus B., Bajzath C., Melin F., Heidinger L., Kromm V., Herkersdorf C., Benz U., Mann L., Stehle P., Hellwig P., Weber S., Schleicher E.* Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states // *FEBS J.* 2015. Vol. 282. N 16. P. 3175–3189.
15. *Zoltowski B.D.* Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 29. P. 8811–8812.
16. *Wang Q., Zuo Z., Wang X., Liu Q., Gu L., Oka Y., Lin C.* Beyond the photocycle – how cryptochromes regulate photoresponses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. Vol. 45. Pt. A. P. 120–126.
17. *Zoltowski B.D., Vaidya A.T., Top D., Widom J., Young M.W., Crane B.R.* Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome // *Nature*. 2011. Vol. 480. N 7377. P. 396–399.
18. *Franz S., Ignatz E., Wenzel S., Zielosko H., Putu E., Maestre-Reyna M., Tsai M.-D., Yamamoto J., Mittag M., Essen L.-O.* Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. N 15. P. 8010–8022.
19. *Ahmad M.* Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. Vol. 33. P. 108–115.
20. *Hense A., Herman E., Oldemeyer S., Kottke T.* Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290. N 3. P. 1743–1751.
21. *Lacombat F., Espagne A., Dozova N., Plaza P., Muller P., Brettel K., Franz-Badur S., Essen L.-O.* Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141. N 34. P. 13394–13409.
22. *Oldemeyer S., Haddad A.Z., Fleming G.R.* Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome // *Biochemistry*. 2020. Vol. 59. N 4. P. 594–604.
23. *Thoing C., Oldemeyer S., Kottke T.* Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the α/β subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. N 18. P. 5990–5999.
24. *Herbel V., Orth C., Wenzel R., Ahmad M., Bittl R., Batschauer A.* Lifetimes of *Arabidopsis* cryptochrome signaling states *in vivo* // *Plant J.* 2013. Vol. 74. N 4. P. 583–592.
25. *Muller P., Ahmad M.* Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. N 24. P. 21033–21040.
26. *Wang Q., Lin C.* A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 401–403.
27. *Gao J., Wang X., Zhang M., Bian M., Deng W., Zuo Z., Yang Z., Zhong D., Lin C.* Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 29. P. 9135–9140.
28. *Liu H., Su T., He W., Wang G., Lin C.* The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes // *Mol. Biol. Evol.* 2019. Vol. 37. N 2. P. 327–340.
29. *Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P.* The oligomeric structures of plant cryptochromes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 480–488.
30. *Ma L., Wang X., Guan Z., Wang L., Wang Y., Zheng L., Gong Z., Shen C., Wang J., Zhang D., Liu Z., Yin P.* Structural insight into BIC-mediated inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 472–479.
31. *Zoltowski B.D., Chelliah Y., Wickramaratne A., Jarecha L., Karki N., Xu W., Mouritsen H., Hore P.J., Hibbs R.E., Green C.B., Takahashi J.S.* Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. Vol. 116. N 39. P. 19449–19457.
32. *Hore P.J., Mouritsen H.* The radical-pair mechanisms of magnetoreception // *Annu. Rev. Biophys.* 2016. Vol. 4. P. 299–344.
33. *Pooam M., Arthaut L.-D., Burdick D., Link J., Martino C.F., Ahmad M.* Magnetic sensitivity mediated by the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark // *Planta*. 2019. Vol. 249. N 2. P. 319–332.

Поступила в редакцию 28.01.2022

После доработки 03.04.2022

Принята в печать 19.04.2022

REVIEW

Photosensory and signaling properties of cryptochromes

G.Ya. Fraikin 

*Department of Biophysics, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia
e-mail: gfraikin@yandex.ru*

The blue-light protein sensors cryptochromes compose the widespread class of photoreceptors that regulate processes of development in plants and circadian rhythms in animals and plants. These photoreceptors can also function as magnetoreceptors. During the last decade cryptochromes have been discovered and characterized in several photosynthetic algae, where they may act not only as regulatory photoreceptors, but also as photolyases catalyzing the repair of ultraviolet-induced DNA lesions. Cryptochrome proteins bind flavin adenine dinucleotide (FAD) as a chromophore in the photolyase homology region (PHR) domain and contain the cryptochrome C-terminal extension (CCE) which is joined to PHR near the FAD-binding site. The chromophore is responsible for photosensory properties of cryptochromes and CCE is essential for their signaling activities. Photosensory processes are initiated by photochemical FAD conversions involving electron/proton transfer and the formation of redox forms. These reactions lead to changes in chromophore–protein interactions. The resulting conformational transitions in protein structure provide the molecular foundation of cryptochrome signaling activity in living systems. In plants, cryptochrome protein with photoreduced FAD undergoes conformational changes causing disengagement of the PHR domain and CCE that is accompanied by the formation of functionally active dimers/tetramers of cryptochrome molecules. Photooligomerization is considered as a key process necessary for cryptochrome signaling activity, since oligomers provide the formation their complexes with variety proteins, the components of photoreceptor signaling pathways. Interactions cryptochrome–protein in such complexes changes the protein signaling activities leading to gene expression alteration and photomorphogenesis. In this review, current knowledge on photosensory and signaling properties of cryptochromes are discussed.

Keywords: *cryptochromes, photoreceptors, FAD-chromophore, redox forms, photoactivation, signaling mechanisms*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032500058–7.

Сведения об авторе

Фрайкин Григорий Яковлевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: gfraikin@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7267-2338>