

Структурное исследование апо- и холо-СорС из *Thiolkalivibrio paradoxus*

Соловьева А.^{1*}, Варфоломеева Л.¹, Куликова О.¹, Тихонова Т.¹, Попов В.^{1, 2}

¹ ФГУ Федеральный исследовательский центр «Основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

* nastya.soloveva1@yandex.ru

Ключевые слова: медь; медь-связывающий белок; СорС, металлошапероны; рентгеноструктурный анализ

Мотивация и цель: Семейство белков СорС (copper resistant protein) представляет собой периплазматические медь-связывающие белки, которые играют важную роль в гомеостазе меди. Изначально СорС рассматривались как один из компонентов системы устойчивости к ионам меди СорABCDERS. Но позже было обнаружено, что часто ген СорС присутствует в генных кластерах только с геном белка внутренней мембраны СорD, а также с генами медных оксидаз [1]. Предполагается, что СорС в данном случае выполняет функцию металлошаперона, участвующего во встраивании ионов меди в активный центр медных ферментов. В геноме бактерии *Thiolkalivibrio paradoxus* гены СорCD входят в генный кластер, отвечающий за биосинтез медь-содержащего белка тиоцианатдегидрогеназы (ТсДН) [2]. Целью настоящей работы являлось структурное исследование медь-связывающего белка СорС из *Tv. paradoxus* – потенциального металлошаперона ТсДН, а также анализ структурных отличий апо- и холоформ СорС.

Методы и алгоритмы: В работе были использованы методы генной инженерии для получения рекомбинантной апо-формы СорС, хроматографические методы для выделения и очистки СорС и биохимические методы для его характеристики. Холоформу получали насыщением апоформы СорС ионами Cu^{2+} с последующим удалением избытка ионов меди диализом. Кристаллы СорС получали методом диффузии паров, структуры СорС решены методом рентгеноструктурного анализа.

Результаты: Получены и уточнены структуры апо- и холо-СорС с разрешением 1.70 и 1.80 Å. В обеих структурах СорС находится в форме димера, что отличает СорС из *Tv. paradoxus* от ранее описанных гомологов из других бактерий, которые находятся в мономерном состоянии. В образовании димера участвуют С-концы мономеров («хвост к хвосту»), на N-конце каждого мономера формируется характерный для СорС медь-связывающий мотив, который в литературе называется «гистидиновая скрепка». Также в структуре СорС из *Tv. paradoxus* имеется вставка из 28 аминокислот, которая отсутствует у гомологичных СорС [1]. Данная вставка формирует петлю и α -спираль, и ее функция, возможно, заключается в формировании сайта для взаимодействия с белками-партнерами. Это подтверждает полученная ранее структура комплекса СорС-FCC, где флавиновая субъединица флавоцитохромсульфиддегидрогеназы (FCC) взаимодействует с данной α -спиралью [3].

В структуре холоформы *Tv. paradoxus* CopC сайт, на котором связан ион Cu^{2+} , имеет строение квадратной пирамиды и формируется N-концевым гистидином и двумя консервативными остатками – Asp110 и His112. Такое же строение имеют медь-связывающие сайты CopC из других бактерий [1].

В структуре апоформы в области «гистидиновой скрепки» также присутствовал ион меди с заселенностью 0.3. Остатки Asp110 и His112 не меняют своего положения в сравнении с холоформой, сохраняя сеть образуемых водородных связей, тогда как N-концевой гистидин либо не виден, либо его аминогруппа отвернута и не принимает участие в координации меди. В ходе всей полипептидной цепи также наблюдается ряд различий между апо- и холо-CopC: петля 80–83, которая взаимодействует с участком, содержащим консервативный Glu28 из вторичной координационной сферы иона меди, имеет разные положения.

Выводы: CopC из *Tv. paradoxus* обладает рядом структурных отличий от ранее описанных гомологов: во-первых, является димером, во-вторых, имеет дополнительную вставку из 28 аминокислот, которая участвует в белок-белковых взаимодействиях. Помимо этого, были найдены и описаны различия в структуре CopC в присутствии/отсутствии ионов меди: во-первых, координирующий His1 либо не описывается электронной плотностью, либо развернут от меди, во-вторых, отличается положение петли 80–83.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-74-30004.

Structural study of apo- and holo-CopC from *Thiolkalivibrio paradoxus*

Solovieva A.^{1*}, Varfolomeeva L.¹, Kulikova O.¹, Tikhonova T.¹, Popov V.^{1,2}

¹ Research Centre of Biotechnology, RAS, Moscow, Russia

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* nastya.soloveva1@yandex.ru

Key words: copper; copper-binding protein; CopC; metallochaperones; X-ray diffraction analysis

Motivation and Aim: The CopC (copper resistant proteins) family is periplasmic, copper-binding proteins that play an important role in copper homeostasis. CopC was initially considered as one of the components of the copper resistance system – CopABCDERS. But later it was found that CopC is often present in gene clusters only with the inner membrane protein CopD, and also genes of cuproenzymes [1]. It is assumed that CopC in this case functions as a metallochaperone, which binds copper ions and then incorporates in the active center of cuproenzymes. In the genome of the bacterium *Thiolkalivibrio paradoxus*, the CopCD genes are included in the gene cluster responsible for the biosynthesis of the copper-containing thiocyanate dehydrogenase (TcDH) [2]. In this work, the goal was to obtain structure of CopC – a potential metallochaperone of TcDH, and to identify structural changes in apo- and holo-forms.

Methods and Algorithms: In the work we used genetic engineering methods to obtain the recombinant apo-CopC, chromatographic purification methods for isolation and purification of CopC, and biochemical methods for its characterization. The holo-CopC

was obtained by saturating the apo-CopC with Cu²⁺, followed by removal of excess copper ions by dialysis. CopC crystals were obtained by vapor diffusion; the CopC structures were solved by X-ray diffraction.

Results: The structures of apo- and holo-CopC were obtained and solved with resolution 1.70 and 1.80 Å. In both structures, CopC was a dimer that is in contrast to the structures of previously described monomeric homologs. The C-termini of the monomers (“tail to tail”) form a dimer interface: and the N-terminus of each monomer forms a copper-binding motif, which is called the histidine brace in the literature. Also CopC from *Tv. paradoxus* has a 28 amino acid insertion that is not present in other homologous CopCs [1]. This insertion forms a loop and α -helix and acts as a platform for interaction with partners-proteins. This is confirmed by the previously obtained structure of the CopC-FCC complex, where the flavin subunit of flavocytochrome sulfide dehydrogenase (FCC) interacts with this α -helix [3].

In the structure of the holo-CopC from *Tv. paradoxus* copper-binding site has the structure of a square pyramid and is formed by the N-terminal histidine and two conservative residues – Asp110 and His112. The copper-binding sites of CopC from other bacteria have the same structure [1].

In the structure of the apo-CopC, in the histidine brace there was also a copper ion with an occupancy of 0.3. Residues Asp110 and His112 do not change their position in comparison with the holo-form, maintaining the network of formed hydrogen bonds. While the N-terminal histidine is either not visible, or its amino group is turned away and does not participate in the coordination of copper. There is also a difference in the polypeptide chain position between apo- and holo-CopC: loop 80–83, which interacts with the region containing the conserved Glu 28 from the secondary copper coordination sphere, has different locations.

Conclusion: CopC from *Tv. paradoxus* has a number of structural differences from previously described homologs: firstly, it is a dimer, and secondly, it has an additional insert of 28 amino acids, which is involved in protein-protein interactions. In addition, differences in the structure in the presence/absence of copper were found and described: firstly, the coordinating His1 is either not described by the electron density or turns away from copper, and secondly, the position of loop 80–83 is different.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-74-30004.

Список литературы/References

1. Lawton T.J., Kenney G.E., Hurley J.D., Rosenzweig A.C., The CopC Family: Structural and Bioinformatic Insights into a Diverse Group of Periplasmic Copper Binding Proteins. *Biochemistry*. 2016;55(15):2278-2290. doi 10.1021/acs.biochem.6b00175
2. Berben T., Overmars L., Sorokin D.Y., Muyzer G., Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing Thioalkalivibrio species isolated from soda lakes. *Front Microbiol*. 2017;8:254. doi 10.3389/fmicb.2017.00254
3. Osipov E.M., Lilina A.V., Tsallagov S.I., Safonova T.N., Sorokin D.Y., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structure of the flavocytochrome c sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium Thioalkalivibrio paradoxus ARh 1. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol*. 2018;74(Pt. 7):632-642. doi 10.1107/S2059798318005648