

## 绿脓杆菌特有的 Tsi2 三维结构 ——一种全新卷曲螺旋构象的类抗毒素蛋白\*

王 维<sup>1, 2)</sup> 丁璟璋<sup>1)\*\*</sup> 王大成<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; <sup>2)</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** 绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)利用六型分泌系统(T6SS)向其他竞争性细菌分泌毒素效应分子 Tse2, 这是一种新发现的绿脓杆菌获得生存优势的分子机制. 为了避免同类间的误杀, 绿脓杆菌合成一种特异结合 Tse2 的抑制蛋白 Tsi2 来保护自己. 序列分析显示, Tsi2 是绿脓杆菌特有的一种新型类抗毒素蛋白. 我们利用 SAD 方法成功地解析了 Tsi2 1.8Å 分辨率的晶体结构. Tsi2 的三维结构采用一种规则的卷曲螺旋的结构特征, 这是抗毒素分子中的一种全新的折叠方式, 不同于经典的抗毒素分子在没有结合毒素分子状态下采用无规则构象的结构特征; 二聚体是 Tsi2 的功能单位, 二聚体内两个 Tsi2 单体通过广阔的疏水相互作用紧密结合, 形成“夹子”状独特的二聚体组装方式; 位于二聚体界面上的两个凹槽分别结合对称分子的两段螺旋, 提供了 Tsi2 与 Tse2 结合可能的分子部位. 该研究工作结果对于认识 Tsi2 抗毒素蛋白的分子本质, 揭示其发挥抗毒素活性的结构基础, 并为进一步开展 Tse2-Tsi2 复合物的结构与功能研究奠定了坚实的基础.

**关键词** 绿脓杆菌, 六型分泌系统, Tsi2-Tse2, 抗毒素, 卷曲螺旋

**学科分类号** Q5

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00126

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是医院感染的一种常见的条件致病菌, 能引起心内膜炎、眼角膜炎、肺部囊肿纤维化、败血症等病症, 其极强抗药性使其成为临床上研究细菌抗生素抗性重要的模式生物<sup>[1-2]</sup>. 一直以来, 这种强耐药性被认为是绿脓杆菌能够广泛存活并获得生存优势的重要原因, 但随着近年来绿脓杆菌六型分泌系统(T6SS)的深入研究, 为其获得生存优势提供了一种新的解释: 与霍乱弧菌 T6SS 靶向攻击宿主细胞不同<sup>[3]</sup>, 绿脓杆菌 T6SS 的攻击对象是与其接触(cell-contact-dependent)的其他细菌, 通过向靶细胞分泌效应分子引起竞争性细菌死亡从而获得生存优势<sup>[4-5]</sup>. Mougous 研究组鉴定出 3 种绿脓杆菌 T6SS 效应分子: Tse1~3 (Type six exported 1~3). Tse1 和 Tse3 被验证为 DL- 内肽酶 ( $\gamma$ -D-glutamyl-L-meso-diaminopimelic acidendopeptidases)和溶菌酶(lysozymes), 二者被 T6SS 分泌至靶细胞周质空间裂解细胞壁引起靶细胞死亡<sup>[6]</sup>; Tse2 被鉴定为一种新颖的细菌毒素分子, 被分泌至靶细胞胞质中通过某种未知机制杀死靶细胞<sup>[5]</sup>. 绿脓杆菌 T6SS 靶向并不具有特异性, 绿脓杆菌也可以向同类分泌 T6SS 效应分子. 为了

避免误杀, 绿脓杆菌同时合成专一的 Tse 抑制蛋白: Tsi1~3 (Tse-specific immunity protein 1~3), 并将其定位于相应的细胞部位, 通过蛋白质间直接作用(direct interaction)抑制 Tse 毒性<sup>[5-6]</sup>.

Tse 和 Tsi 在基因水平上成对存在, 作为操纵子(operon)被转录翻译, 通过蛋白质间的直接相互作用形成复合物<sup>[5-6]</sup>. 这种模式极像细菌中广泛存在的毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TA 系统)<sup>[7-8]</sup>: 毒素-抗毒素作为操纵子一起被转录翻译, 当细菌感受外界生存压力, 抗毒素被 Lon 蛋白酶或蛋白酶体降解后释放毒素. 毒素分子主要参与基因复制和蛋白质翻译的调节而引起细胞凋亡或生长停滞, 例如, VapC, HigA, MazF, YoeB 为不依赖核糖体的核糖核酸酶(ribonuclease)<sup>[9-12]</sup>, RelE

\* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CB910304, 2011CB911103), 国家自然科学基金(31100535)和中国科学院知识创新工程(KSCX2-EW-J-3)资助项目.

\*\* 通讯联系人. Tel: 010-64888547

丁璟璋. E-mail: jdjing@moon.ibp.ac.cn

王大成. E-mail: dcwang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-03-14, 接受日期: 2012-05-15

为依赖核糖体的核糖核酸酶<sup>[13]</sup>, 这些毒素分子主要参与 mRNA 和 tRNA 的降解调控蛋白质翻译; CcdB 和 ParE 主要与 DNA 解旋酶(DNA gyrase)相互作用而抑制 DNA 复制<sup>[14-15]</sup>. 对毒素分子结构与功能的研究为抗菌药设计提供一种与抗生素不同的新思路<sup>[16]</sup>. 抗毒素分子能够专一识别毒素分子并抑制其活性, 而且其 DNA 结合结构域(DNA-binding domain)能够结合自身启动子起到自调节作用. 以前的研究表明, 抗毒素分子在自由状态下以无规则构象(disorder conformation)存在, 只有与毒素分子结合后才组装出规则的三维结构, 这种模式称为“disorder to order”模型. 但是, 近年来相继有文献报道, 抗毒素分子可以形成独立规则的三维结构, 例如, YefM、MqsA 等<sup>[17-18]</sup>, 这对“disorder to order”模型提出挑战: 抗毒素并非都是无规则构象, 抗毒素分子可以作为一个规则结构参与毒素分子的相互作用.

本课题的研究对象为 Tse2-Tsi2 这一组绿脓杆菌六型分泌系统的类 TA 蛋白. 它与经典 TA 蛋白的主要区别在于: a. Tse2 是外分泌毒素分子, 而非内源性的毒素分子, 序列比对显示 Tse2 与已知毒素分子无同源性; b. 对 Tsi2 序列分析表明, 其并不具备 DNA 结合结构域, 这与经典抗毒素具有结合 TA 操作子启动子的自抑制(auto-repressor)功能明显不同. 这些基本特征可能正是 Tse2-Tsi2 作为绿脓杆菌攻击与自我防护机制的分子基础, 揭示 Tse2-Tsi2 发挥生理功能的三维结构基础, 为研究病原菌生存竞争的分子机制和发展针对绿脓杆菌的新型抗菌药物提供了坚实的理论基础. 作为 Tse2-Tsi2 三维结构研究的第一步, 我们成功地解析了类抗毒素蛋白 Tsi2 的晶体结构. 本文系统阐述了 Tsi2 作为一种新型类抗毒素的结构特征: a. 左手卷曲螺旋(coiled coil); b. 揭示了 Tsi2 二体功能单位的组装方式和结构基础, 这是抗毒素分子能够形成稳定三维结构的又一个例证; c. 通过 Tsi2 结构和已知抗毒素结构比较提出了 Tsi2 与 Tse2 可能的作用方式.

## 1 材料和方法

### 1.1 绿脓杆菌 Tsi2 的克隆、表达和纯化

根据 NCBI 数据库中 tsi2 基因序列(GenBank: AAG06091.1)人工合成 tsi2 基因(上海生工生物技术公司), 并将其克隆至 pET22b(Novagen 公司)表达载体, 酶切位点是 *Nde* I 和 *Xho* I, 基因测序验证

无氨基酸残基突变.

带有外源基因 tsi2 的表达载体 pET22b 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 挑取单克隆于 50 ml LB 培养基中(含 100 mg/L 氨苄青霉素) 37°C 过夜培养, 次日按 3%接菌量转接至 1 L LB 培养基中(含 100 mg/L 氨苄青霉素), 37°C 培养 3 h 后加入 0.2 ml 1 mol/L IPTG 置于 16°C 诱导过夜, 离心收集菌体(4 000 r/min, 4°C, 30 min). 将菌体沉淀用 Lysis 缓冲液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0; 300 mmol/L NaCl; 10 mmol/L 咪唑)重悬, 加入蛋白酶抑制剂 PMSF 后 4°C 超声破菌, 细胞裂解物充分离心(18 000 r/min, 4°C, 30 min)除去细胞碎片.

含有目标蛋白的裂菌上清液采用三步纯化手段得到高纯度 Tsi2 蛋白. 第一步采用 Ni-NTA 亲和层析(Novagen 公司)初步纯化, 层析柱用 Lysis 缓冲液预平衡 5 个柱体积后上样, 经 Wash 缓冲液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)清洗 10 个柱体积洗掉非特异吸附蛋白, 再用洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)将目标蛋白洗脱. 洗脱蛋白用 Vivaspin(Sartorius 公司) 3K Da 浓缩管浓缩后过 5 ml HiTrap Q 阴离子交换柱(GE Healthcare 公司), 在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中经 0.05~2 mol/L NaCl 线性梯度洗脱得到目标蛋白. 洗脱峰浓缩后上样 Hiload 16/60 Superdex75 分子筛层析柱(GE Healthcare 公司), 缓冲液为 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 分子筛洗脱峰浓缩至 10 g/L(Bio-Red Protein Assay), 4°C 保存.

### 1.2 硒代蛋白 Se\_Tsi2 表达纯化

硒代蛋白 Se\_Tsi2 表达采用缺陷型表达菌株 B834(DE3)(Navogen 公司), 常规转化、单菌落小瓶培养和 1 L LB 培养基 37°C 扩大培养 3 h 后, 离心 4 000 r/min, 4°C, 20 min 收集菌体沉淀, 小心重悬后转接至 1 L M9 培养基中, 37°C 饥饿培养 2 h, 加入 50 mg 硒代甲硫氨酸, 30 min 后加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 16°C 诱导过夜.

Se\_Tsi2 的纯化和母体蛋白纯化流程相似, 但由于 Se 原子易于被氧化, 在硒代蛋白的镍柱缓冲液中另外添加了 5 mmol/L 的 β- 巯基乙醇, 分子筛缓冲液中另外添加了 5 mmol/L DTT 和 0.2 mmol/L EDTA 作为保护剂.

### 1.3 结晶和数据收集

Tsi2 母体和硒代晶体均在 25°C，采用座滴法获得。Tsi2 母体晶体条件为：12% PEG400、0.1 mol/L 乙酸钠(pH 4.4)，蛋白质浓度 2.5 g/L。Se\_Tsi2 晶体条件为：10% PEG3350、0.1 mol/L 乙酸钠(pH 5.0)，蛋白质浓度 5 g/L。

Tsi2 母体晶体的表征和衍射数据收集在中国科学院生物物理研究所 MM007IP X-射线衍射数据收集系统(Rigaku 公司)上进行。Se\_Tsi2 晶体 X 射线衍射数据是在北京同步辐射站 3W1A 上收集的一套 Peak 数据，光源波长为 0.9795Å。晶体样品均经含 10% 乙二醇(EG)的池液防冻保护，于 93K 温度环境下采集 360 幅画面，以此保证数据完整性。

### 1.4 结构解析和修正

衍射数据的指标化和积分使用 MOSFLM<sup>[19]</sup>，数据统一和合并使用 CCP4<sup>[20]</sup>中的 Scala。硒代数据应用 PHENIX<sup>[21]</sup>的 AutoSol 用 SAD 法求解相位，再

使用 AutoBuild 自动搭模，得到部分模型后使用 COOT<sup>[22]</sup>手动搭建剩余序列。结构模型修正采用 PHENIX 的 PhenixRefine 自动优化和 COOT 手动调整相结合的方法。Tsi2 最终模型经 PHENIX 的 Comprehensive Validation 计算验证各项指标均非常合理(表 1)。Tsi2 原子坐标和结构因子文件已提交蛋白质数据库(PDB)，Tsi2 PDB 编号为 3VPV。

## 2 结果和讨论

### 2.1 Tsi2 晶体结构

Tsi2 和 Se\_Tsi2 晶体都属于 P1 空间群，一个不对称单位含有 2 个 Tsi2 分子。2 个分子包括除第一位甲硫氨酸外所有的氨基酸残基(2~77)，其中 A 链分子的 C 端 His 标签 LEHHHHHH 由于与晶体学对称分子相互作用以至密度清晰可见，而 B 链分子 His 标签伸入溶剂区使模型只能搭建到 LEH。2 个分子除了柔性 loop 区外结构基本相同，主链 C $\alpha$  的 RMSD 为 0.714Å。Tsi2 单体核心区为 2 个长  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2)组成的反平行左手卷曲螺旋(coiled coil)，Tsi2 C 端只有 1 个短  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ 3)，并且伸入卷曲螺旋的疏水槽中(图 1a, 1b)。卷曲螺旋的每圈螺旋为 3.5 个残基而不是通常的 3.6 个残基，从而形成七残基重复序列(a-b-c-d-e-f-g)。a、d 位多为非极性残基位于卷曲螺旋内侧形成疏水核心(图 1d)。Tsi2 C 端主要由两段长 Loop(L2, L3)和一个短  $\alpha$  螺旋( $\alpha$ 3)组成， $\alpha$ 3 的 Tyr68、Leu70、Ile71 侧链伸入  $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 形成的疏水槽中，与  $\alpha$ 1 的 Met9、Ile12、Gln13、Ala16 以及  $\alpha$ 2 的 Lys52、Tyr55 通过疏水作用形成一个疏水内核，从而使 C 端柔性区得以稳定(图 1c)。

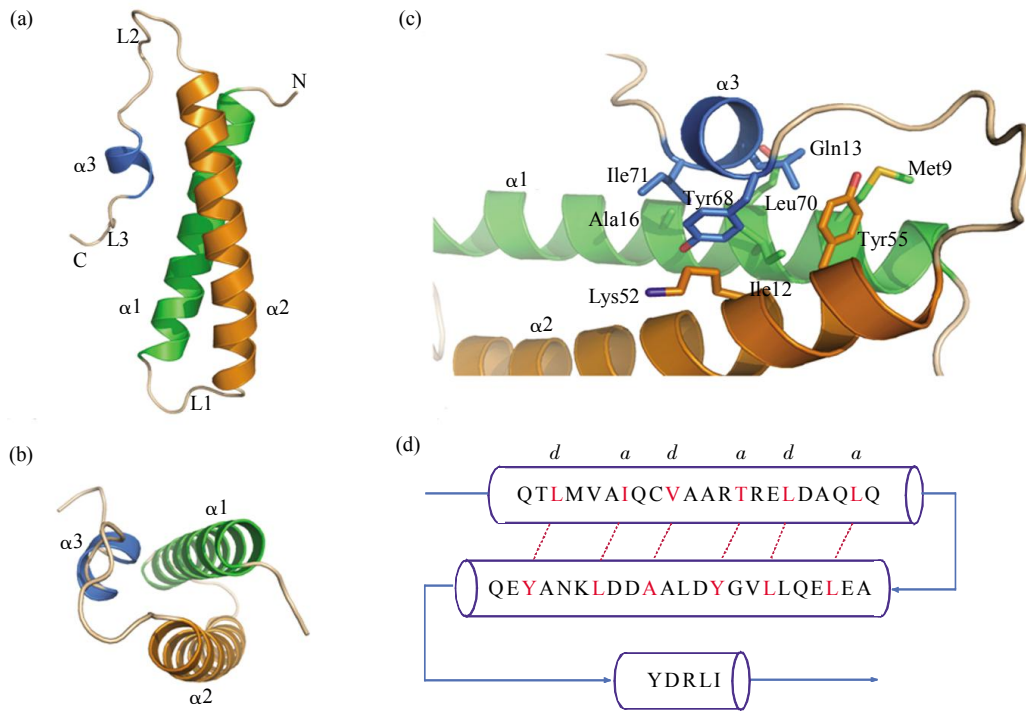
### 2.2 Tsi2 二聚体作用面

在抗毒素结构中，二聚化是最常见的组装方式，分子筛结果显示 Tsi2 在溶液态也是以二聚体形式存在(图 2a)。在 Tsi2 晶体中，一个不对称单位包含 2 个 Tsi2 单体，二聚体作用面主要由疏水作用维持，由 N 端 2 个长  $\alpha$  螺旋部分疏水残基参与： $\alpha$ 1 上 Thr7、Val10、Cys14、Val15； $\alpha$ 2 上 Tyr44、Ala47、Leu51，2 个分子的共 14 个残基构成疏水核心(图 2c, 2d)。2 个分子的 Cys14 距离，足以形成二硫键，并以此来稳定二聚体结构。但是，在无还原剂的母体晶体结构中 2 个 Cys 并没有形成二硫键。这说明疏水作用足以稳定二聚体构象，并不需要共价键的作用。除疏水作用外，Arg17 与 Glu21 能够形成氢键网络，辅助稳定二聚

Table 1 Data collection and refinement statistics

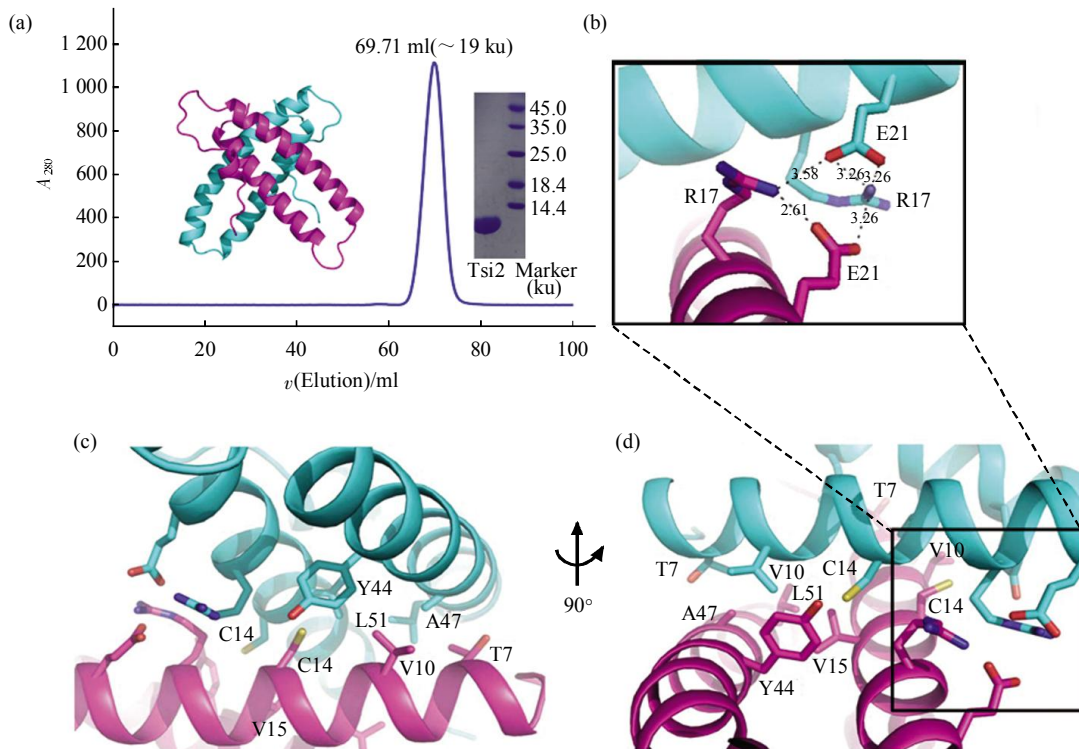
	Se_Tsi2	Tsi2
<b>Data collection</b>		
Space group	P1	P1
Cell dimensions		
$a, b, c$ (Å)	28.38, 34.92, 38.49	27.64, 34.07, 37.62
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	110.37, 95.98, 95.61	110.44, 96.05, 96.37
	<i>Peak</i>	
Wavelength (Å)	0.9795	1.5418
Resolution (Å)	19.79-1.80 (1.90-1.80)	34.83-2.09 (2.21-2.09)
$R_{\text{merge}}$ (%)	2.2 (4.7)	3.5 (3.7)
$I/\sigma I$	36.5 (16.0)	15.0 (13.3)
Completeness (%)	96.5(95.7)	94.1 (91.6)
Redundancy	4.0 (4.0)	3.0 (3.0)
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	19.79-1.80	
No. reflections	12196	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	18.43/21.74	
No. atoms		
Protein	1281	
Water	218	
$B$ -factors (Å <sup>2</sup> )		
Protein	14.878	
Water	24.224	
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.0050	
Bond angles (°)	0.745	

Values in parentheses are for highest-resolution shell.



**Fig. 1 The coiled coil conformation of the Tsi2 monomer**

(a, b) The cartoon model of the Tsi2 monomer from the side view and the top view respectively. (c) The  $\alpha 3$  helix is fastened to the groove formed between  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  through hydrophobic interaction. (d) The sketch of the interactive amino acid residues of the coiled coil formed by  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ . The red color codes represent the amino acid residues in *a* and *d* sites of "7 amino acid residues repeated helix" and the hydrophobic interactions between them are indicated with broken lines.



**Fig. 2 The gel filtration chromatography of Tsi2 in solution and the dimerization interface of Tsi2 structure**

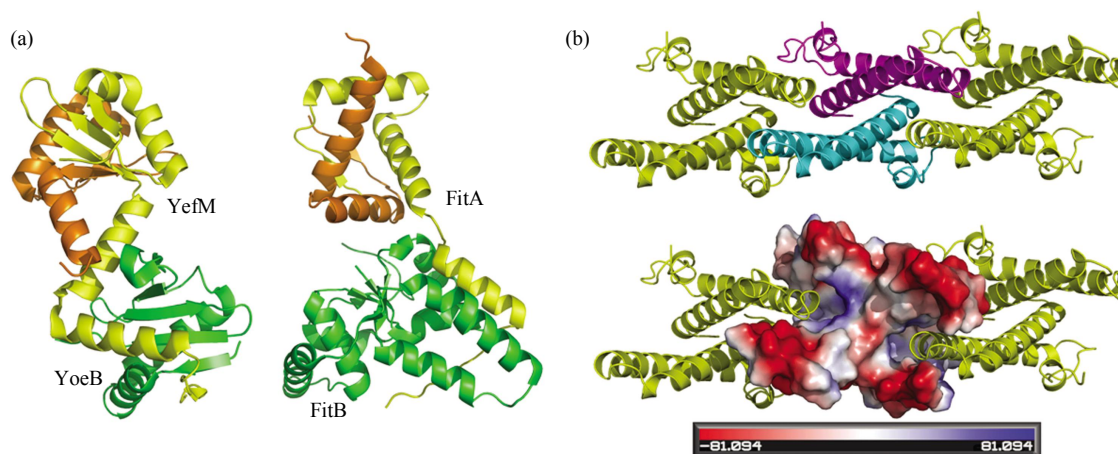
(a) The gel filtration chromatography of Tsi2 indicates its function unit is a dimer in solution: the elution peak is about 19 ku and Tsi2 molecular mass is about 9.5 ku with SDS-PAGE confirmed. (b) The hydrogen bonds formed by R17 and E21 are magnified in the black box and the distance is labeled with the black dot lines. (c, d) The dimerization interface of two molecules which are colored by cyan and magenta respectively. Residues involved in hydrophobic interaction are shown in a stick model with labels.

体构象(图 2b). 2 个分子 C 端均带有 His 标签, 并且 A 链分子 6 个 His 与对称分子柔性 Loop 区作用全部清晰可见. 但是, 对 His 标签所在区域分子间相互作用分析表明 His 标签并不参与二聚体的组装. 由此可见, 晶体结构中观察到的独特方式组装的二聚体对应于溶液状态下的 Tsi2 二聚体, 而这个二聚体是 Tsi2 的功能单位(图 2a).

### 2.3 Tsi2-Tse2 可能的作用方式

迄今已知的毒素 - 抗毒素结构, 为研究 Tsi2-Tse2 的作用方式提供了重要的线索. 尽管序列同源性不高, 但是在抗毒素的组装方式上还是有

明显的共性. 抗毒素一般由 2 个结构域组成: 刚性的 DNA 结合结构域(DNA-binding domain)和柔性的中和结构域(neutralization domain). DNA 结合结构域根据各自启动子的不同可采用几种不同的组装方式<sup>[1]</sup>, 例如 helix-turn-helix (HigA, MqsA)、robbin-helix-helix(FitA, ParD)、Yefm-like(YefM)等, 刚性的 DNA 结合结构域也是参与二聚化的主要结构域. 中和结构域主要是参与和毒素的相互作用而抑制毒素的活性, 其序列根据与毒素作用位点不同而差异更大, 并且以其柔性方便参与毒素的调节(图 3a), 这也与“disorder to order”模型相契合.



**Fig. 3** The classical structure model of TA system and the "clamp" structure of Tsi2 dimer

(a) The cartoon model of two classical TA systems: YefM-YoeB and FitB-FitA (PDB ID: 2A6Q and 2BSQ). The DNA-binding domain of antitoxin (yellow and orange) is involved in the dimerization and the neutralization domain of Antitoxin (yellow) is so flexible as to interact with the toxin (green). (b) Electrostatic potential plots (blue, basic; red, acidic) of Tsi2 dimer and two symmetric molecules with one  $\alpha$  helix stretching into the groove formed by the "clamp" structure of Tsi2 dimer. The huge groove indicates the region of Tsi2 dimer may be important to interact with Tse2.

Tsi2 作为一种新型的类抗毒素蛋白, 其 N 端采用全新的卷曲螺旋结构特征, 这与经典的抗毒素刚性结构域的组装方式明显不同. 在 Pfam 数据库中搜索没有发现可指认的同源结构域, 同抗毒素分子 3 种经典的 DNA 结合结构域作比对发现也无任何结构同源性, 这暗示着 Tsi2 可能不参与 DNA 的结合. Tsi2 C 端的  $\alpha_3$  螺旋由于与  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  的疏水作用而固定, 如果按照抗毒素的经典模型分析 Tsi2-Tse2 的相互作用, 则 Tsi2 柔性 loop 区 L2 需要发生构象变化, 打开  $\alpha_3$  与 N 端卷曲螺旋的疏水内核, 夹住 Tse2 而抑制其活性. 但是从能量角度来看需要克服疏水作用并非是 Tsi2-Tse2 相互作用最理想的模型. 考虑到二聚体作为 Tsi2 的功能单位并且 Tsi2 可能不需要结合启动子去参与代谢调

控, 那么 Tsi2 二聚体作为整体参与 Tse2 的结合更为合理. Tsi2 二聚体能够形成“夹子”状结构, 在 2 个分子的长卷曲螺旋之间构成大空间的凹槽, 晶体结构中对称分子各有一个螺旋伸入凹槽内(图 3b), Tsi2 晶体结构中这种对称分子的作用方式提示 Tsi2 可能正是通过这种“夹子”构象恰好卡住 Tse2 的某些突出部位(例如  $\alpha$  螺旋), 从而阻遏了 Tse2 与其底物的结合发挥抗毒素活性. 这种模型不需要构象变化而互补契合, 从能量学角度看, 可能是最为合理的一种.

当然, 关于 Tsi2-Tse2 的结构与功能关系, 需要更多的结构与生化实验来加以验证. 我们获得的 Tsi2 单独状态下的三维结构, 为深入理解其作为新兴抗毒素蛋白的分子本质, 揭示其发挥抗毒素活性



的结构基础, 又为开展 Tsi2-Tse2 复合物的结构与功能研究打下了坚实的基础。

### 参 考 文 献

- [1] Lyczak J B, Cannon C L, Pier G B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, 2000, **2**(9): 1051-1060
- [2] Lambert P A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, 2002, **95**(Suppl 41): 22-26
- [3] Ma A T, McAuley S, Pukatzki S, *et al.* Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe*, 2009, **5**(3): 234-243
- [4] Mougous J D, Cuff M E, Raunser S, *et al.* A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, **312**(5779): 1526-1530
- [5] Hood R D, Singh P, Hsu F, *et al.* A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*, 2010, **7**(1): 25-37
- [6] Russell A B, Hood R D, Bui N K, *et al.* Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 2011, **475** (7356): 343-347
- [7] Gerdes K, Christensen S K, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(5): 371-382
- [8] Pandey D P, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(3): 966-976
- [9] Kamada K, Hanaoka F, Burley S K. Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell*, 2003, **11**(4): 875-884
- [10] Kamada K, Hanaoka F. Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Mol Cell*, 2005, **19**(4): 497-509
- [11] Arbing M A, Handelman S K, Kuzin A P, *et al.* Crystal structures of Phd-Doc, HlgA, and YeeU establish multiple evolutionary links between microbial growth-regulating toxin-antitoxin systems. *Structure*, 2010, **18**(8): 996-1010
- [12] Dienemann C, Boggild A, Winther K S, *et al.* Crystal structure of the VapBC toxin-antitoxin complex from *Shigella flexneri* reveals a hetero-octameric DNA-binding assembly. *J Mol Biol*, 2011, **414**(5): 713-722
- [13] Neubauer C, Gao Y G, Andersen K R, *et al.* The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell*, 2009, **139**(6): 1084-1095
- [14] De Jonge N, Garcia-Pino A, Buts L, *et al.* Rejuvenation of CcdB-poisoned gyrase by an intrinsically disordered protein domain. *Mol Cell*, 2009, **35**(2): 154-163
- [15] Jiang Y, Pogliano J, Helinski D R, *et al.* ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol Microbiol*, 2002, **44**(4): 971-979
- [16] Engelberg-Kulka H, Sat B, Reches M, *et al.* Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Trends Microbiol*, 2004, **12**(2): 66-71
- [17] Kumar P, Issac B, Dodson E J, *et al.* Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* YefM antitoxin reveals that it is not an intrinsically unstructured protein. *J Mol Biol*, 2008, **383**(3): 482-493
- [18] Brown B L, Grigoriu S, Kim Y, *et al.* Three dimensional structure of the MqsR: MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog*, 2009, **5**(12): e1000706
- [19] Rossmann M G, van Beek C G. Data processing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999, **55**(Pt 10): 1631-1640
- [20] Brunger A T, Adams P D, Clore G M, *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998, **54**(Pt 5): 905-921
- [21] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010, **66**(Pt 2): 213-221
- [22] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132

## Three Dimensional Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Tsi2: a Novel Species-specific Antitoxin-like Protein With Coiled Coil Conformation\*

WANG Wei<sup>1,2)</sup>, DING Jing-Jin<sup>1)\*\*</sup>, WANG Da-Cheng<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup> National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2)</sup> Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** Utilizing the type VI secretion system (T6SS), *Pseudomonas aeruginosa* secretes the effector protein Tse2, a toxin to other competitive bacteria. It is a newly identified molecular mechanism for *P. aeruginosa* to win a survival advantage. To avoid being poisoned itself, *P. aeruginosa* synthesizes the specific immunity protein, Tsi2 to inhibit the toxin. Sequence analysis shows that Tsi2 is a novel antitoxin-like protein which is specific for *P. aeruginosa*. Using the SAD method, we have successfully resolved the crystal structure of Tsi2 at 1.8Å resolution. Our crystallographic studies reveal that Tsi2 adopts a novel coiled coil conformation which is not found in the antitoxins family previously. Meanwhile, Tsi2 is a well-assembled protein instead of an unfolded protein as an antitoxin in the toxin-free state. Tsi2 functions as a stable dimer and assembles as a unique "clamp" structure through extensive hydrophobic interactions. Two grooves on the dimerization interface combining with one helix of two symmetric molecules respectively imply the potential region interacting with Tse2. This research not only offers comprehensive insights into the molecular essence of Tsi2 as an antitoxin, but also reveals its structural basis of antitoxin activity. Furthermore, the apo Tsi2 structure provides a good framework for further researches on the structure and function of the complex Tse2-Tsi2.

**Key words** *Pseudomonas aeruginosa*, type VI secretion system (T6SS), Tsi2-Tse2, antitoxin, coiled coil

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00126

---

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2011CB910304, 2011CB911103), The National Natural Science Foundation of China (31100535) and Key Innovative Project of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-J-3).

\*\*Corresponding author. Tel: 86-10-64888547

DING Jing-Jin. E-mail: jding@moon.ibp.ac.cn

WANG Da-Cheng. E-mail: dewang@ibp.ac.cn

Received: March 14, 2012 Accepted: May 15, 2012