



Doctoral Thesis

## **Structural basis and mechanism for metallochaperone-assisted assembly of the CuA center in cytochrome oxidase from *Bradyrhizobium diazoefficiens***

**Author(s):**

Canonica, Fabia

**Publication Date:**

2019

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000361116> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 26000

STRUCTURAL BASIS AND MECHANISM FOR  
METALLOCHAPERONE-ASSISTED ASSEMBLY OF THE  $CU_A$   
CENTER IN CYTOCHROME OXIDASE FROM  
*BRADYRHIZOBIUM DIAZOEFFICIENS*

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

FABIA CANONICA

Msc. Biology, ETH Zürich  
born on May 30<sup>th</sup>, 1988  
citizen of Capriasca (Ticino)

accepted on the recommendation of:

Prof. Rudolf Glockshuber  
Prof. Hauke Hennecke  
Prof. Hans-Martin Fischer  
Prof. Eilika Weber-Ban

2019

## SUMMARY

Aerobic respiration is vital for all oxygen-breathing organisms ranging from unicellular bacteria to multicellular organisms like plants, animals and humans. It is the process by which biological fuels are oxidized in the presence of molecular oxygen to produce large amounts of energy, represented by the bulk production of ATP. The  $aa_3$ -type cytochrome oxidase (COX) catalyzes the ultimate step in the respiratory electron transport chain coupling the reduction of molecular oxygen to water with proton pumping, to generate an electrochemical gradient over the cytoplasmic or inner mitochondrial membrane. This gradient is used by the ATP-synthase to generate ATP, the universal energy carrier of cells. COX is a hetero-multimeric membrane complex in the cytoplasmic membrane of bacteria or the inner mitochondrial membrane of eukaryotes. The subunit composition of COX varies between bacteria, archaea and eukaryotes, but three core subunits are highly conserved among all organisms. Assembly of COX is particularly complicated and often requires the help of chaperones to efficiently combine all subunits and to incorporate their metal co-factors.

In several studies ranging from bacteria over yeast to human cells, multiple copper chaperones have been identified and proven to play a role in the formation of the two copper sites ( $Cu_A$  and  $Cu_B$ ) in COX, and numerous assembly pathways have been proposed so far. However, a detailed mechanism underlying the biogenesis of the structurally unique, binuclear  $Cu^{1.5+} \cdot Cu^{1.5+}$  redox center ( $Cu_A$ ) on subunit II (CoxB) of cytochrome oxidases has not yet been substantiated. For this thesis, I reconstituted the CxB- $Cu_A$  center *in vitro* from *apo*-CoxB and the *holo*-forms of the copper transfer chaperones Scol and PcuC from *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Bradyrhizobium diazoefficiens* belongs to the class of  $\alpha$ -proteobacteria and is one of the closest existing relatives of mitochondrial

ancestors. Hence, it is a well-established model organism for the study of the assembly and function of COX for bacteria and mitochondria.

Using a multidisciplinary approach, with the combination of analytical size exclusion chromatography, stopped-flow kinetics, mass spectrometry, NMR spectroscopy, EPR spectroscopy and X-ray crystallography, I demonstrated that a previously unknown, highly stable  $\text{Scol}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{CoxB}$  complex is rapidly formed as the first intermediate in the pathway. Moreover, I was able to show that the copper chaperone PcuC possesses two copper binding sites, one each for  $\text{Cu}^{1+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , contrasting all present PcuC models assuming only a single Cu binding site. The  $\text{Cu}^{1+}$  ion is bound with high affinity to the core domain, whereas the  $\text{Cu}^{2+}$  ion is bound to a C-terminal flexible extension of the protein. Only  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  can release  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$  from the  $\text{Scol}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{CoxB}$  complex. The  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}_A$  center is then formed quantitatively by the transfer of  $\text{Cu}^{1+}$  from a second equivalent of  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$ . Data obtained by NMR-spectroscopy suggests that a single electron is exchanged between the two copper ions in  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$ , prior to the  $\text{Cu}^{1+}$  transfer to  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$ . Furthermore, the X-ray structure of the  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}_A$  center at 1.3 Å resolution, the highest resolution obtained so far for a  $\text{Cu}_A$  center, revealed the exact coordination geometry of  $\text{Cu}_A$  with unprecedented accuracy. The itemized metalation pathway in this study is consistent with all available *in vivo* data and identifies the sources of the Cu ions required for  $\text{Cu}_A$  center formation and the order of their incorporation in CoxB.

Together, the results presented in this thesis advance our mechanistic understanding of the  $\text{Cu}_A$  center biogenesis in cytochrome c oxidase and provide new fundamental insights into the interplay between the two copper chaperones Scol and PcuC with CoxB. Furthermore, the interdisciplinary approach used in this study represents a good foundation for further comprehensive studies in other organisms.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die aerobe Zellatmung ist für alle Organismen, welche Sauerstoff zum Leben brauchen von entscheidender Bedeutung, von einzelligen Bakterien bis hin zu vielzelligen Organismen wie Pflanzen, Tieren und Menschen. Die aerobe Zellatmung ist der Prozess, bei dem biologische Brennstoffe in Gegenwart von molekularem Sauerstoff oxidiert werden, um große Mengen an Energie in Form von ATP zu erzeugen. Die  $aa_3$ -typ Cytochromoxidase (COX) katalysiert dabei den letzten Schritt in der Elektronentransportkette, die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Gleichzeitig werden dabei Protonen über die zytoplasmatische Membran oder die innere Mitochondrienmembran gepumpt, wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht. Dieser Gradient wird von der ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP verwendet, dem universellen zellulären Energieträger. COX ist ein heteromultimerer Membrankomplex lokalisiert in der zytoplasmatischen Membran von Bakterien oder der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten. Die Zusammensetzung der COX-Untereinheiten variiert zwischen Bakterien, Archaeen und Eukaryonten, jedoch sind die drei Kernuntereinheiten in allen Organismen stark konserviert. Die Bildung von COX ist besonders kompliziert und erfordert häufig die Hilfe von Chaperonen, um die Untereinheiten effizient zusammenzubauen und ihre Metall-Co-Faktoren einzubringen.

In mehreren Studien, die von Bakterien über Hefe bis hin zu menschlichen Zellen reichen, wurde festgestellt, dass mehrere Kupfer-Chaperone beim Aufbau der beiden Kupfer-Zentren ( $Cu_A$  und  $Cu_B$ ) in COX eine Rolle spielen. Bislang wurden zahlreiche Mechanismen für die Bildung dieser Kupfer-Zentren vorgeschlagen, jedoch konnte ein detaillierter Mechanismus, welchem die  $Cu_A$ -Zentrum-Biogenese in der Untereinheit II (CoxB) des Enzymes zugrunde liegt, noch nicht belegt werden. Das binukleare  $Cu_A$ -Zentrum ist strukturell deshalb einzigartig, weil

es zwei Kupferatome mit delokalisierten Elektronen gebunden hat ( $\text{Cu}^{1.5+}\cdot\text{Cu}^{1.5+}$ ). In dieser Arbeit habe ich das  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}_A$ -Zentrum *in vitro* aus *apo-CoxB* und den Holo-Formen der Kupfer-Transfer-Chaperone *ScoI* und *PcuC* aus dem Bakterium *Bradyrhizobium diazoefficiens* rekonstituiert. *Bradyrhizobium diazoefficiens* gehört zur Klasse der  $\alpha$ -Proteobakterien und ist damit einer der engsten Verwandten von mitochondrialen Vorfahren. Aus diesem Grund eignet es sich als Modellorganismus zur Untersuchung des Aufbaus und der Funktion bakterieller und mitochondrialer Metalloenzyme wie COX.

Mit einem multidisziplinären Ansatz, bei dem analytische Größenausschluss-Chromatographie, Stop-Flow-Kinetik, Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie, EPR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie kombiniert wurden, konnte gezeigt werden, dass in einem ersten Schritt der  $\text{Cu}_A$ -Zentrum Synthese ein zuvor unbekannter, hochstabiler  $\text{ScoI}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{CoxB}$  Komplex gebildet wird. Zudem konnte ich zeigen, dass das Kupfer-Chaperon *PcuC* zwei Kupferbindungsstellen besitzt, je eine für  $\text{Cu}^{1+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ , im Gegensatz zu allen bisherigen *PcuC*-Modellen, welche nur eine einzige Cu-Bindungsstelle vorhersagen.  $\text{Cu}^{1+}$  ist in *PcuC* mit hoher Affinität an die Kerndomäne gebunden, während das  $\text{Cu}^{2+}$  durch eine C-terminale flexible Verlängerung des Proteins gebunden ist. Nur  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  kann  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$  aus dem zuvor erwähnten  $\text{ScoI}\cdot\text{Cu}^{2+}\cdot\text{CoxB}$ -Komplex freisetzen. Das  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}_A$ -Zentrum wird nach der Freisetzung quantitativ durch die Übertragung von  $\text{Cu}^{1+}$  aus einem zweiten Äquivalent von  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$  gebildet. Die durch NMR-Spektroskopie erhaltenen Daten legen nahe, dass ein einzelnes Elektron zwischen den beiden Kupferzentren in  $\text{PcuC}\cdot\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$  vor dem  $\text{Cu}^{1+}$  Transfer zu  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}^{2+}$  ausgetauscht wird. Darüber hinaus zeigte unsere Röntgenstruktur des  $\text{CoxB}\cdot\text{Cu}_A$  Zentrums mit einer Auflösung von 1.3 Å, die bisher höchste Auflösung eines  $\text{Cu}_A$  Zentrums, die exakte Koordinationsgeometrie von  $\text{Cu}_A$  mit bisher unerreichter Genauigkeit. Der hier beobachtete Mechanismus zur  $\text{Cu}_A$ -Zentrum Biogenese stimmt mit allen verfügbaren *in vivo* Daten überein und identifiziert den Ursprung

der Cu-Ionen, die zur Bildung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums erforderlich sind, sowie die Reihenfolge ihrer Inkorporation in CoxB.

Zusammengenommen fördern die Ergebnisse dieser Arbeit unser mechanistisches Verständnis der Cu<sub>A</sub>-Zentrum-Biogenese in Cytochrom c Oxidasen und liefern neue grundlegende Einblicke in das Zusammenspiel der beiden Kupfer-Chaperone ScoI und PcuC mit CoxB. Darüber hinaus bilden die in dieser Studie verwendeten interdisziplinären Ansätze eine gute Grundlage für weitere umfassende Studien in anderen Organismen.