

BIAŁKA PR-10 JAKO REZERWUAR LIGANDÓW HYDROFOBOWYCH W KOMÓRCZE ROŚLINNEJ

PR-10 PROTEINS AS A RESERVOIR
OF HYDROPHOBIC LIGANDS IN PLANT CELLS

Mariusz JASKÓLSKI

Centrum Badań Biokryystalograficznych, IChB PAN;
Zakład Krystalografii, Wydział Chemii,
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: Roślinne białka związane z patogenezą z klasy 10 (PR-10) mają dobrze zdefiniowaną strukturę, lecz niejasną funkcję fizjologiczną. Odkrycie, że białka wiążące hormony roślinne z grupy cytokinin (CSBP) należą strukturalnie do grupy PR-10, sugeruje wiązanie hydrofobowych ligandów jako ogólną rolę biologiczną dla całej tej klasy. Potwierdzają to struktury kompleksów lubinowego białka LIPR-10.2B z cytokininami. Zaskakujące jest, że białka te są w stanie wiązać w swojej olbrzymiej wnęce (1100–4500 Å³) nie jedną, ale wiele cząsteczek liganda, mimo że pomiary kinetyczne sugerują stechiometrię 1:1. Wydaje się, że za zdolność białek PR-10 do wiązania różnorodnych ligandów i to na rozmaite sposoby, odpowiada przede wszystkim C-końcowa helisa $\alpha 3$, która nie tylko charakteryzuje się wysoką zmiennością sekwencji, ale jest również plastyczna geometrycznie, dostosowując się do wiążanego partnera. Zaskakujące odkrycia na polu białek PR-10 i ich kompleksów kazały nam na nowo spojrzeć na wydawałoby się już dobrze opracowane zagadnienia rozpoznania molekularnego i specyficzności wiązania białko-ligand.

Słowa kluczowe: roślinne białka patogenezы, cytokiny, zeatina, rozpoznanie białko-ligand, alergeny, lubin.

Summary: Plant Pathogenesis-Related proteins of class 10 (PR-10) are structurally well characterized but their physiological role remains obscure. The discovery that Cytokinin-Specific Binding Proteins (CSBP) have PR-10 fold suggests that hydrophobic ligand binding could be the general biological role of all PR-10 proteins. This conjecture is corroborated by the crystal structures of cytokinin complexes of the yellow lupine LIPR-10.2B protein. Surprisingly, the proteins are capable of binding in their huge internal cavity (1100–4500 Å³) of multiple copies of the ligand molecule, despite the fact that kinetic measurements indicate 1:1 stoichiometry. It appears that the ability to bind multiple ligands in diverse modes is controlled by the C-terminal helix $\alpha 3$ of the PR-10 fold, which shows a high degree of structural plasticity and a low level of sequence conservation, and can in consequence adapt to the requirements of the binding partner. The discovery of the structure of PR-10 proteins and of their complexes with small-molecule ligands redefines our understanding of such phenomena as molecular recognition or binding specificity.

Key words: plant pathogenesis-related proteins, cytokinins, zeatin, protein-ligand recognition, allergens, yellow lupine.

CYTOKININY

Ponieważ wspomniane w tytule hydrofobowe ligandy będą reprezentowane w niniejszym artykule głównie przez cytokininy, naszą dyskusję rozpoczniemy krótką charakterystyką tej ważnej grupy hormonów roślinnych. Naturalne cytokininy są pochodnymi adeniny, z podstawnikiem przy egzoaminowym atomie N6. Dobrze poznana jest *trans*-zeatyna, mająca podstawnik izoprenoidowy zakończony grupą hydroksylową (ryc. 1). Cytokininy regulują podziały komórkowe, procesy rozwojowe, np. wzrost pędów czy starzenie się liści, oraz zaangażowane są w odpowiedź rośliny na stres. Ich aktywność biologiczna obserwowana jest już przy bardzo niskim stężeniu 10^{-9} M.

Zagadkową grupę stanowią syntetyczne pochodne mocznika, np. *N,N'*-difenylo-mocznik (DPU), które pomimo braku podobieństwa chemicznego wykazują identyczną z cytokininami naturalnymi aktywność biologiczną.

Związki z obu grup bardzo słabo rozpuszczają się w wodzie. Jest to wynikiem obecności w ich strukturze dużych grup hydrofobowych (łańcuch izoprenoidowy *trans*-zeatyny, czy pierścienie fenyłowe DPU). Dla chemika ta silna hydrofobowość jest jednak nieco zaskakująca, szczególnie w przypadku pochodnych adeniny, których cząsteczki mają przecież liczne centra hydrofilowe. W zeatynie jest to pięć atomów azotu i grupa hydroksylowa. Szczególnie intrygujące są atomy azotu ze względu na możliwość ich protonowania. O ile w obojętnej zeatynie jeden atom H związany jest z atomem N6, to położenie drugiego jest równie prawdopodobne w pozycji N7, jak i N9, co wiąże się z istnieniem form tautomerycznych. Sytuacja jeszcze bardziej komplikuje się w przypadku potraktowania zeatyny kwasem, gdyż protonowanie może zajść w trzech różnych pozycjach. W przeciwieństwie do zeatyny obojętnej, sole zeatyniowe bardzo dobrze rozpuszczają się w wodzie.

BIAŁKA WIĄŻĄCE CYTOKININY (CSBP)

Poszukiwanie czynników białkowych wiążących cytokininy doprowadziło do odkrycia w siewkach fasoli mung (*Vigna radiata*) niewielkich ilości ($1 \mu\text{g}$ na 5 kg materiału) białka o masie 17 kDa, które nazwano CSBP (*Cytokinin-Specific Binding Protein*) [4]. Autorzy tego doniesienia przypisali białku VrCSBP bardzo wysokie powinowactwo do cytokinin ($\sim 10^9$ – 10^{10} M⁻¹) oraz zaliczyli je do rodziny strukturalnej PR-10, mimo niskiego poziomu identyczności sekwencji (20%) z typowymi białkami PR-10.

Weryfikacja tych informacji pokazała, że VrCSBP wiąże cytokininy ze znacznie niższym powinowactwem (10^4 – 10^5 M⁻¹) [11]. Wyniki potwierdzono kilkoma metodami, mianowicie stosując bezpośrednio pomiary fluorescencji (FRET), oznaczając wypieranie znacznika fluorescencyjnego – ANS (kwas 8-anilino-1-naftaleno-sulfonowy) oraz za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowania (ITC). Co ciekawe, podobne stałe asocjacji uzyskano dla zeatyny obojętnej i dla kationu zeatyniowego oraz dla pochodnych mocznika. We wszystkich przypadkach stechiometria kompleksów VrCSBP : ligand wynosiła 1:1.

BIAŁKA ZWIĄZANE Z PATOGENEZĄ

Skazane na bytowanie stacjonarne rośliny wykształciły specyficzne sposoby obrony przed patogenami i stresem. Należy do nich ekspresja białek obronnych z ogromnej rodziny określanej skrótowo PR (ang. *Pathogenesis-Related*). Roślinne białka PR podzielone zostały na kilkanaście klas, zazwyczaj ze względu na ich funkcję. Wyjątek pod tym względem stanowią wewnątrzkomórkowe białka klasy 10 (PR-10), o których funkcji prawie nic nie wiadomo, pomimo że kodowane są przez rodziny wielogenowe (np. 10 izoform znalezionych w łubinie żółtym [6,13]) i w zależności od warunków stresowych mogą być produkowane w niektórych częściach roślin w bardzo dużych ilościach. Stosunkowo dobrze poznana jest natomiast, głównie dzięki badaniom krystalograficznym, struktura białek PR-10, określona najpierw dla alergenu z pyłku brzozy (Bet v 1 [5]), a później dla szeregu homologów z łubinu (LIPR-10.1A, LIPR-10.1B [1]; LIPR-10.2A [9]) oraz dla alergenów owoców i warzyw, np. selera (Api g 1 [12]). Strukturę białek PR-10 badano też metodami spektroskopii NMR. Charakterystycznym motywem zwoju PR-10 jest rozległy, siedmiołańcuchowy, antyrównoległy arkusz β , który jak dłoń zaciska się na długiej C-końcowej helisie $\alpha 3$. Wszystkie połączenia łańcuchów w ramach arkusza β są pętlami o charakterze spinki β , z wyjątkiem połączenia $\beta 1$ – $\beta 2$ pomiędzy łańcuchami skrajnymi, które prowadzi przez dwie krótkie helisy $\alpha 1$ i $\alpha 2$. W rdzeniu białek PR-10, pomiędzy arkuszem i helisą $\alpha 3$, znajduje się, ograniczona również helisami $\alpha 1$ i $\alpha 2$, ogromna pieczara, o objętości osiągającej 4500 \AA^3 (ryc. 2).

STRUKTURA BIAŁKA VRCSBP W KOMPLEKSIE Z TRANS-ZEATYNĄ

Stosunkowo niski stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej wymagał potwierdzenia hipotezy o przynależności białka VrCSBP do klasy PR-10 metodą doświadczalną. Samo białko VrCSBP opiera się próbom krystalizacji, łatwo natomiast krystalizuje po inkubacji z *trans*-zeatyną w stosunku molowym 1:4. Eksperyment ten rodzi jednak problem, gdyż niska rozpuszczalność *trans*-zeatyny w wodzie wymaga rozpuszczenia tego odczynnika w 0,2 M kwasie solnym. Dodawany jest więc *de facto*, przynajmniej w jakimś stopniu, kation zeatyniowy, a nadmiar HCl może dodatkowo powodować zmiany uprotonowania białka.

Pomimo że tak otrzymane kryształy rozpraszają promieniowanie rentgenowskie z rozdzielczością atomową ($1,2 \text{ \AA}$), ich struktury nie udało się rozwiązać metodą podstawienia cząsteczkowego z użyciem dostępnych modeli PR-10. Zastosowano więc podejście z nasączeniem kryształów w roztworze czynnika derywatyżującego. Był nim intensywnie zielony kation dodekabromoheksatantalowy $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$, którego składnik Ta idealnie nadaje się do pomiarów metodą dostrojonej dyfrakcji anomalnej MAD [7]. Długotrwałe (36 h) nasączenie powiodło się – kryształy nabrały głębokiej zielonej barwy (ryc. 3); było jednak prowadzone w roztworze bez dodatku *trans*-zeatyny, co groziło wymyciem liganda z ewentualnego kompleksu w kryształach.

Kryształy derywatyzowane kationem $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$ ciągle rozpraszały promienie rentgenowskie bardzo dobrze (rozdzielczość 1,8 Å), a algorytm MAD rozwiązał problem fazowy automatycznie [10]. Obraz struktury kryształu natywnego (tj. kompleksu VrCSBP/*trans*-zeatyna) okazał się zaskakujący. Po pierwsze potwierdzona została przynależność białka VrCSBP do rodziny strukturalnej PR-10, z dopasowaniem atomów C α do klasycznych przedstawicieli tej rodziny na poziomie rmsd 1,4–1,8 Å. Po drugie, w kryształach znaleziono cztery niezależne kopie białka, oznaczone A, B, C, D. Zgodnie z oczekiwaniem, białko rzeczywiście utworzyło kompleks z *trans*-zeatyną (ryc. 4). Najciekawsze było jednak to, że tylko dwa z tych kompleksów, A i D, były takie same: zawierały po dwie cząsteczki liganda w układzie „głowa do głowy” z warstwowo ułożonymi pierścieniami purynowymi w centrum kompleksu, szczelnie wypełniające pieczarę. W kompleksie B były też dwie cząsteczki *trans*-zeatyny, lecz druga z nich, bliższa wlotu do pieczary, miała odwrotną orientację, tzn. pakowała się we wnęce według reguły „ogon do głowy”. W kompleksie C zaś znalazła się tylko jedna cząsteczka liganda usytuowana głęboko we wnęce w ten sam sposób jak cząsteczka „wewnętrzna” w pozostałych przypadkach. Wydawać by się mogło, że było to wynikiem zbyt małego nadmiaru molowego liganda podczas inkubacji. Nie jest to jednak prawdą, gdyż cząsteczek zeatyny było na pewno pod dostatkiem, skoro dwie dalsze znaleziono w przestrzeniach pomiędzy łańcuchami białka.

Rozdzielczość 1,2 Å nie pozwala jeszcze na wizualizację atomów wodoru, stąd o ich położeniu w cząsteczkach ligandów można wnioskować tylko pośrednio. Wnioski, choć fragmentaryczne, są jednak bardzo ciekawe. Np. to samo oddziaływanie grupy karboksylanowej reszty Glu69 białka z atomami N6 i N7 każdej cząsteczki „wewnętrznej” zeatyny wskazuje, że jeden z ruchomych protonów tego liganda znajduje się w pozycji N7-H (ryc. 5). Inaczej jest w przypadku zeatyny „zewewnętrznej” w kompleksach A i D, której partnerem w tych oddziaływaniach jest reszta Gln67, skierowana atomem azotu amidowej grupy NH₂ w kierunku akceptora N7. Oznacza to, że pozycja N7 w tych cząsteczkach zeatyny na pewno nie jest protonowana. Być może obserwacje te są wynikiem nie tylko innej tautomerii w obrębie „wewnętrznych” i „zewewnętrznych” ligandów, ale odzwierciedlają jeszcze bardziej zasadnicze różnice, np. w stopniu protonowania. Wniosek taki musi jednak na razie pozostać hipotezą, gdyż sieć wiązań wodorowych przy pozostałych centrach azotowych ligandów nie może być zinterpretowana jednoznacznie.

Jeszcze większe zaskoczenie przyniosła struktura białka w kompleksie z $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$, którego powstawaniu towarzyszyło wymywanie liganda pierwotnego, tj. *trans*-zeatyny. Od razu trzeba wyjaśnić, że wiązanie się jonów $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$ do białka w żaden sposób nie koliduje z obecnością *trans*-zeatyny. Jony $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$ znajdujemy na powierzchni białka, z dala od wnęki, i to zwykle z bardzo niskim współczynnikiem obsadzenia. Porównanie struktury przed i po kąpieli odmywającej *trans*-zeatynę pokazuje, że wypłukaniu w około 50% uległy, jak można było przypuszczać, cząsteczki „zewewnętrzne”, gdyż znajdowały się one u wlotu do pieczary. Tak było jednak w kompleksach A, B, D, gdzie cząsteczka „zewewnętrzna” była obecna. W kompleksie C, który początkowo zawierał tylko cząsteczkę „wewnętrzną” niezabezpieczoną przez „korek zewnętrzny”, to właśnie ona uległa wymyciu

i to w 100%! Nasuwa się więc wniosek, że silniej związana jest nie zeatyna „wewnętrzna”, która wiąże się z białkiem jako pierwsza, ale zeatyna „zewewnętrzna”, dla której miejsce dokowania przygotowane jest z udziałem „wewnętrznej” poprzedniczki. Taka śmiała hipoteza, zakładająca, że związanie liganda docelowego wymaga wcześniejszej interakcji z ligandem „przygotowującym” właściwe miejsce wiązania, napotyka jednak na dwa problemy logiczne. Dlaczego przez cząsteczkę C nie został pochwycony silnym wiązaniem drugi ligand, skoro w roztworze był nadmiar zeatyny? Jak to możliwe, aby silnie wiążący się ligand „zewewnętrzny” czynił to na dwa sposoby? Wydaje się, że stoimy przed niezwykle zagadką, która zmusza nas do zrewidowania utartych poglądów na doskonale dopasowanych partnerów w oddziaływaniach białko-ligand.

KOMPLEKS BIAŁKA LLPR-10.2B Z *TRANS*-ZEATYNĄ

Zaobserwowanie wiązania *trans*-zeatyny przez mające strukturę PR-10 białko VrCSBP zachęciło do zbadania struktury podobnego kompleksu klasycznego białka PR-10. Strukturę taką dla łubinowego białka LIPR-10.2B rozwiązano z rozdzielczością 1,35 Å [3]. Choć chemicznie próbowano charakteryzować kompleksy białek PR-10 z różnymi ligandami wcześniej, to informacja strukturalna dostępna była tylko dla kompleksu alergenu pyłku brzozy z niefizjologicznym dla roślin kwasem deoksyholowym [8]. W strukturze tej, we wnętrzu białka znaleziono dwie cząsteczki kwasu deoksyholowego, z których jedna naśladowała nieco usytuowanie zeatyny „wewnętrznej” w kompleksie VrCSBP/*trans*-zeatyna, druga zaś nie miała swojego odpowiednika w tym kompleksie.

Struktura kompleksu LIPR-10.2B/*trans*-zeatyna ujawniła cztery cząsteczki liganda (ryc. 6), przy czym trzy (wraz z 25 cząsteczkami wody) zajmują wnętrze pieczary, a czwarta zaklinowana jest w świetle jej wlotu, pomiędzy dwoma cząsteczkami białka. Ze względu na dużą zawartość wody, jej cząsteczki są głównymi partnerami w wiązaniach wodorowych zeatyny w pieczarze. Niemniej liczba kontaktów z ugrupowaniami białka jest wystarczająca, aby stabilnie zakotwiczyć cząsteczki liganda i zapewnić im doskonale zdefiniowanie na mapach gęstości elektronowej. Brak jest podobieństwa w sposobie wiązania *trans*-zeatyny we wnętrzu białka VrCSBP i LIPR-10.2B. W szczególności najgłębiej położona cząsteczka „wewnętrzna” w strukturze VrCSBP leży wzdłuż helisy $\alpha 3$, podczas gdy w LIPR-10.2B układa się ona prostopadle, wzdłuż osi helis $\alpha 1$ – $\alpha 2$. Spośród pozostałych ligandów we wnętrzu LIPR-10.2B, tylko jeden nieco przypomina położenie zeatyny „zewewnętrznej” w VrCSBP, a i to dla przypadku odwróconej konformacji B.

KOMPLEKS BIAŁKA LLPR-10.2B Z *N,N'*-DIFENYLOMOCZNIKIEM

Białko LIPR-10.2B wykryto również w kompleksie ze sztuczną cytokininą DPU [2]. We wnętrzu znaleziono aż cztery cząsteczki liganda w towarzystwie ośmiu cząsteczek wody (ryc. 7). Cząsteczki DPU nie tworzą żadnych wiązań wodorowych z

białkiem, a i ich kontakty z cząsteczkami wody są minimalne, co wyjaśnia ich kiepskie zakotwiczenie w strukturze. Jednakże kształt przypisanej im, wydłużonej gęstości elektronowej nie pozostawia wątpliwości co do zawartości wnęki.

MODULACJA WNĘKI POD WPŁYWEM LIGANDÓW

Choć znamy już wiele struktur białek z grupy PR-10 oraz ich kompleksów z małocząsteczkowymi ligandami, dotąd nie mamy najbardziej klarownego przypadku, który pozwalałby porównać strukturę tego samego białka przed i po związaniu liganda o znaczeniu fizjologicznym. Jest co prawda przypadek białka Bet v 1 i jego izoforny w kompleksie z kwasem deoksyholowym, ale jest to sytuacja nienaturalna. Konkluzją porównania tych dwu struktur było, że wiązanie deoksyholanu nie wpłynęło znacząco na strukturę białka.

Ciekawszy jest przypadek dwóch białek łubinowych, LIPR-10.2A i LIPR-10.2B, których sekwencja jest niemal identyczna (96% podobieństwa, 91% identyczności, różnice dotyczą reszt nieistotnych z punktu widzenia wiązania ligandów), a które zbadano strukturalnie w formie wolnej (LIPR-10.2A) oraz w kompleksie z cytokininami z obu grup (LIPR-10.2B). Ślad C α białka LIPR-10.2B z obu kompleksów nakłada się dość dobrze, z rmsd około 0,77 Å. Jeśli natomiast dokonamy superpozycji z łańcuchem LIPR-10.2A, uzyskamy wysoką wartość rmsd powyżej 2,1 Å. Najbardziej dramatyczna różnica występuje w środkowej części helisy α 3, która złamała się w połowie (kąt 60°), zapadając się nad pustą pieczarą LIPR-10.2A. Zapadnięcie to spowodowało zmniejszenie objętości wnęki do ok. 2 000 Å³. Dla porównania, wnęka w kompleksie LIPR-10.2B z DPU ma objętość 3 600 Å³, a z *trans*-zeatyną ponad 4 500 Å³ (ryc. 8).

Wydaje się, że C-końcowa helisa α 3, która uwita jest na odcinku o bardzo rozbieżnej sekwencji aminokwasowej (szczególnie jaskrawej na tle wysokiego stopnia konserwacji innych elementów sekwencji PR-10), jest najbardziej plastycznym elementem struktury białek PR-10, który najłatwiej ulega adaptacji do potrzeb narzuconych przez zajmujący pieczarę ligand. Oprócz opisanego zgięcia w połowie, helisa α 3 ulega też obrotowi wokół i translacji wzdłuż swojej osi oraz moduluje swoje „wejście” do zagłębienia w arkuszu β przez zmiany konformacyjne labilnej pętli L9, która jest jej łącznikiem z resztą struktury.

WNIOSKI

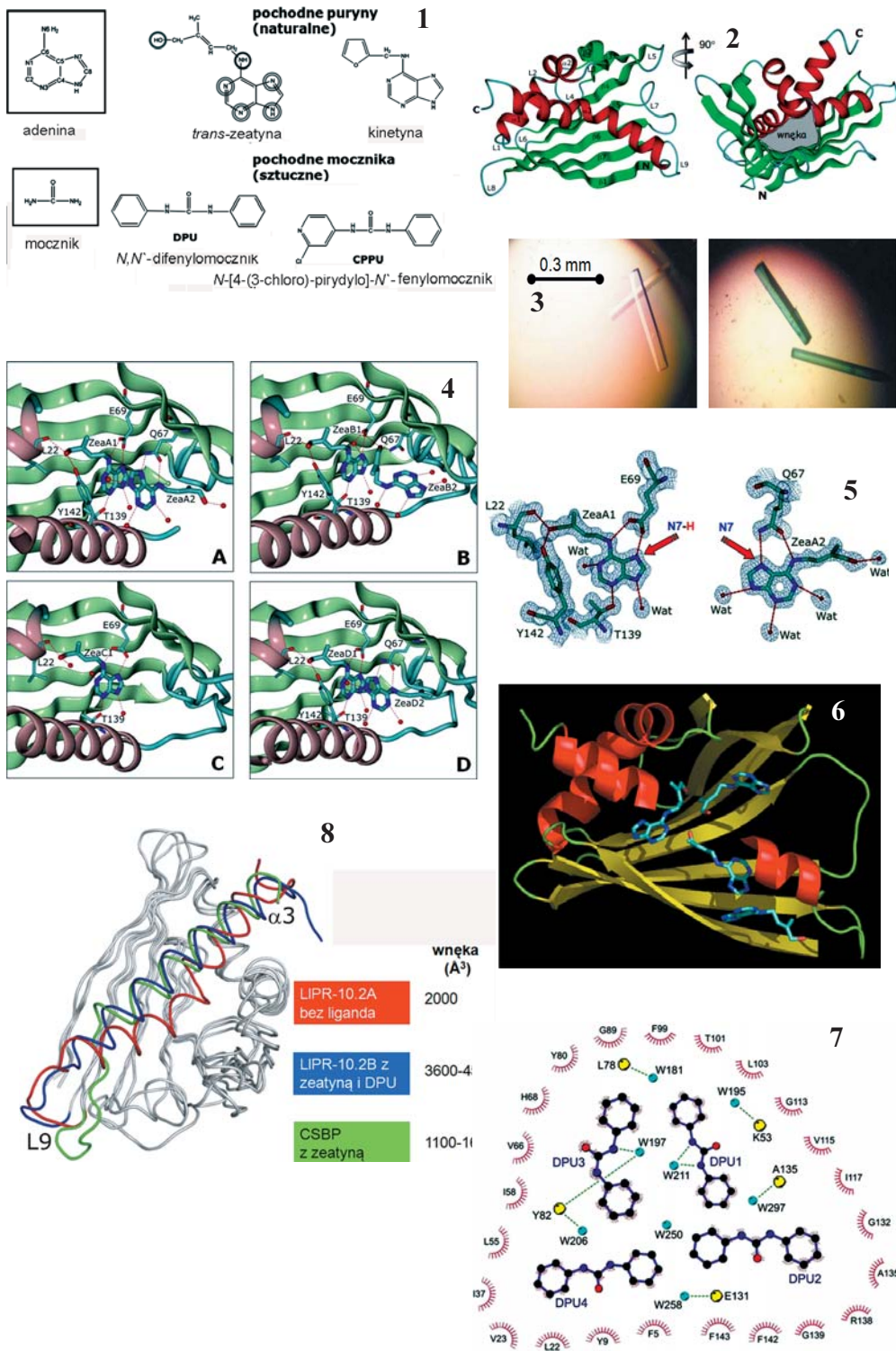
Choć nie znaleziono dotąd funkcji biologicznej białek PR-10, wydaje się, że wykryta przez nas przynależność strukturalna białek wiążących cytokininy (CSBP) do klasy PR-10 wskazuje, że wiązanie małych, hydrofobowych ligandów może być ogólną cechą rodziny PR-10. Potwierdzają to struktury kompleksów łubinowego białka PR-10 z cytokininami: tak naturalną (*trans*-zeatyna), jak i syntetyczną (*N,N'*-difenylocznik).

Ligandy wiązane są w olbrzymiej pieczarze (1 100–4 500 Å³) znajdującej się w rdzeniu hydrofobowym tych białek. Choć prowadzone różnymi metodami pomiary kinetyczne wskazują na umiarkowane powinowactwo do cytokinin (~100 μM) i stechiometrię 1:1, badania krystalograficzne kompleksów ujawniają, że białka PR-10 mogą pomieścić w swojej wnęce od 1 do 4 cząsteczek liganda, i to w różnych orientacjach, jednak niemal zawsze z dobrą stabilnością strukturalną. Co więcej, molekułom liganda we wnęce mogą towarzyszyć dodatkowo cząsteczki wody. Jest dość prawdopodobne, że przynajmniej w przypadku naturalnych cytokinin tryb wiązania będzie zależał od stopnia protonacji liganda, a być może nawet od jego formy tautomerycznej. Ten element plastyczności ligandów wzbogaca dodatkowo ich naturalna różnorodność konformacyjna. To, w połączeniu z plastycznością samych białek PR-10, może kreować niesamowite warunki do wzajemnej adaptacji obu partnerów i może być zasadą umożliwiającą białkom PR-10 wiązanie rozmaitych ligandów i tym samym pełnienie roli rezerwuaru cząsteczek hydrofobowych w wodnym środowisku komórki. Plastyczność struktury PR-10 uwarunkowana jest przede wszystkim C-końcową helisą α3, która może „wybierać” ligandy nie tylko dzięki swojej zmienności sekwencyjnej (pamiętajmy, że białka PR-10 kodowane są przez liczne rodziny wielogenowe), ale również dzięki łatwości, z jaką ulega ona rozmaitym deformacjom geometrycznym (zgięcie, przesuw, obrót, inny punkt „natarcia”). Te modulacje struktury α3 przekładają się na modulacje wnęki, przede wszystkim na jej objętość.

W konkluzji stwierdzamy, że studiując strukturę białek PR-10 i ich kompleksów prawdopodobnie uchylamy rąbka tajemnicy, która będzie kazała nam dostrzec głębsze warstwy znaczeniowe terminów „rozpoznanie molekularne” czy „dopasowanie białko-ligand”. Być może istotą specyficzności rozpoznania jest zdolność do stymulowanej przez partnera adaptacji? Być może wiązanie kilku cząsteczek liganda ma na celu kooperatywne przygotowanie najlepszego miejsca dokowania dla ostatniego, a nie pierwszego przybysza? Być może prawdziwe fizjologiczne ligandy białek PR-10 czekają jeszcze na odkrycie?

LITERATURA

- [1] BIESIADKA J, BUJACZ G, SIKORSKI MM, JASKOLSKI M. Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine. *J Mol Biol* 2002; **319**: 1223–1234.
- [2] FERNANDES H, BUJACZ A, BUJACZ G, JELEN F, JASINSKI M, KACHLICKI P, OTLEWSKI J, SIKORSKI MM, JASKOLSKI M. Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein. *FEBS J* 2009; **276**: 1596–1609.
- [3] FERNANDES H, PASTERNAK O, BUJACZ G, BUJACZ A, SIKORSKI MM, JASKOLSKI M. *L. luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. *J Mol Biol* 2008; **378**: 1040–1051.
- [4] FUJIMOTO Y, NAGATA R, FUKASAWA H, YANO K, CZUMA M, IIDAA, SUGIMOTO S, SHUDO K. Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur J Biochem* 1998; **258**: 794–802.
- [5] GAJHEDE M, OSMARK P, POULSEN FM, IPSEN H, LARSEN JN, JOOST VAN NEERVEN RJ, SCHOU C, LOWENSTEIN H, SPANGFORD MD. X-ray and NMR structure of Bet v1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* 1996; **3**: 1040–1045.



RYCINA 1. Wzory strukturalne niektórych cytokinin. Kółkami obwiedziono grupy hydrofilowe zeatyny. Podwójne kółka wskazują niepewność położenia protonów (tautomeria, protonowanie)
 FIGURE 1. Structural formulae of selected cytokinins. Circles are used to indicated hydrophilic groups of zeatin. Double circles indicate uncertain proton location (tautomerism, protonation)

RYCINA 2. Ukazana w dwóch rzutach struktura łubinowego białka LIPR-10.2A określona metodą krystalograficzną [9], z uwzględnieniem numeracji elementów struktury drugorzędowej. Uwagę zwraca ogromna pieczara we wnętrzu białka
 FIGURE 2. Crystallographic model of yellow lupine LIPR-10.2A protein [9], shown in two views. Note the huge cavity inside the protein. The labels annotate secondary structure elements of the PR-10 fold

RYCINA 3. Monokryształy kompleksu VrCSBP/*trans*-zeatyna przed (lewa) i po (prawa) nasączeniu w roztworze $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})\text{Br}_2$ [10]
 FIGURE 3. Single crystals of VrCSBP/*trans*-zeatin complex before (left) and after (right) soaking in $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})\text{Br}_2$ solution [10]

RYCINA 4. *trans*-Zeatyna we wnęce czterech cząsteczek białka A, B, C, D w kompleksie z VrCSBP [11].
 FIGURE 4. *trans*-Zeatin in the cavity of VrCSBP molecules A, B, C, D, as revealed by the crystal structure of the complex [11].

RYCINA 5. „Wewnętrzna” (lewa) i „zewnątrzna” (prawa) cząsteczka *trans*-zeatyny w otoczeniu partnerów tworzących z nimi wiązania wodorowe w strukturze kompleksu VrCSBP/*trans*-zeatyna [11]. Cząsteczki pokazane są na tle mapy gęstości elektronowej 2Fo-Fc wyrysowanej przy konturze 1.2σ. Strzałki wskazują pozycję N7 pierścienia puryny, która musi być protonowana w cząsteczce „wewnętrznej” i deprotonowana w cząsteczce „zewnątrznej”.

FIGURE 5. „Inner” (left) and „outer” (right) *trans*-zeatin molecules surrounded by their hydrogen-bonding partners in the crystal structure of VrCSBP/*trans*-zeatin complex [11]. The molecules are shown in their 2Fo-Fc electron density map contoured at the 1.2σ level. The arrows indicate the N7 atom of the purine moiety, which must be protonated in the „inner” molecule and deprotonated in the „outer” molecule

RYCINA 6. Cztery cząsteczki *trans*-zeatyny w kompleksie z białkiem LIPR-10.2B [3]. Dla uwidocznienia zawartości pieczary, środkowa część helisy α 3 została usunięta. Trzy cząsteczki zeatyny (wraz z pominiętymi 25 cząsteczkami wody) wypełniają wnętrze pieczary. Czwarty ligand (prawo dół) leży pomiędzy dwoma cząsteczkami białka w kryształce

FIGURE 6. Four *trans*-zeatin molecules in the complex with LIPR-10.2B [3]. The central part of helix α3 has been cut away to emphasize the contents of the cavity. Three of the zeatin molecules, plus 25 water molecules (not shown), occupy the volume of the cavity. The fourth ligand (lower right) is located at the interface between two protein molecules in the crystal lattice

RYCINA 7. Cztery cząsteczki *N,N'*-difenyłmoczniaka (DPU1-4) oraz osiem cząsteczek wody (niebieskie kulki) we wnęce białka LIPR-10.2B [2]

FIGURE 7. Four molecules of *N,N'*-diphenylurea (DPU1-4) plus eight water molecules (blue spheres) found in the cavity of the LIPR-10.2B protein [2]

RYCINA 8. Nałożenie śladów łańcucha głównego białek LIPR-10.2A (forma wolna, kolor czerwony), LIPR-10.2B (kompleksy z *trans*-zeatyną i DPU, kolor niebieski) i VrCSBP (kompleks z *trans*-zeatyną, kolor zielony). Koloru użyto do uwypuklenia różnic w konformacji C-terminalnej helisy α3 i podprowadzającej ją pętli L9. Obok podano wielkość wnęki w Å³. Przedstawione struktury są zdeponowane w Banku Struktur Białkowych (Protein Data Bank, PDB) z kodami 1XDF (LIPR-10.2A), 2QIM (LIPR-10.2B/*trans*-zeatyna), 3E85 (LIPR-10.2B/DPU) i 2FLH (VrCSBP/*trans*-zeatyna)

FIGURE 8. Superposition of the Cα traces of several PR-10 proteins and their cytokinin complexes: LIPR-10.2A (ligand-free form, red), LIPR-10.2B (*trans*-zeatin and DPU complexes, blue), VrCSBP (*trans*-zeatin complex, green). The color has been used to emphasize the variable conformation of helix α3 and of loop L9, which connects it with the rest of the protein molecule. The cavity volume is expressed in Å³. The structures have been deposited in the Protein Data Bank (PDB) with the following accession codes: 1XDF (LIPR 10.2A), 2QIM (LIPR-10.2B/*trans*-zeatin), 3E85 (LIPR-10.2B/DPU), and 2FLH (VrCSBP/*trans*-zeatin)

- [6] HANDSCHUH L, FEMIAK I, KASPERSKA M, FIGLEROWICZ M, SIKORSKI MM. Structural and functional characteristics of two novel members of pathogenesis-related multigene family of class 10 from yellow lupine. *Acta Biochim Pol* 2007; **54**: 783–796.
- [7] HENDRICKSON WA. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* 1991; **254**: 51–58.
- [8] MARKOVIC-HOUSLEY Z, DEGANI M, LAMBAD, VON ROEPENACK-LAHAYE E, CLEMENS S, SUSANI M, FERREIRA F, SCHEINER O, BREITENEDER H. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 2003; **325**: 123–133.
- [9] PASTERNAK O, BIESIADKA J, DOLOT R, HANDSCHUHL, BUJACZ G, SIKORSKI MM, JASKOLSKI M. Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to a novel subclass. *Acta Cryst* 2005; **D61**: 99–107.
- [10] PASTERNAK O, BUJACZA, BIESIADKAA, BUJACZ G, SIKORSKI M, JASKOLSKI M. MAD phasing using the $(\text{Ta}_6\text{Br}_{12})^{2+}$ cluster: a retrospective study. *Acta Cryst* 2008; **D64**: 595–606.
- [11] PASTERNAK O, BUJACZ GD, FUJIMOTO Y, HASHIMOTO Y, JELEN F, OTLEWSKI J, SIKORSKI MM, JASKOLSKI M. Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *Plant Cell* 2006; **18**: 2622–2634.
- [12] SCHIRMER T, HOFFMANN-SOMMERGRUBE K, SUSANI M, BREITENEDER H, MARKOVIC-HOUSLEY Z. Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity. *J Mol Biol* 2005; **351**: 1101–1109.
- [13] SIKORSKI MM, BIESIADKA J, KASPERSKAAE, KOPCINSKA J, LOTOCKA B, GOLINOWSKI W, LEGOCKI AB. Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Sci* 1999; **149**: 125–137.

Prof. dr hab. Mariusz Jaskólski

Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

email: mariuszj@amu.edu.pl