

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, РЕГУЛИРУЕМЫХ СЕНСОРНЫМИ ФОТОРЕЦЕПТОРАМИ КРИПТОХРОМАМИ У РАСТЕНИЙ

Обзор

© 2023 Г.Я. Фрайкин*, Н.С. Беленикина, А.Б. Рубин

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: Gfraikin@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023

После доработки 28.04.2023

Принята к публикации 02.05.2023

Сенсоры синего света, криптохромы, составляют широко распространённый класс флавопротеиновых фоторецепторов, которые у растений регулируют сигнальные процессы, лежащие в основе их развития, роста и метаболизма. У некоторых водорослей криптохромы могут действовать не только как сенсорные фоторецепторы, но также как фотолиазы, катализирующие репарацию УФ-индуцированных повреждений ДНК. Криптохромы связывают в качестве хромофора FAD в гомологичном фотолиазе домене (photolyase homologous region, PHR) и содержат C-концевое удлинение (cryptochrome C-terminal extension, CCE), отсутствующее у фотолиаз. Фотосенсорный процесс в криптохроме инициируется фотохимическими превращениями хромофора, включающими образование редокс-форм FAD. В состоянии с восстановленным до нейтрального радикала хромофором (FADH[•]) фоторецепторный белок подвергается фосфорилированию, конформационному изменению и разобщению PHR-домена и CCE с последующим формированием олигомеров криптохромных молекул. Фотоолигомеризация — структурная основа функциональной активности криптохромов, определяющая формирование их комплексов с разнообразными сигнальными белками, включая транскрипционные факторы и регуляторы транскрипции. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, что приводит к регуляции экспрессии генов и фотоморфогенезу растений. В последнее время опубликовано много работ с новой, более детальной информацией о молекулярных механизмах отмеченных выше процессов. В настоящем обзоре основное внимание сосредоточено на анализе данных этих публикаций, особенно касающихся структурных аспектов перехода криптохромов в фотоактивированное состояние и регуляторных сигнальных процессов, опосредуемых криптохромными фоторецепторами у растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фоторецепторы криптохромы, FAD-хромофор, фотосенсорный процесс, фотоолигомеризация, сигнальные белки и механизмы, регуляция реагирующих на свет генов.

DOI: 10.31857/S0320972523060052, **EDN:** EEUGZP

ВВЕДЕНИЕ

Свет УФ, видимой и ближней ИК-областей (290–800 нм) электромагнитного спектра

солнца — ключевой стимул окружающей среды, который воспринимается многочисленными организмами из всех царств жизни. Для детектирования световых стимулов живые системы

Принятые сокращения: (6-4)PP — pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproduct, пиримидин (6-4) пиримидиновый фотопродукт; BICs — blue light inhibitors of CRYs, зависящие от синего света ингибиторы криптохромов растений; CCE — cryptochrome C-terminal extension, C-концевое удлинение криптохрома; CIB — CRY-interacting bHLH; CO — CONSTANS, транскрипционный фактор; COP1/SPA — (constitutive photomorphogenic 1)/(suppressor of PHYA-105 1) E3 ubiquitin ligase complex, комплекс белков с активностью E3-убиквитинлигазы; CPD — cyclobutane pyrimidine dimer, циклобутановый пиримидиновый димер; CPF — cryptochrome/photolyase family proteins, белки семейства криптохромов/фотолиаз; CPN1 — *Chlamydomonas photolyase homologous 1*, plant-like pCRY protein, подобный криптохромам растений белок *Chlamydomonas reinhardtii*; CraCRY — animal-like aCRY protein, подобный криптохромам животных белок *C. reinhardtii*; CRYs (CRY1/CRY2) — cryptochromes, криптохромы растений; LRGs — light-responsive genes, реагирующие на свет гены; PHR — photolyase homologous region, гомологичная фотолиазе область; PIFs — phytochrome-interacting factors, взаимодействующие с фитохромом факторы (регуляторы транскрипции); PPKs — photoregulatory protein kinases, фоторегуляторные протеинкиназы.

* Адресат для корреспонденции.

развили ряд специализированных сенсорных фоторецепторов [1–11], которые конвертируют физический сигнал в биохимические сигнальные каскады с последующими фотобиологическими ответами. Это позволяет организмам реагировать на флуктуации многих параметров света и адаптироваться в условиях среды обитания. Сенсорные фоторецепторные белки обычно содержат молекулы хромофоров, чувствительных к фотонам разной энергии. Поглощение фотона хромофором фоторецептора в адаптированном к темноте состоянии инициирует серию фотохимических реакций (фотоцикл), сопровождающихся переходом фоторецептора из «темнового» (неактивного) состояния в адаптированное к свету, или «сигнальное» конформационное состояние. Такой переход означает фотоактивацию фоторецептора.

Растения с наиболее развитыми системами восприятия света, ответственными за разнообразные фотоответы, обладают большим числом регуляторных сенсорных фоторецепторов, которые, имея разную спектральную чувствительность, вместе контролируют все области солнечного оптического спектра [12–20]. Можно также отметить, что растительные фоторецепторы функционально взаимосвязаны в запуске программ развития растений и координации циркадных ритмов их физиологических функций с суточным солнечным циклом. Эти сенсорные фоторецепторы на основании конкретной природы и фотоцикла хромофора подразделяются на несколько различных классов. К ним относятся фитохромы – сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм) [21, 22], криптохромы [14, 23], фототропины и другие белки: Light-Oxygen-Voltage (LOV) – сенсоры ультрафиолета А-области (УФА)/синего света (320–400 нм/400–500 нм) [24], а также белок UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) – сенсор фотонов ультрафиолета В-области (УФВ, 290–320 нм) [25, 26]. За исключением белка UVR8, который не содержит специального хромофора, каждый фоторецептор может быть функционально разделён на фотосенсорный модуль, содержащий хромофор и обеспечивающий поглощение света, и эффекторный (сигнальный) модуль, опосредующий трансдукцию сигнала и фотобиологический ответ. Фитохромы связывают билиновые хромофоры [27], а рецепторы синего света – флавиновые хромофоры; криптохромы в качестве хромофора связывают FAD [1].

У криптохромов растений (CRYs) FAD может существовать в четырёх редокс-формах: полностью окисленной форме (FAD), анион-радикальной ($FAD^{\bullet-}$), нейтральной ра-

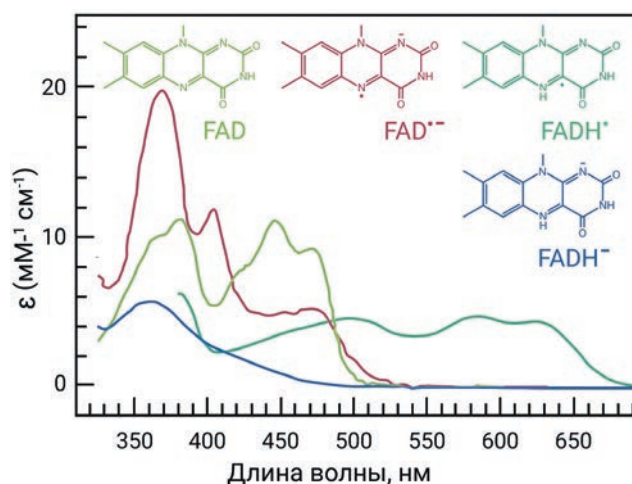


Рис. 1. Абсорбционные спектры редокс-форм FAD-хромофора криптохромов

дикальной ($FADH^{\bullet}$) и анион-восстановленной ($FADH^-$) (рис. 1).

Все редокс-формы FAD имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм, причём у $FADH^-$ максимум в этой области единственный. У окисленной формы FAD и анион-радикала $FAD^{\bullet-}$ максимумы расположены также в синей области (400–500 нм). У $FADH^{\bullet}$ максимумы сильно сдвинуты в зелёную и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от FAD и $FAD^{\bullet-}$ [28, 29]. Приведённые данные показывают, что каждая редокс-форма FAD характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения, и поэтому абсорбционные спектры предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора в криптохромных белках.

Первый криптохром (cryptochrome, CRY1) был открыт у растения *Arabidopsis thaliana* [30], и было установлено, что этот белок, кодируемый геном *LONG HYPOCOTYL 4 (HY4)*, гомологичен ДНК-фотолиазам – светочувствительным ферментам репарации повреждённой УФ-излучением ДНК. Белок HY4, как и фотолиазы, содержал FAD, но у него отсутствовала ДНК-репарирующая ферментативная активность фотолиаз [31], и он проявлял регуляторные свойства сенсорного фоторецептора. Через несколько лет у *A. thaliana* идентифицировали второй криптохром (CRY2), а у *Drosophila melanogaster* открыли ещё один тип криптохрома – dCRY [32]. В настоящее время криптохромы найдены во всех биологических царствах и определяются на основе схожей двухдоменной структуры, включающей N-концевой α/β -домен, содержащий β -лист, и C-концевой α -спиральный домен, связы-

вающий хромофор FAD. В совокупности они составляют консервативную гомологичную фотолиазе область (photolyase homologous region, PHR), называемую также PHR-доменом, который состоит из примерно 500 остатков. Дополнительно структура криптохромов включает C-концевое удлинение (CRY C-terminal extension, CCE), называемое также CCE-доменом (у CRY1 и CRY2 он состоит из 180 и 110 остатков соответственно, а у фотолиаз отсутствует) [33, 34].

Большинство криптохромов действуют как регуляторы экспрессии генов, особенно транскрипции [23, 35]. Из двух CRYs CRY1 функционирует и в ядре, и в цитоплазме, тогда как CRY2, по-видимому, исключительно ядерный белок, который завершает свой посттрансляционный цикл в ядре [36, 37]. У растений криптохромы регулируют множество фототворов, в том числе таких, как транскрипция генов, ингибирование вытягивания гипокотилия, избегание тени, циркадные ритмы, инициация цветения, запрограммированная клеточная смерть и светозависимый стресс [23]. Кроме того, CRYs могут вовлекаться в магниторецепцию [38], как это показано в отношении криптохромов других организмов [39]. Хотя CRYs могут независимо регулировать фотоморфогенез, опосредованные ими ответы часто антагонистически или избыточно регулируются с вовлечением других фоторецепторов, а именно фитохромов, UVR8 и LOV-белков. Это объясняется тем, что криптохромы индуцируют ответы на синий свет путём взаимодействия со многими сигнальными белками, некоторые из которых могут взаимодействовать и с отмеченными фоторецепторными белками, вследствие чего может измениться (позитивно или негативно) эффективность сигнальных процессов, запускаемых CRYs [11].

В последнее десятилетие криптохромы также широко изучаются у зелёных водорослей, содержащих подобные растениям и подобным животным типы криптохромов, которые принадлежат к семейству криптохромов/фотолиз (cryptochrome/photolyase family, CPF). Некоторые криптохромы водорослей отличаются от криптохромов высших растений тем, что проявляют бифункциональные свойства, действуя и как транскрипционные регуляторы, и как ДНК-фотолиазы. Кроме того, эти криптохромы могут реагировать на свет и опосредовать фототворы водорослей в более широкой области спектра, чем CRYs, а именно в диапазоне 500–650 нм [40].

По современным представлениям, фотосенсорные процессы в криптохромах иници-

ируются фотохимическими превращениями FAD-хромофора, которые индуцируют изменения в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофор, распространяются внутри фоторецептора, приводя к разобщению PHR- и CCE-доменов, что сопровождается формированием олигомеров криптохромных молекул [41]. В этом состоянии криптохромы фосфорилируются фоторегуляторными протекиназами (photoregulatory protein kinases, PPKs), становятся функционально активными и образуют комплексы со многими сигнальными белками, включая транскрипционные факторы и регуляторы экспрессии генов. Зависимые от синего света взаимодействия в таких комплексах вызывают изменение активности сигнальных белков, определяющее их способность регулировать экспрессию реагирующих на свет генов (light-responsive genes, LRGs) [11].

Отмеченные процессы составляют молекулярную основу сигнальной активности криптохромов в фотоморфогенетическом развитии растений. В настоящем обзоре рассмотрены и проанализированы недавние данные, полученные при изучении сигнальных механизмов фоторегуляторных процессов, опосредуемых этими фоторецепторами.

БЕЛКИ CPF: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Гены родственных криптохромов белков найдены в геномах многих организмов из разных филогенетических групп — бактерий, водорослей, грибов и животных [1, 40, 42, 43]. Все криптохромные белки объединяет значительное структурное сходство с фотолиазами, которые содержат кофактор FAD в основном состоянии в форме FADH⁻. В фотовозбуждённом состоянии FADH⁻ непосредственно вовлекается в репарацию двух главных УФ-индуцированных повреждений ДНК — циклобутановых пиримидиновых димеров (cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs) и пиримидин (6-4) пиримидиновых фотопродуктов (pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, 6-4PPs). Ферменты, репарирующие CPDs или 6-4PPs, названы соответственно CPD-фотолиазами или (6-4)-фотолиазами [44]. Квантовый выход фоторепарации CPD-фотолиазами значительно превышает квантовый выход фоторепарации (6-4)-фотолиазами, несмотря на сходство структур двух типов ферментов и первичной фотохимии их флавинового кофактора. Это объясняется тем, что

фоторепарация 6-4PP — более сложная реакция, чем фоторепарация CPD (подробнее этот вопрос рассматривается в следующем разделе).

Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиаз и криптохромов может служить открытие у грибов, диатом и зелёных водорослей белков с двойной функцией — ДНК-репарирующей и регуляторной [10, 40, 45–47]. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к белкам CPF, сохраняют эту способность. Согласно современной филогенетической и функциональной классификации [10, 43], белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы (CRYs) и подобные им белки (plant-like CRYs, pCRYs) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like CRYs, aCRYs). Криптохромы растений и зелёных водорослей, например, pCRY *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas photolyase homologous 1*, CPH1), 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 дрозофилы dCRY), а криптохромы типа II — у млекопитающих. Другой тип криптохромов идентифицирован у птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся; эти белки содержат FAD и фотохимически активны [48]. Несколько белков aCRYs обнаружено вне царства животных — главным образом у фотосинтезирующих водорослей. Зелёная водоросль *C. reinhardtii* содержит помимо белка pCRY (CPH1) белок aCRY (*CraCRY*), который на 40–50% гомологичен по последовательности белкам aCRYs из зелёной водоросли *Ostreococcus tauri* и диатомы *Phaeodactylum tricorutum*. Эти криптохромы водорослей являются бифункциональными белками, проявляющими активность (6-4)-фотолиазы и функцию регуляторов экспрессии генов. Интересно, что регуляторная функция белка *CraCRY* выявлена не только при действии синего света, поглощаемого хромофором FAD в окисленной форме, но и при действии красного света, поглощаемого FADH• [40].

Почти все белки CPF подвергаются светомодулированной реакции, называемой фотоактивацией, в которой функционально неактивный FAD при фотовозбуждении отрывает электрон от соседнего триптофана. В восста-

новленном состоянии флавиновый хромофор либо инициирует трансдукцию сигнала (FADH•), либо после последующего поглощения фотона катализирует репарацию ДНК (FADH⁻). Быстрый перенос электрона с поверхности белка на FAD обеспечивается консервативной триадой триптофанов (Trp-триада). Этот внутримолекулярный путь переноса электрона удлиняется у *CraCRY* и криптохромов животных типа I (например, dCRY) за счёт четвёртого ароматического остатка [49, 50] — тирозина (*CraCRY*) или триптофана (dCRY). Удлиненный электрон-транспортный путь важен не только для реакций фотовосстановления FAD у белков aCRY, но и для функционирования (6-4)-фотолиаз.

У CRYs фотовосстановление FAD вызывает высвобождение CSE-домена из ядра PHR-домена, с которым CSE был сильно связан в темноте. В результате CSE-домен переходит в неупорядоченное состояние, и его деструктурированная часть из 80 остатков становится доступной для взаимодействия с некоторыми белками — компонентами сигнальных путей криптохромов. Поэтому ранее полагали, что у CRY1 и CRY2 только CSE играет роль эффекторного домена. Однако полученные в последнее время данные о физическом взаимодействии ряда сигнальных белков с PHR-доменом этих криптохромов позволяют считать, что PHR тоже может выполнять функцию эффекторного домена [23].

Впервые определённая кристаллическая структура PHR-домена CRY1 проявляет удивительное сходство со структурой CPD-фотолиазы *Escherichia coli*, несмотря на их эволюционную отдалённость. Вместе с тем 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 со сравнительно малым CSE-доменом удалось определить не только кристаллическую структуру полной длины, но и его комплекса с сигнальным белком. Результаты этого исследования продемонстрировали центральную роль FAD-связывающего кармана и физических взаимодействий между PHR- и CSE-доменами в функционировании криптохромов животных [51]. Существует общее согласие в том, что и у CRYs светозависимые изменения во взаимодействии между PHR- и CSE-доменами могут объяснить фотоиндуцированные конформационные переходы. Однако конкретные сайты взаимодействия между PHR и CSE ещё предстоит идентифицировать.

Как отмечено выше, фотоактивация CRYs начинается с поглощения фотона синего света хромофором FAD и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PHR- и CSE-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым CSE-доменом в конформацию с открытым CSE-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием олигомеров CRYs, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии LRGs и программ развития растений. При изучении перечисленных процессов в последние годы получены новые результаты, которые рассматриваются в последующих разделах.

ФОТОХИМИЯ

FAD-ХРОМОФОРА В CRY-БЕЛКАХ И ФОТОАКТИВАЦИЯ КРИПТОХРОМОВ

Фотохимические свойства флавинов определяются системой сопряжённых двойных связей их изоаллоксазинового кольца. При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что индуцирует его фотохимические превращения, вовлекающие перенос электрона/протона и образование радикальных форм [16, 29]. Структурное сходство между PHR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем FAD, 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, и это, в частности, выражается в редокс-формах хромофора FAD в ходе его фототриптов.

Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров — каталитического FADH⁻ и антенного хромофора, функцию которого у большинства фотолиаз выполняют 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate, MTHF) или 8-гидроксидезафлавин (8-hydroxydeazaflavin, 8-HDF). Антенные хромофory интенсивно поглощают фотоны в области УФА и по физическому резонансному механизму передают энергию возбуждения к FADH⁻, повышая его потенциал

восстанавливать CPD или 6-4PP для последующей их репарации фотолиазами. Вследствие переноса электрона от возбуждённого FADH⁻ к CPD или 6-4PP образуются комплексы с переносом заряда между нейтральным радикалом флавина (FADH[•]) и анион-радикалом CPD или 6-4PP. Далее в анион-радикале CPD происходит перераспределение электронной плотности, вследствие чего циклобутановое кольцо расщепляется на два исходных пиримидина. Обратный перенос избыточного электрона на FADH[•] восстанавливает его в активную форму FADH⁻. По сравнению с репарацией CPD репарация 6-4PP — более сложный процесс. Это связано с тем, что для формирования двух неповреждённых пиримидинов анион-радикал 6-4PP должен быть предварительно конвертирован в другой интермедиат — оксетан [16, 29, 52]. Согласно данным кристаллографического анализа структуры комплекса PHR-домена *CraCRY* с фрагментом ДНК, содержащим 6-4PP [53], механизм репарации ДНК (6-4)-фотолиазой предполагает поглощение второго фотона для перехода от интермедиата оксетана к двум исходным пиримидинам.

Большинство данных по фотохимии криптохромов получено при изучении CRY1 и CRY2 *A. thaliana*, CPH1 и *CraCRY* *C. reinhardtii* и dCRY *D. melanogaster* [14, 50, 54–57]. В отличие от фотолиаз, эти криптохромы в основном состоянии содержат FAD в полностью окисленной форме и обычно (за исключением *CraCRY*, который дополнительно встраивает хромофор 8-HDF) не связывают антенный хромофор. Как следует из структур криптохромов, это обусловлено замещением ключевых аминокислотных остатков в белковых карманах, связывающих антенный хромофор, что препятствует его узнаванию и встраиванию.

При исследовании CRY1 и CPH1 с применением спектроскопии временного разрешения в ИК-, УФ- и видимой области установлено, что поглощение фотона синего света хромофором FAD индуцирует реакцию его восстановления в анион-радикал (FAD^{•-}) посредством переноса электрона от соседнего остатка триптофана — компонента консервативной Trp-триады. Сверхбыстрые реакции переноса электрона от триптофана (Trp₁H) к FAD и между концевым триптофаном (Trp₃H) и Trp₁H происходят за 0,4 пс и 31 пс соответственно. Формируемый при фотовосстановлении FAD анион-радикал FAD^{•-} протонируется у CRY1 и CPH1 в течение нескольких микросекунд и переходит в радикал FADH[•]. Донором протона в этой реакции может служить расположенный близко к изоаллоксазиновому кольцу флавина остаток

аспарагиновой кислоты. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, согласно которым замена аспарагиновой кислоты на цистеин в PHR-домене CPN1 полностью блокирует перенос протона [58]. Важное следствие реакции протонирования — стабилизация радикала флавина в состоянии $\text{FADH}^\bullet$ и продление его времени жизни до нескольких миллисекунд *in vitro* и нескольких минут *in vivo* [54, 59]. Свойство $\text{FADH}^\bullet$ поглощать свет в длинноволновой области спектра (500–650 нм) способствовало установлению его роли как сигнальной формы флавинового хромофора у CRYs. Было показано, что добавление зелёного света подавляет контролируемые криптохромом ответы на синий свет. Антагонистическое действие зелёного света коррелировало с уменьшением концентрации $\text{FADH}^\bullet$ в результате его фотовосстановления в неактивную форму FADH^- [14]. Редокс-фотоцикл FAD завершается реакцией $\text{FADH}^\bullet$ с кислородом и регенерацией исходной окисленной формы FAD (рис. 2).

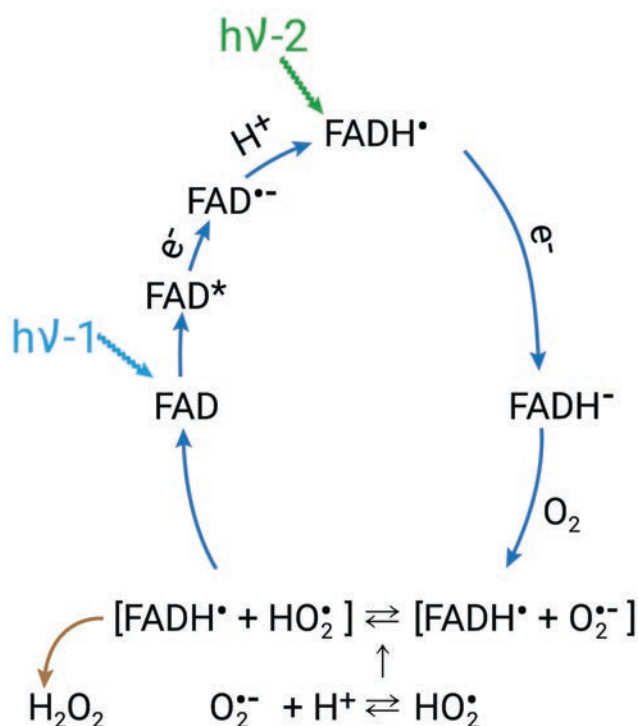


Рис. 2. Фотоцикл хромофора FAD с последовательными его переходами в три редокс-формы. Цикл завершается окислением FADH^- кислородом в исходную форму FAD. На первой стадии окисления интермедиатом может быть радикальная пара $[\text{FADH}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-}]$. На второй стадии супероксид $\text{O}_2^{\bullet-}$ заменяется на его протонированную форму $\text{HO}_2^\bullet$, с которой он находится в равновесии, и это приводит к окислению $\text{FADH}^\bullet$ в FAD с выходом H_2O_2 [60]; FAD^* — фотовозбуждённый FAD, $h\nu-1$ — фотон синего света, $h\nu-2$ — фотон длинноволнового видимого света в области 500–650 нм

Как уже было отмечено, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их ССЕ-доменом, тогда как PHR-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией ССЕ. После фотоактивации ССЕ-домен высвобождается и может затем взаимодействовать с некоторыми сигнальными белками. Однако вопрос о том, как высвобождение ССЕ связано с фотохимией криптохрома, оставался нерешённым. В исследовании с применением ИК-спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы $\text{FADH}^\bullet$ в *N*-концевом α/β -субдоме PHR фоторецептора CPN1 в течение 500 мкс происходит заметное изменение структуры β -листа. Этот факт рассматривается как свидетельство ключевой роли β -листа во взаимодействии PHR и ССЕ, а также в их разобщении и последующей деструктуризации ССЕ [58]. В недавнем исследовании получены дополнительные данные, демонстрирующие, что реорганизация именно β -листа вызывает диссоциацию ССЕ от PHR-домена фоторецептора CPN1 [61]. Интересно, что у CRY1 переход ССЕ в неупорядоченное состояние происходит за время 100 мс после формирования $\text{FADH}^\bullet$, т.е. намного позже. В предложенной на основе полученных данных модели показано, как структурные изменения синхронизируются с фотохимией флавинового хромофора у CRYs [58].

ФОТООЛИГОМЕРИЗАЦИЯ КРИПТОХРОМОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С СИГНАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ

Структуры фотоолигомеров криптохромов. Как отмечено выше, криптохромы с фотовосстановленным FAD подвергаются конформационным изменениям, которые могут приводить к разобщению PHR- и ССЕ-доменов [61]. Недавно было показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые их гомеоолигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRYs, так как повышает их сродство к сигнальным белкам [62]. К этим белкам относятся транскрипционные регуляторы, такие как CRY-interacting bHLHs (CIBs), взаимодействующие с фитохромом факторы — регуляторы транскрипции (phytochrome-interacting factors, PIFs, и CONSTANS, CO); регуляторы криптохромов, такие как PPKs и зависимые от сине-

го света ингибиторы CRYs (blue light inhibitors of CRYs, BICs), а также E3-лигазный комплекс constitutive photomorphogenic 1 (COP1)/suppressors of PHYA-105 1 (SPAs) [11, 23, 63]. В результате взаимодействия в комплексе гомоолигомера криптохрома с белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений [64]. Следует отметить, что ключевые детали этой модели не были точно определены, особенно в отношении структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера. Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структура—функция у CRYs [65, 66]. Показано, что мутации остатков Trp-триады у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление FAD *in vitro*, но не влияют на физиологическую активность мутантов *in vivo*. Некоторые мутанты (например, W374A у CRY2) проявляют конститутивную, т.е. независимую от света физиологическую активность. Эти мутанты способствовали определению структуры гомоолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант W374A CRY2 проявляет гомоолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2, и что его мутант W374A конститутивно активен *in vivo* [64]. В недавней работе с применением низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта W374A CRY2, у которого эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностей PHR-доменов. Мутации в интерфейсе гомодимера приводили к уменьшению его сродства 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 [67].

Структурные изменения в олигомерах PHR-домена CRY2 продемонстрированы также в недавнем исследовании, проведённом с кристаллическими структурами PHR-домена в фотоактивном тетрамерном и неактивном мономерном состояниях [68]. Формирование тетрамера опосредуется динамичной петлёй, связывающей PHR- и CSE-домены, которая способствует перемещению определённых остатков в α -6 для их участия в формировании активного интерфейса в олигомерном состоянии.

Взаимодействие CRY–BIC: ингибирование фотоолигомеризации и активации криптохромов.

Инактивация фоторецепторов играет важную роль в поддержании необходимого уровня их светозависимой функциональной активности и в предотвращении чрезмерной чувствительности клеток к воздействию света. Фотоактивированные криптохромы могут подвергаться инактивации по трём различным 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. Поэтому предполагается, что взаимодействие CRY–BIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету [68].

Анализ недавно полученной кристаллической структуры комплекса PHR-домена CRY2 с BIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки BIC могут инактивировать CRYs [69]. Во-первых, BIC может ингибировать фотовосстановление FAD, поскольку связывание BIC2 с PHR увеличивает расстояние между донором электрона (W397) и акцептором (изоаллоксазиновое кольцо FAD) на 1 Å, и это может затруднить перенос электрона. Кроме того, связывание BIC2 с PHR может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (D393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре на 5 Å. Такое изменение делает протонирование маловероятным. Соответственно, BIC2 может блокировать фотовосстановление FAD в FAD^{•+} и его протонирование с переходом в сигнальную форму FADH[•]. Во-вторых, BICs могут действовать как ингибиторы гомоолигомеризации криптохромов. В комплексе PHR-домена CRY2 с BIC2 структура фрагмента BIC2 определяет его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена. PHR 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 и BIC2 *in vitro*. Интерфейсы гетеродимера CRY2–BIC2 и гомодимера CRY2–CRY2 содержат по два остатка CRY2, а именно W349 и R208. На основании полученных данных предполагается, что связывание BICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRYs, блокируя тем самым активацию фоторецепторов.

Взаимодействия CRY–CIB и CRY–PIF: прямая регуляция экспрессии LRGs. Белок CIB1 был первым CRY-взаимодействующим транскрипционным регулятором, идентифицированным у растений. Как было установлено, CIB1 при взаимодействии с фотоактивированным CRY2 индуцирует транскрипцию гена *FLOWERING LOCUS T (FT)*, который кодирует центральный регулятор инициации цветения [70]. Было также показано, что другие CIB-белки (CIB2, CIB4 и CIB5) взаимодействуют с фотоактивированным CRY2 и связываются с *FT*-промотором [71]. Наиболее вероятно, что CRY2 не влияет на сродство CIB-белков к ДНК или хроматину [70, 71], однако они напрямую взаимодействуют с транскрипционным фактором CO для инициации цветения [72]. В соответствии с выдвинутым предположением CRY2 может изменить CIB–CO-взаимодействие, обеспечивая тем самым последующую транскрипцию *FT*-гена. Вопрос о том, как именно CRY2/CIB1-комплекс опосредует регуляцию LRGs, остаётся пока невыясненным.

Помимо CIB-белков, CRYs взаимодействуют с другой группой транскрипционных факторов – PIF-белками, которые вовлекаются в фотоморфогенетические ответы, опосредованные фитохромами [17, 19, 22]. Фотоактивированные CRY1 и CRY2 могут физически взаимодействовать с PIF4 и PIF5 посредством PHR-доменов CRYs и *N*-концевых доменов PIF-белков [73, 74]. Как было показано, в условиях затенения уменьшается не только соотношение интенсивностей красного/дальнего красного света, но и интенсивность синего света; при этом и CRYs, и фитохром В

(phytochrome В, phyВ) опосредуют фотоответы избегания тени [20, 74]. Известно, что phyВ, связываясь с PIF3, вызывает его фосфорилирование и убиквитин-зависимую деградацию [75]. Однако в условиях затенения phyВ-индуцированная деградация PIF3 ослабляется, и это способствует росту растения на слабом синем свете. Интересно, что в таких условиях CRYs могут подавлять деградацию PIF1 [76]. Согласно выдвинутому предположению, при низкой интенсивности синего света происходит уменьшение эффективности фотоолигомеризации криптохрома и ослабление CRY–PIF-взаимодействия с последующим накоплением PIF-белков. Следует отметить, что взаимодействие CRY–PIF, как и CRY–CIB-взаимодействие, не влияет на сродство PIFs к ДНК или хроматину, хотя изменяет их активность в регуляции транскрипции.

Фосфорилирование криптохромов PPKs. Хорошо известно, что CRY1 и CRY2 подвергаются светозависимому фосфорилированию в растительных клетках [77, 78], причём фосфорилирование CRY2 не только повышает активность фоторецептора, но также способствует его деградации с участием E3-убиквитинлигаз [37, 77, 79, 80]. В изолированных CRY2-белках выявлено много разных фосфорилированных остатков, включая семь основных фосфосеринов, и уровень фосфорилирования почти всех этих остатков возрастает в ответ на действие синего света. Мутант SCRY2D не подвергается фосфорилированию и частично утрачивает физиологические функции.

Фосфорилирование CRY2 происходит преимущественно в ядре и повышает как его активность, так и дестабилизацию посредством

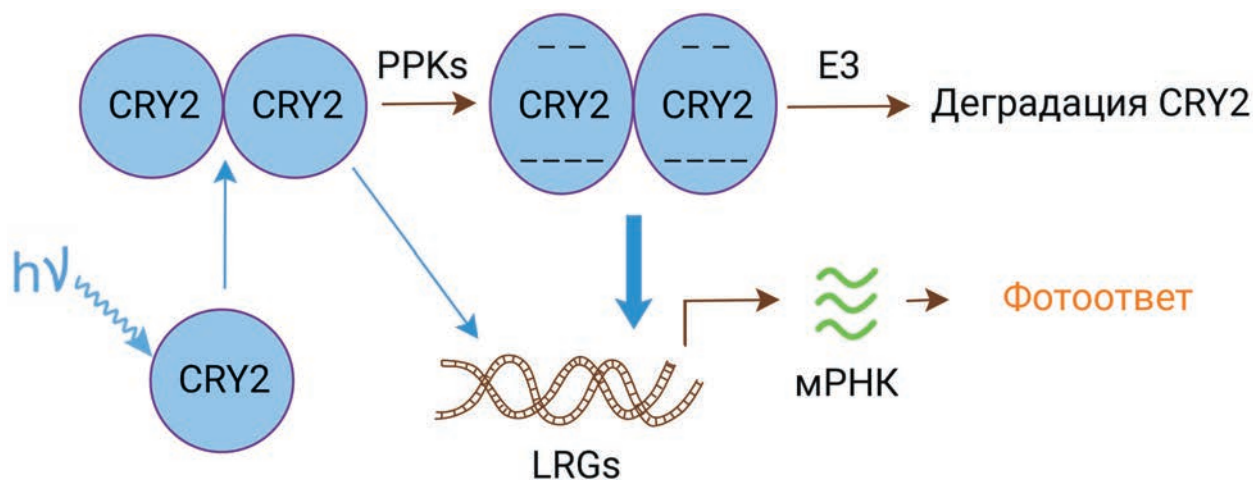


Рис. 3. CRY2 подвергается светозависимым процессам олигомеризации и фосфорилирования, катализируемого PPKs. Это приводит к формированию полностью активного димера CRY2, который эффективно опосредует регуляцию LRGs, что сопровождается транскрипцией мРНК и фотобиологическим ответом. Фосфорилированный CRY2 подвергается также деградации с участием E3-убиквитинлигазы; *hν* – фотон синего света

фотоиндуцированного изменения конформации фоторецептора [81]. Установлено, что четыре сходные PPKs, специфичные для растений, катализируют светозависимое фосфорилирование CRY1 и CRY2 *in vivo*. Все PPKs взаимодействуют в основном с нефосфорилированными CRY-белками и с избытком фосфорилируют их. Фосфорилирующая активность в отношении CRY1 и CRY2 почти отсутствует у тройных мутантов PPKs; кроме того, CRY2 не подвергается деградации этими мутантами, что свидетельствует о необходимости фосфорилирования CRY2 для его последующего убиквитин-зависимого протеолиза. Эти результаты подтверждают модель, демонстрирующую, что фотоактивированные CRYs фосфорилируются четырьмя структурно схожими PPKs, и это вызывает конформационные изменения, повышающие физиологическую активность CRY1 и CRY2, а также деградацию CRY2 [81] (рис. 3).

Кроме криптохромов, у PPKs есть другие субстраты, включая белок PIF3, который вовлекается в сигнальный путь фитохромов. На основании полученных данных предложен механизм, обеспечивающий координацию совместных действий криптохромов и фитохромов в фотоморфогенезе растений в ответ на разные длины волн света в естественных условиях [75, 81].

Взаимодействия криптохромов с комплексом COP1/SPA: непрямая регуляция транскрипции. Общепринято, что COP1, который был первым сигнальным белком, идентифицированным у растений [82, 83], является центральным репрессором фотоморфогенеза, и это подтверждено изучением разных сенсорных фоторецепторов — криптохромов, фитохромов и UVR8 [84–87]. Структура COP1 включает *N*-концевой домен Really Interesting New Gene (RING), домен coiled-coil и *C*-концевой WD40-домен. COP1 действует *in vivo* в комплексе с четырьмя подобными ему белками SPA (SPA1–SPA4), отличие которых от COP1 заключается в том, что в их доменной структуре RING-домен заменён на подобный киназе домен, проявляющий, как недавно было показано, киназную активность [88–90]. Тетрамерный COP1/SPA-комплекс из двух COP1- и двух SPA-белков функционирует как E3-убиквитинлигаза и участвует в деградации транскрипционных факторов, которые вовлекаются в сигнальные пути фоторецепторов, регулирующих процессы фотоморфогенеза у растений [86].

В темноте COP1 находится преимущественно в ядре, где транскрипционные фак-

торы метятся для убиквитинации. Белки SPA не требуются для ядерной локализации COP1, однако в отсутствие SPA-белков COP1 не проявляет активности [91]. Опознание транскрипционных факторов происходит посредством *C*-концевых WD40-доменов COP1 и SPAs [90]. Поскольку WD40-домен SPA1 может замещать WD40-домен у COP1, но не наоборот, функции этого домена у двух белков, вероятно, сходны, но не идентичны [92]. Свет индуцирует релокализацию COP1 в цитозоль, и, как показано, это может содействовать стабилизации мишени COP1 в ядре — транскрипционного фактора LONG HYPOCOTYL 5 (HY5) [93]. Установлено, что опосредованный фотоактивированным CRY1 выход COP1 из ядра не зависит от SPAs, тогда как этот процесс, индуцированный дальним красным светом с участием фитохрома A, зависит от SPA-белков, а фитохром B, активированный красным светом, менее эффективен в удалении COP1 из ядра [87]. Очевидные различия в инициации фитохромами и CRY1 процесса выхода COP1 из ядра свидетельствуют о разных механизмах участия этих фоторецепторов в светозависимой релокализации COP1 в цитозоль, однако конкретные сигнальные механизмы действия каждого фоторецептора остаются пока невыясненными. Кроме того, неизвестно, происходит ли также светозависимая релокализация в цитозоль и SPA-белков.

Помимо отделения COP1 от транскрипционных факторов, их стабилизация может быть достигнута CRY-опосредованным разрушением COP1–SPA-взаимодействий, сопровождаемым инактивацией убиквитинлигазной активности COP1/SPA-комплекса. Как было показано, регуляция активности COP1/SPA осуществляется светозависимым взаимодействием CRY1 и CRY2 с белками SPA [94–96]. Интересно, что фоторецепторы CRY1 и CRY2 взаимодействуют с белком SPA1 разными структурными доменами. CRY1 посредством CSE-домена взаимодействует с WD40-доменом белка SPA1. Такое взаимодействие приводит к ослаблению связывания SPA1 с COP1 с последующей диссоциацией и физическим разделением белков. В результате подавляется COP1/SPA-лигазная активность и стабилизируется транскрипционный фактор HY5, регулирующий рост гипокотилия [87, 94, 95]. В противоположность этому *N*-концевой PHR-домен CRY2 взаимодействует с *N*-концевым подобным киназе доменом SPA1, что усиливает COP1–SPA-взаимодействия и повышает стабильность комплекса. В этом состоянии COP1/SPA1 E3-убиквитинлигазная активность

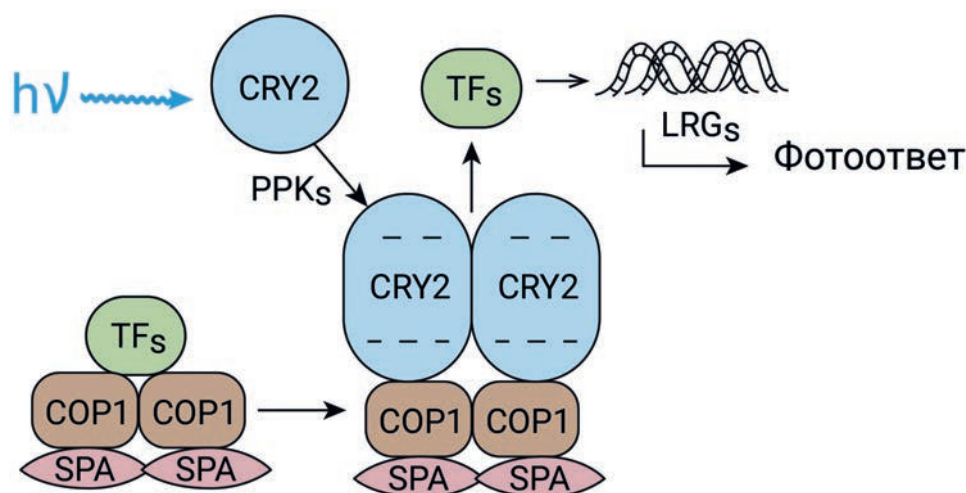


Рис. 4. Модель инактивации убиквитинлигазной активности COP1/SPA-комплекса, вовлекаемого в деградацию транскрипционных факторов (transcription factors, TFs). Фотоактивированный CRY2 в олигомерном фосфорилированном состоянии конкурирует с TFs за связывание с COP1 в комплексе COP1/SPA и вытесняет TFs из комплекса с последующей их стабилизацией и участием в экспрессии LRGs; $h\nu$ – фотон синего света

также уменьшается, и последующая стабилизация транскрипционного фактора CO обеспечивает инициацию им фотопериодического цветения [96]. Вопрос о том, как в точности взаимодействие CRY2 с белком SPA1 ингибирует активность COP1/SPA-комплекса, остаётся нерешённым.

Помимо взаимодействия с белками SPA, CRYs C-концевыми доменами могут напрямую взаимодействовать с COP1 [82, 83], причём CRY1–COP1-взаимодействие зависит от SPA-белков, тогда как CRY2–COP1-взаимодействие от них не зависит [97]. Как продемонстрировано в недавних исследованиях, фотоактивированный CRY2 инактивирует COP1/SPA-комплекс путём конкурентного вытеснения субстратов COP1, а именно, транскрипционных факторов, которые взаимодействуют с WD40-доменом COP1 [84, 98, 99]. Этот механизм основан на том, что структуры CRY2 и субстратов COP1 содержат консервативный Val-Pro (VP)-пептид. Как следует из анализа кристаллических структур COP1 с VP-содержащими пептидами и WD40-домена COP1 с VP-содержащим пептидом CRY2, CRY2 и субстраты COP1 взаимодействуют с WD40-доменом COP1 через свои соответствующие VP-пептиды и могут конкурировать за связывание с одним и тем же доменом COP1 [98]. Эти данные подтверждают механизм, в соответствии с которым инактивация COP1/SPA-комплекса фотоактивированным CRY2 происходит в результате конкурентного вытеснения субстратов COP1. Последующее накопление транскрипционных факторов приводит к активации экспрессии реагирующих на свет генов и процессов фотоморфогенеза растений (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи в изучении молекулярных основ сигнальных процессов, опосредуемых криптохромами у растений, связаны с идентификацией в последнее время разнообразных сигнальных белков, которые образуют комплексы с фотоактивированными олигомерами криптохромных молекул. Светозависимые взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая прямую (CIB- и PIF-белки) или опосредованную (COP1/SPA-белки) регуляцию ими транскрипции реагирующих на свет генов и процессов фотоморфогенетического развития растений. Негативные регуляторы криптохромов, белки BIC, могут блокировать фотосенсорные процессы, запускаемые фотохимическими превращениями хромофора FAD, и препятствовать олигомеризации фоторецепторов. Механизмы действия BICs недавно подтверждены кристаллической структурой комплекса BIC2 с PHR-доменом CRY2. Также в недавних исследованиях с привлечением кристаллографического анализа раскрыт механизм инактивации COP1/SPA-комплекса, вовлекаемого в деградацию транскрипционных факторов. Механизм подавления фотоактивированным CRY2 активности COP1/SPA-комплекса основан на конкурентном связывании фоторецептора с COP1 и вытеснении COP1-взаимодействующих транскрипционных факторов с последующей их стабилизацией. Вместе с тем детали структурных основ взаимодействий криптохромов в комплексах с другими сигнальными белками пока не выявлены. Ещё один важный вопрос, требующий прояснения, относится к динамике

комплексов криптохромов с взаимодействующими сигнальными белками, а именно, какие точные механизмы могут обеспечивать регуляцию формирования таких комплексов и их диссоциации, и это, по-видимому, представляет собой наиболее привлекательную задачу для дальнейших исследований.

Вклад авторов. Г.Я. Фрайкин — концепция, анализ публикаций, написание текста; Н.С. Беленикина — оформление рукописи и

рисунков; А.Б. Рубин — обсуждение материала рукописи с соавторами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая работа не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей и использования животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Losi, A., and Gartner, W. (2012) The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 49-72, doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105538.
2. Fraikin, G. Ya., Strakhovskaya, M. G., and Rubin, A. B. (2013) Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1238-1253, doi: 10.1134/S0006297913110047.
3. Li, F.-W., and Mathews, S. (2016) Evolutionary aspects of plant photoreceptors, *J. Plant Res.*, **129**, 115-122, doi: 10.1007/s10265-016-0785-4.
4. Podolec, R., Demarsy, E., and Ulm, R. (2021) Perception and signaling of ultraviolet-B radiation in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **72**, 793-822, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095946.
5. Inoue, K., Nishihama, R., and Kohchi, T. (2017) Evolutionary origin of phytochrome responses and signaling in land plants, *Plant Cell Environ.*, **40**, 2502-2508, doi: 10.1111/pce.12908.
6. Fraikin, G. Ya., Strakhovskaya, M. G., Belenikina, N. S., and Rubin, A. B. (2015) Bacterial photosensory proteins: regulatory functions and optogenetic applications, *Microbiology*, **84**, 461-472, doi: 10.1134/S0026261715040086.
7. Demarsy, E., Goldschmidt-Clemont, M., and Ulm, R. (2018) Coping with “dark sides of the sun” through photoreceptor signaling, *Trends Plant Sci.*, **23**, 260-271, doi: 10.1016/j.tplants.2017.11.007.
8. Фрайкин Г. Я. (2018) Белковые сенсоры света: фотовозбуждённые состояния, сигнальные свойства и применение в оптогенетике, АР-Консалт, Москва.
9. Ponnu, J., and Hoecker, U. (2022) Signaling mechanisms by Arabidopsis cryptochromes, *Front. Plant Sci.*, **13**, 844714, doi: 10.3389/fpls.2022.844714.
10. Vechtomova, Y. L., Telegina, T. A., and Kritsky, M. S. (2020) Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family, *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl. 1), S131-S153, doi: 10.1134/S0006297920140072.
11. Wang, Q., and Lin, C. (2020) Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **71**, 103-129, doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100300.
12. Fraikin, G. (2017) *Photobioregulatory Receptors*, Lambert Academic Publishing, Saarbrücken.
13. Sun, K., and Zhu, Z. (2018) Illuminating the nucleus: UVR8 interacts with more, *Trends Plant Sci.*, **23**, 279-281, doi: 10.1016/j.tplants.2018.03.002.
14. Ahmad, M. (2016) Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **33**, 108-115, doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.013.
15. Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., and Sullivan, S. (2015) Plant flavoprotein photoreceptors, *Plant Cell Physiol.*, **56**, 401-413, doi: 10.1093/pcp/pcu196.
16. Фрайкин Г. Я., Рубин А. Б. (2022) В кн. *Горизонты биофизики*. Т. 1 (под ред. Рубина А. Б.), Институт компьютерных исследований, М.-Ижевск, с. 426-454.
17. Cheng, M. C., Kathare, P. K., Paik, I., and Huq, E. (2021) Phytochrome signaling networks, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **72**, 217-244, doi: 10.1146/annurev-arplant-080620-024221.
18. Bae, G., and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 281-311, doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859.
19. Franklin, K. A., and Quail, P. H. (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development, *J. Exp. Bot.*, **61**, 11-24, doi: 10.1093/jxb/erp304.
20. Fraser, D. P., Hayes, S., and Franklin, K. A. (2016) Photoreceptor crosstalk in shade avoidance, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **33**, 1-7, doi: 10.1016/j.pbi.2016.03.008.
21. Chen, M., and Chory, J. (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development, *Trends Cell Biol.*, **21**, 664-671, doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.002.
22. Pham, V. N., Kathare, P. K., and Huq, E. (2018) Phytochromes and phytochrome interacting factors, *Plant Physiol.*, **176**, 1025-1038, doi: 10.1104/pp.17.01384.

23. Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Liu, Q., Gu, L., Oka, Y., and Lin, C. (2018) Beyond the photocycle – how cryptochromes regulate photoresponses in plants? *Curr. Opin. Plant Biol.*, **45**, 120-126, doi: 10.1016/j.pbi.2018.05.014.
24. Demarsy, E., and Fankhauser, C. (2009) Higher plants use LOV to perceive blue light, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 69-74, doi: 10.1016/j.pbi.2008.09.002.
25. Christie, J. M., Arvai, A. S., Baxter, K. J., Heilmann, M., Pratt, A. J., O'Hara, A., Kelly, S. M., Hothorn, M., Smith, B. O., Hitomi, K., Jenkins, G. I., and Getzoff, E. D. (2012) Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges, *Science*, **335**, 1492-1496, doi: 10.1126/science.1218091.
26. Fraikin, G. Ya. (2018) Signaling mechanisms regulating diverse plant cell responses to UVB radiation, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 787-794, doi: 10.1134/S0006297918070027.
27. Rockwell, N. C., Shang, L., Martin, S. S., and Lagarias, J. C. (2009) Distinct classes of red/far-red photochemistry within the phytochrome superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6123-6127, doi: 10.1073/pnas.0902370106.
28. Schwinn, K., Ferre, N., and Huix-Rotllant, M. (2020) UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 12447-12455, doi: 10.1039/d0cp01714k.
29. Fraikin, G. Ya. (2022) Photosensory and signaling properties of cryptochromes, *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.*, **77**, 54-63, doi: 10.3103/S0096392522020031.
30. Ahmad, M., and Cashmore, A. R. (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, **366**, 162-166, doi: 10.1038/366162a0.
31. Sancar, A. (2004) Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors, *Adv. Protein Chem.*, **69**, 73-100, doi: 10.1016/S0065-3233(04)69003-6.
32. Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., and Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals, *Science*, **284**, 760-765, doi: 10.1126/science.284.5415.760.
33. Muller, M., and Carell, T. (2009) Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 277-285, doi: 10.1016/j.sbi.2009.05.003.
34. Zoltowski, B. D. (2015) Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 8811-8812, doi: 10.1073/pnas.1511092112.
35. Takahashi, J. S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 164-179, doi: 10.1038/nrg.2016.150.
36. Wu, G., and Spalding, E. P. (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18813-18818, doi: 10.1073/pnas.0705082104.
37. Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., and Lin, C. (2007) *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its post-translational life cycle in the nucleus, *Plant Cell*, **19**, 3146-3156, doi: 10.1105/tpc.107.053017.
38. Pooam, M., Arthaut, L.-D., Burdick, D., Link, J., Martino, C. F., and Ahmad, M. (2019) Magnetic sensitivity mediated by the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark, *Planta*, **249**, 319-332, doi: 10.1007/s00425-018-3002-y.
39. Zoltowski, B. D., Chelliah, Y., Wickramaratne, A., Jarecha, L., Karki, N., Xu, W., Mouritsen, H., Hore, P. J., Hibbs, R. E., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2019) Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19449-19457, doi: 10.1073/pnas.1907875116.
40. Petersen, J., Rredhi, A., Szyttenholm, J., Oldemeyer, S., Kottke, T., and Mittag, M. (2021) The world of algae reveals a broad variety of cryptochrome properties and functions, *Front. Plant Sci.*, **12**, 748760, doi: 10.3389/fpls.2021.766509.
41. Palayam, M., Ganapathy, J., Guercio, A. M., Tal, L., Deck, S. L., and Shabek, K. N. (2021) Structural insights into photoactivation of plant cryptochrome-2, *Commun. Biol.*, **4**, 28, doi: 10.1038/s42003-020-01531-x.
42. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.-O., van der Horst, G. T., Batschauer, A., and Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 335-364, doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103759.
43. Ozturk, N. (2017) Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 1-22, doi: 10.1111/php.12676.
44. Zhang, M., Wang, L., and Zhong, D. (2017) Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair, *Arch. Biochem. Biophys.*, **632**, 158-174, doi: 10.1016/j.abb.2017.08.007.
45. Bayram, O., Braus, G. H., Fischer, R., and Rodriguez-Romero, J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems, *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 900-908, doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.008.
46. Konig, S., Juhas, M., Jager, S., Kottke, T., and Buchel, C. (2017) The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms, *J. Plant Physiol.*, **217**, 15-19, doi: 10.1016/j.plph.2017.06.015.
47. Kottke, T., Oldemeyer, S., Wenzel, S., Zou, Y., and Mittag, M. (2017) Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions, *J. Plant Physiol.*, **217**, 4-14, doi: 10.1016/j.plph.2017.05.021.
48. Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Van Gelder, R. N., and Partch, C. L. (2017) Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping

- and beyond, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 128-140, doi: 10.1111/php.12677.
49. Oldemeyer, S., Franz, S., Wenzel, S., Essen, L.-O., Mittag, M., and Kottke, T. (2016) Essential role of an unusual long-lived tyrosil radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY, *J. Biol. Chem.*, **291**, 14062-14071, doi: 10.1074/jbc.M116.726976.
 50. Paulus, B., Bajzath, C., Melin, F., Heidinger, L., Kromm, V., Herkersdorf, C., Benz, U., Mann, L., Stehle, P., Hellwig, P., Weber, S., and Schleicher, E. (2015) Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states, *FEBS J.*, **282**, 3175-3189, doi: 10.1111/febs.13299.
 51. Zoltowski, B. D., Vaidya, A. T., Top, D., Widom, J., Young, M. W., and Crane, B. R. (2011) Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome, *Nature*, **480**, 396-399, doi: 10.1038/nature10618.
 52. Sancar, A. (2008) Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary, *J. Biol. Chem.*, **283**, 32153-32157, doi: 10.1074/jbc.R800052200.
 53. Franz, S., Ignatz, E., Wenzel, S., Zielosko, H., Putu, E., Maestre-Reyna, M., Tsai, M.-D., Yamamoto, J., Mittag, M., and Essen, L.-O. (2018) Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8010-8022, doi: 10.1093/nar/gky621.
 54. Hense, A., Herman, E., Oldemeyer, S., and Kottke, T. (2015) Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome, *J. Biol. Chem.*, **290**, 1743-1751, doi: 10.1074/jbc.M114.606327.
 55. Lacombat, F., Espagne, A., Dozova, N., Plaza, P., Muller, P., Brettel, K., Franz-Badur, S., and Essen, L.-O. (2019) Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome, *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 13394-13409, doi: 10.1021/jacs.9b03680.
 56. Oldemeyer, S., Haddad, A. Z., and Fleming, G. R. (2020) Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome, *Biochemistry*, **59**, 594-604, doi: 10.1021/acs.biochem.9b00875.
 57. Goett-Zink, L., and Kottke, T. (2021) Plant cryptochromes illuminated: a spectroscopic perspective on the mechanism, *Front. Chem.*, **9**, 780199, doi: 10.3389/fchem.2021.780199.
 58. Thoing, C., Oldemeyer, S., and Kottke, T. (2015) 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.*, **137**, 5990-5999, doi: 10.1021/jacs.5b01404.
 59. Herbel, V., Orth, C., Wenzel, R., Ahmad, M., Bittl, R., and Batschauer, A. (2013) Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states *in vivo*, *Plant J.*, **74**, 583-592, doi: 10.1111/tpj.12144.
 60. Muller, P., and Ahmad, M. (2011) Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21033-21040, doi: 10.1074/jbc.M111.228940.
 61. Goett-Zink, L., Toschke, A. L., Petersen, J., Mittag, M., and Kottke, T. (2021) C-terminal extension of plant cryptochrome dissociates from the β -sheet of the flavin-binding domain, *J. Phys. Chem. Lett.*, **12**, 5558-5563, doi: 10.1021/acs.jpcclett.1c00844.
 62. Liu, Q., Su, T., He, W., Ren, H., Liu, S., Chen, Y., Gao, L., Hu, X., Lu, H., Cao, S., Huang, Y., Wang, X., Wang, Q., and Lin, C. (2020) Photooligomerization determines photosensitivity and photoreactivity of plant cryptochromes, *Mol. Plant.*, **13**, 398-413, doi: 10.1016/j.molp.2020.01.002.
 63. Yang, Z., Liu, B., Su, J., Liao, J., Lin, C., and Oka, Y. (2017) Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants, *Photochem. Photobiol.*, **93**, 112-127, doi: 10.1111/php.12663.
 64. Wang, Q., and Lin, C. (2020) A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 401-403, doi: 10.1038/s41594-020-0432-6.
 65. Gao, J., Wang, X., Zhang, M., Bian, M., Deng, W., Zuo, Z., Yang, Z., Zhong, D., and Lin, C. (2015) Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9135-9140, doi: 10.1073/pnas.1504404112.
 66. Liu, H., Su, T., He, W., Wang, G., and Lin, C. (2020) The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes, *Mol. Biol. Evol.*, **37**, 327-340, doi: 10.1093/molbev/msz217.
 67. Shao, K., Zhang, X., Li, X., Hao, Y., Huang, X., Ma, M., Zhang, M., Yu, F., Liu, H., and Zhang, P. (2020) The oligomeric structures of plant cryptochromes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 480-488, doi: 10.1038/s41594-020-0420-x.
 68. Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Gu, L., Koshizumi, T., Yang, Z., Yang, L., Liu, Q., Liu, W., Han, Y. J., Kim, J. I., Liu, B., Wohlschlegel, J. A., Matsui, M., Oka, Y., and Lin, C. (2016) Photoactivation and inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Science*, **354**, 343-347, doi: 10.1126/science.aaf9030.
 69. Ma, L., Wang, X., Guan, Z., Wang, L., Wang, Y., Zheng, L., Gong, Z., Shen, C., Wang, J., Zhang, D., Liu, Z., and Yin, P. (2020) Structural insight into BIC-mediated inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 472-479, doi: 10.1038/s41594-020-0410-z.
 70. Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D., and Lin, C. (2008) Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral

- initiation in *Arabidopsis*, *Science*, **322**, 1535-1539, doi: 10.1126/science.1163927.
71. Liu, Y., Li, X., Li, K., Lin, H., and Lin, C. (2013) Multiple bHLH proteins form heterodimers to mediate CRY2-dependent regulation of flowering-time in *Arabidopsis*, *PLoS Genet.*, **9**, e1003861, doi: 10.1371/journal.pgen.1003861.
 72. Liu, Y., Li, X., Ma, D., Chen, Z., Wang, J.-W., and Liu, H. (2018) CIB and CO interact to mediate CRY2-dependent regulation of flowering, *EMBO Rep.*, **19**, e45762, doi: 10.15252/embr.2018.45762.
 73. Ma, D., Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J. P., and Liu, H. (2016) Cryptochrome 1 interacts with PIFs to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 224-229, doi: 10.1073/pnas.1511437113.
 74. Pedmale, U. V., Huang, S. C., Zander, M., Cole, B. J., Herzel, J., Nery, J. R., and Ecker, J. R. (2016) Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light, *Cell*, **164**, 233-245, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.018.
 75. Ni, W., Xu, S.-L., Gonzalez-Grandio, E., Chalkley, R. J., Huhmer, A. F. R., Burlingame, A. L., Wang, Z.-Y., and Qual, P. H. (2017) PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3, *Nat. Commun.*, **8**, 15236, doi: 10.1038/ncomms15236.
 76. Castillon, A., Shen, H., and Huq, E. (2009) Blue light induces degradation of the negative regulator phytochrome interacting factor 1 to promote photomorphogenic development of *Arabidopsis* seedlings, *Genetics*, **182**, 161-171, doi: 10.1534/genetics.108.099887.
 77. Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T. C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G. C., and Lin, C. (2002) Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation, *Nature*, **417**, 763-767, doi: 10.1038/nature00815.
 78. Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., and Lin, C. (2003) Blue-light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1, *Plant Cell*, **15**, 2421-2429, doi: 10.1105/tpc.013011.
 79. Weidler, G., zur Oven-Krockhaus, S., Heunemann, M., Orth, C., Schleifenbaum, F., Harter, K., Hoecker, U., and Batschauer, A. (2012) Degradation of *Arabidopsis* CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A, *Plant Cell*, **24**, 2610-2623, doi: 10.1105/tpc.112.098210.
 80. Liu, Q., Wang, Q., Liu, B., Wang, W., Wang, X., Park, J., Yang, Z., Du, X., Bian, M., and Lin, C. (2016) The blue-light-dependent polyubiquitination and degradation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 requires multiple E3 ubiquitin ligases, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 2175-2186, doi: 10.1093/pcp/pcw134.
 81. Liu, Q., Wang, Q., Deng, W., Wang, X., Piao, M., Cai, D., Li, Y., Barshop, W. D., Yu, X., Zhou, T., Liu, B., Oka, Y., Wohlschlegel, J., Zuo, Z., and Lin, C. (2017) Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2, *Nat. Commun.*, **8**, 15234, doi: 10.1038/ncomms15234.
 82. Wang, H., Ma, L. G., Li, G. M., Zhao, H. Y., and Deng, X. W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development, *Science*, **294**, 154-158, doi: 10.1126/science.1063630.
 83. Yang, H.-Q., Tang, R.-H., and Cashmore, A. R. (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1, *Plant Cell*, **13**, 2573-2587, doi: 10.1105/tpc.010367.
 84. Ponnu, J. (2020) Molecular mechanisms suppressing COP1/SPA E3 ubiquitin ligase activity in blue light, *Physiol. Plant*, **169**, 418-429, doi: 10.1111/ppl.13103.
 85. Heijde, M., and Ulm, R. (2012) UV-B photoreceptor-mediated signaling in plants, *Trends Plant Sci.*, **17**, 230-237, doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.007.
 86. Hoecker, U. (2017) The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **37**, 63-69, doi: 10.1016/j.pbi.2017.03.015.
 87. Podolec, R., and Ulm, R. (2018) Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **45**, 18-25, doi: 10.1016/j.pbi.2018.04.018.
 88. Paik, I., Chen, F., Ngoc Pham, V., Zhu, L., Kim, J. I., and Huq, E. (2019) A phyB-PIF1-SPA1 kinase regulatory complex promotes photomorphogenesis in *Arabidopsis*, *Nat. Commun.*, **10**, 4216, doi: 10.1038/s41467-019-12110-y.
 89. Wang, W., Paik, I., Kim, J., Hou, X., Sung, S., and Huq, E. (2021) Direct phosphorylation of HY5 by SPA kinases to regulate photomorphogenesis in *Arabidopsis*, *New Phytol.*, **230**, 2311-2326, doi: 10.1111/nph.17332.
 90. Ponnu, J., and Hoecker, U. (2021) Illuminating the COP1/SPA ubiquitin ligase: fresh insight into its structure and functions during plant photomorphogenesis, *Front. Plant Sci.*, **12**, 662793, doi: 10.3389/fpls.2021.662793.
 91. Balzerowicz, M., Kemer, K., Schenkel, C., and Hoecker, U. (2017) SPA proteins affect the sub-cellular localization of COP1 in the COP1/SPA ubiquitin ligase complex during photomorphogenesis, *Plant Physiol.*, **174**, 1314-1321, doi: 10.1104/pp.17.00488.
 92. Kerner, K., Nagano, S., Lubbe, A., and Hoecker, U. (2021) Functional comparison of the WD-repeat domains of SPA1 and COP1 in suppression of photomorphogenesis, *Plant Cell Environ.*, **44**, 3273-3282, doi: 10.1111/pce.14128.
 93. Pacin, M., Legris, M., and Casal, J. J. (2014) Rapid decline in nuclear constitutive photomorphogenesis 1 abundance anticipates the stabilization of its target ELONGATED hypocotyl 5 in the light, *Plant Physiol.*, **164**, 1134-1138, doi: 10.1104/pp.113.234245.
 94. Lian, H. L., He, S. B., Zhang, Y. C., Zhu, D. M., Zhang, J. Y., Jia, K. P., San, S. X., Li, L., and Yang, H. Q.

- (2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism, *Genes Dev.*, **25**, 1023-1028, doi: 10.1101/gad.2025111.
95. Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., and Lin, C. (2011) *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light, *Genes Dev.*, **25**, 1029-1034, doi: 10.1101/gad.2025011.
 96. Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., and Lin, C. (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*, *Curr. Biol.*, **21**, 841-847, doi: 10.1016/j.cub.2011.03.048.
 97. Holtkotte, X., Ponnu, J., Ahmad, M., and Hoecker, U. (2017) The blue light-induced interaction of cryptochrome 1 with COP1 requires SPA proteins during *Arabidopsis* light signaling, *PLoS Genet.*, **13**, e1007044, doi: 10.1371/journal.pgen.1007044.
 98. Lau, K., Podolec, R., Chappuis, R., Ulm, R., and Hothorn, M. (2019) Plant photoreceptors and their signaling components compete for COP1 binding via VP peptide motifs, *EMBO J.*, **38**, e102140, doi: 10.15252/embj.2019102140.
 99. Ponnu, J., Riedel, T., Penner, E., Schrader, A., and Hoecker, U. (2019) Cryptochrome 2 competes with COP1-substrates to repress COP1 ligase activity during *Arabidopsis* photomorphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 27133-27141, doi: 10.1073/pnas.1909181116.

MOLECULAR BASES OF SIGNALING PROCESSES REGULATED BY CRYPTOCHROME SENSORY PHOTORECEPTORS IN PLANTS

Review

G. Ya. Fraikin*, N. S. Belenikina, and A. B. Rubin

Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: Gfraikin@yandex.ru

The blue-light sensors cryptochromes compose the widespread class of flavoprotein photoreceptors, regulating in plants signaling processes underlying their development, growth, and metabolism. In several algae cryptochromes may act not only as sensory photoreceptors but also as photolyases, catalyzing the repair of UV-induced DNA lesions. Cryptochromes bind FAD as the chromophore in the photolyase homologous region (PHR) domain and contain the cryptochrome C-terminal extension (CCE), which lacks in photolyases. Photosensory process in cryptochrome is initiated by photochemical chromophore conversions, including the formation of FAD redox forms. In a state with the chromophore reduced to neutral radical (FADH[•]), photoreceptor protein undergoes phosphorylation, conformational changes, and disengagement of the PHR domain and CCE with the subsequent formation of oligomers of cryptochrome molecules. Photooligomerization is a structural basis of functional activity of cryptochromes, which determines the formation of their complexes with variety of signaling proteins, including transcriptional factors and transcription regulators. Interactions in such complexes change the protein signaling activity, leading to gene expression regulation and plant photomorphogenesis. In recent years, multiple papers, reporting novel, more detailed information about molecular mechanisms of above-mentioned processes were published. The present review largely focuses on the analysis of data contained in these publications, particularly regarding structural aspects of cryptochrome transitions into photoactivated states and regulatory signaling processes mediated by cryptochrome photoreceptors in plants.

Keywords: cryptochrome photoreceptors, FAD chromophore, photosensory process, photo oligomerization, signaling proteins and mechanisms, light-responsive gene regulation