

OFERTA DE PROYECTO DE TESIS DOCTORAL AYUDAS PARA LA FORMACIÓN DE PROFESORADO UNIVERSITARIO (FPU) 2017

APELLIDOS Y NOMBRE DEL DIRECTOR
Díaz Moreno Irene
TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS
Supercomplejos Respiratorios en la Mitocondria: Interacciones entre la Proteína Inducida por Hipoxia HIGDIA y Citocromos en Humanos.
AREA CIENTÍFICA
Bioquímica, Biología Estructural, Biofísica y Biología Celular
CENTRO/INSTITUTO
Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja)
COMUNIDAD AUTÓNOMA/PROVINCIA
Andalucía
CORREO ELECTRÓNICO DEL DIRECTOR
irene@iiq.csic.es
WEBSITE GRUPO DE INVESTIGACION O CENTRO/INSTITUTO
https://www.iiq.us-csic.es/en/biointeractomics

MEMORIA DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL (Máximo 3.000 palabras)

La mitocondria es uno de los orgánulos más importantes de las células eucariotas, no sólo por ser el principal productor energético, sino también por su papel en multitud de procesos celulares. Actualmente, uno de los temas más relevantes y controvertidos relacionados con este compartimento se centra en el estudio de los supercomplejos respiratorios, asociaciones moleculares de diferentes componentes de la cadena transportadora de electrones. En este sentido, existen tres modelos que tratan de explicar la dinámica de los complejos que forman la cadena respiratoria. Primero encontramos el *modelo fluido*, que afirma que las proteínas de membrana se mueven libremente a través de la bicapa lipídica y que dichos movimientos son independientes (Hackenbrock *et al.*, 1986). En el otro extremo encontramos el *modelo sólido*, que se basa en la presencia de supercomplejos, es decir, asociaciones moleculares estables entre los diferentes complejos respiratorios (Green *et al.*, 1966). Dado que ambos escenarios no son excluyentes, se ha propuesto el tercer modelo: el *modelo de plasticidad*. Dicho modelo postula que existen distintas asociaciones entre los complejos de la cadena (Acín-Pérez *et al.*, 2008).

La formación de supercomplejos es un fenómeno que ocurre tanto en animales como en plantas, hongos y bacterias (Berry y Trumpower, 1985; Schägger y Pfeiffer, 2000; Eubel *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2004). La mayoría de los supercomplejos están compuestos por los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria, excepto en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece del complejo I (Schägger, 2002; Krause *et al.*, 2004; Acín-Pérez *et al.*, 2008). Los supercomplejos que contienen los complejos I, III y IV se denominan **respirasomas** y son capaces de transferir electrones directamente desde el NADH hasta el oxígeno (Schägger y Pfeiffer, 2000; Dudkina *et al.*, 2011). Estos supercomplejos aumentan la eficiencia del proceso de transporte electrónico durante la fosforilación oxidativa, disminuyendo así la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Genova y Lenaz, 2014).

Los factores de formación de supercomplejos (*respiratory supercomplexes factors* o Rcf) intervienen en la formación de estos ensamblados. Estos factores son proteínas que median dicha asociación bajo condiciones de hipoxia y han sido descritos en mamíferos y levaduras. En el caso de levaduras, el contacto entre el complejo bc_1 (complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (CcO o complejo IV) está mediado por las proteínas Rcf1 y Rcf2 (Strogolova *et al.*, 2012; Vukotic M *et al.*, 2012). Rcf1 presenta dos ortólogos en humanos pertenecientes a la familia de genes inducidos por hipoxia (HIG1): HIGD1A y HIGD2A. (Shoubridge, 2012). El primer ortólogo, HIGD1A, es un regulador positivo de la CcO y juega un papel fundamental en la modulación de la supervivencia celular y el crecimiento de tumores (Ameri *et al.*, 2015; Hayashi *et al.*, 2015). El otro ortólogo, HIGD2A, es necesario para el ensamblaje de los complejos I, III y IV en la formación de supercomplejos (Chen *et al.*, 2012). Del mismo modo, el grupo al que se incorporaría el candidato ha descrito recientemente que las proteínas HIGD1A y HIGD2A funcionan

como reguladores positivos de la actividad del complejo IV (CcO) (Moreno- Beltrán *et al.*, 2017). Además, otros estudios sugieren que los supercomplejos formados por los complejos I/III y III/IV están estabilizados por los transportadores electrónicos ubiquinona (Q) y citocromo *c* (Cc) (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Enriquez y Lenaz, 2014). Recientemente, se ha descrito la estructura del respirasoma (I/III₂/IV) mediante criomicroscopía electrónica (Letts *et al.*, 2016; Gu *et al.*, 2016; Melber *et al.*, 2016; Letts *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de ser una estructura de alta resolución, el modelo no incluye las proteínas HIGD1A y HIGD2A.

En el caso del Cc humano, hemoproteína soluble de pequeño tamaño y muy conservada en organismos eucariotas, el grupo de investigación al que se incorporará el candidato ha descrito la presencia de diferentes sitios de unión a Cc en los complejos III y IV (Moreno-Beltrán *et al.*, 2014; Moreno-Beltrán *et al.*, 2015; González-Arzola *et al.*, 2015). En relación al complejo IV-Cc, la estructura cristalográfica revela una superficie de interacción singular entre el Cc y la CcO mediada por hasta tres capas de moléculas de agua que explicarían la rápida transferencia de electrones entre ambas proteínas (Shimada *et al.*, 2017).

El correcto funcionamiento y regulación de la cadena de transporte de electrones es esencial para la supervivencia celular. La alteración de algunos de sus componentes se relaciona con una gran variedad de enfermedades, como la miopatía mitocondrial (Holt *et al.*, 1998) o la neuropatía óptica hereditaria de Leber (Chalmers *et al.*, 1999), así como con el propio fenómeno de envejecimiento (Gómez *et al.*, 2009). En este contexto, desvelar las interacciones moleculares en la formación de los supercomplejos es clave para comprender el funcionamiento de la cadena respiratoria y su papel en ciertas enfermedades.

Este proyecto pretende profundizar en la caracterización molecular de las interacciones entre el dominio soluble del citocromo *c*₁ humano (Cc₁), perteneciente al complejo III, y del citocromo *c* humano (Cc) con la proteína de membrana HIGD1A, con el fin de entender el **ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales** en humanos. Complementariamente, sería de gran interés caracterizar si el Cc forma parte de la plataforma Cc₁-HIGD1A constituyendo un complejo ternario.

Programa de Investigación y Metodología

I.- Expresión y Purificación de Proteínas de la Cadena de Transporte Electrónico

Proponemos llevar a cabo la expresión y purificación de la quimera MBP-HIGD1A, diseñada para aumentar la solubilidad de la proteína, siguiendo la metodología puesta a punto en el laboratorio al que se incorporará el candidato. Dicha quimera contiene,

además de la proteína HIGDIA, la proteína *maltose-binding protein* (MBP), usada ampliamente para solubilizar proteínas de membrana de carácter hidrofóbico. La viabilidad y adecuación de dicha quimera está respaldada por diferentes estudios (Hayashi *et al.*, 2015) y resultados preliminares muy positivos en nuestro laboratorio. A pesar de que el Tag-MBP es una opción para llevar a cabo la purificación, nuestros ensayos indican que es más eficiente realizar dicha purificación mediante cromatografía de afinidad por Ni usando el Tag-Histidina situado en el extremo N-terminal de la MBP.

La expresión y purificación de los citocromos Cc y Cc₁ humanos se realizará usando los métodos puestos a punto en el laboratorio al que se incorpora el candidato. Además, se llevará a cabo la producción del Cc en medio mínimo con objeto de conseguir marcarla con isótopos susceptibles de campo magnético, en concreto ¹⁵N.

2.- Estudios Estructurales y Biofísicos de Formación de Complejos de la Cadena de Transporte Electrónico

Los experimentos de unión del hCc₁ con la quimera MBP-HIGDIA se llevarán a cabo en la **Plataforma de Interacciones Biomoleculares** localizada en el Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja; <http://bip.ciccartuja.es/home/>). Dicha Plataforma cuenta con un calorímetro de bajo volumen y un equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alto rendimiento y gran sensibilidad, equipado con criosonda de 600 MHz y capaz de analizar 4 isótopos: ¹H, ¹³C, ¹⁵N y ¹⁹F. Con este tipo de experimentos seremos capaces de revelar, no solo la entalpía y energía libre de la unión proteína-proteína (ITC), también podremos determinar qué residuos están implicados en dicha interacción (RMN).

En el caso de los experimentos de ITC, llevaremos a cabo los siguientes ensayos:

- Cc + MBP-HIGDIA: Cc oxidado y reducido
- Cc₁ + MBP-HIGDIA: Cc₁ oxidado y reducido
- Cc + Cc₁ + MBP-HIGDIA: Ambos citocromos oxidados y reducidos

Para descartar una posible interacción entre los citocromos Cc y Cc₁ con la proteína MBP realizaremos los experimentos pertinentes, mediante ITC, siguiendo los mismos procedimientos que con la quimera MBP-HIGDIA.

Para los experimentos de RMN resultará esencial el **marcaje isotópico con ¹⁵N** del Cc para realizar los estudios de interacción con MBP-HIGDIA. Estos ensayos se llevarán a cabo con el Cc reducido y oxidado. Adicionalmente, se caracterizará la interacción entre Cc y Cc₁, ambos citocromos oxidados o reducidos, mediante experimentos de RMN.

3.- Estudios Bioquímicos y Celulares para determinar la Formación de Supercomplejos Mitocondriales en Condiciones de Hipoxia

El estudio de la formación de los supercomplejos se realizará mediante el cultivo de diversas líneas celulares humanas bajo condiciones de normoxia e hipoxia (aguda y crónica). Se extraerán las mitocondrias de dichas líneas y se solubilizarán los complejos respiratorios para su posterior estudio mediante geles nativos (*Blue-Native Page*). La identificación de los componentes que forman las distintas configuraciones de supercomplejos será hara mediante análisis de masas e inmunodetección (Moreno-Beltrán *et al*, 2017). Estos análisis permitirán determinar si la HIGDIA y/o el Cc son críticos en el ensamblaje de supercomplejos mitocondriales.

Además, se analizará la localización de las proteínas HIGDIA y Cc bajo estas mismas condiciones de crecimiento. Para ello se transformarán células HELTOG, células HeLa que sobre-expresan de manera constitutiva el Cc fusionado a la proteína fluorescente verde disponibles en el laboratorio, con un vector que sobre-expresa la quimera HIGDIA-mCherry, permitiendo ver la posible co-localización de ambas proteínas usando microscopía confocal. En base a datos recientes del laboratorio al que se adscribiría el candidato en los que se publica la translocación al núcleo del Cc en condiciones de daño en DNA (González-Arzola *et al.*, 2015) y, puesto que la HIGDIA también puede localizarse en el núcleo (Ameri *et al.*, 2017) proponemos extender los experimentos de co-localización entre las proteínas quimeras Cc-GFP y HIGDIA-mCherry a los compartimentos celulares núcleo y citoplasma. La viabilidad celular se testará mediante citometría de flujo y ensayos de actividad caspasa (Guerra-Castellano *et al.*, 2016; Moreno-Beltrán *et al.*, 2017).

El Proyecto que aquí se presenta se desarrollará en el Grupo de Biointeractómica (<https://www.iiq.us-csic.es/en/biointeractomics>) del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigación Isla de Cartuja (IIQ-cicCartuja). Se trata de un proyecto con un destacado carácter multi- e interdisciplinar que va más allá del actual estado del arte en nuestra comprensión de las bases moleculares de la bioenergética y la biointeractómica mitocondrial, y el consiguiente entendimiento de enfermedades mitocondriales relacionadas. El **carácter innovador y de vanguardia** del Proyecto presentado permitirá al candidato introducirse en las actuales líneas de investigación del grupo, así como formarse en los campos de la Biología Molecular, Bioquímica, Biofísica y Biología Estructural, adquiriendo una sólida formación durante su Tesis Doctoral.

Bibliografía

Acin-Perez R, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* (2008) **32**: 529–539.

Ameri K, Rajah AM, Nguyen V, Sanders TA, Jahangiri A, Delay M, Donne M, Choi HJ, Tormos KV, Yeghiazarians Y, Jeffrey SS, Rinaudo PF, Rowitch DH, Aghi M, Maltepe E. Nuclear localization of the mitochondrial factor HIGD1A during metabolic stress. *PLoS One* (2013) **8**: e62758.

Berry EA, Trumpower BL. Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc₁* and cytochrome *c-aa₃* complexes. *J Biol Chem* (1985) **4**: 2458–2467.

Chen J, Young SM, Allen C, Seeber A, Péli-Gulli MP, Panchaud N, Waller A, Ursu O, Yao T, Golden JE, Strouse JJ, Carter MB, Kang H, Bologna CG, Foutz TD, Edwards BS, Peterson BR, Aubé J, Werner-Washburne M, Loewith RJ, De Virgilio C, Sklar LA. Identification of a small molecule yeast TORC1 inhibitor with a multiplex screen based on flow cytometry. *ACS Chem Biol* (2012) **4**: 715–722.

Chalmers RM, Schapira AH. Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg* (1999) **410**:147–158.

Dudkina NV, Kudryashev M, Stahlberg H, Boekema EJ. Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) **37**: 15196–15200.

Enriquez JA, Lenaz G. Coenzyme Q and the respiratory chain: coenzyme Q pool and mitochondrial supercomplexes. *Mol Syndromol* (2014) **5**: 119–140.

Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP. Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* (2004) **4**: 1450–1459.

Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg* (2014) **4**: 427–443.

Gómez LA, Monette JS, Chavez JD, Maier CS, Hagen TM. Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys* (2009) **490**: 30–35.

González-Arzola K, Díaz-Moreno I, Cano-González A, Díaz-Quintana A, Velázquez-Campoy A, Moreno-Beltrán B, López-Rivas A, De la Rosa MA. Structural basis for inhibition of the histone chaperone activity of SET/TAF-1 β by cytochrome *c*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) **112**: 9908–9913.

Gu J, Wu M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N, Yang M. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* (2016) **537**: 1-16.

Guerra-Castellano A, Díaz-Moreno I, Velázquez-Campoy A, De la Rosa MA, Díaz-Quintana A. Structural and functional characterization of phosphomimetic mutants of cytochrome *c* at threonine 28 and serine 47. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg* (2016) **1857**: 387–395.

Green DE, Tzagoloff A. The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys* (1966) **116**: 293–304.

Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* (1986) **5**: 331–368.

Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto Y, Ogura T, Kitakaze M, Komuro H, Sakata Y, Tsukahara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) **112**: 1553–1558.

Holt IJ, Harding AE, Morgan Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* (1988) **331**: 717-719.

Krause F, Reifschneider NH, Vocke D, Seelert H, Rexroth S, Dencher NA. "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J Biol Chem* (2004) **279**: 48369–48375.

Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* (2016) **537**: 644–648.

Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol* (2017) **24**: 800–808.

Melber A, Winge DR. Inner Secrets of the Respirasome. *Cell* (2016) **167**: 1450–1452.

Moreno-Beltrán B, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, Velázquez-Campoy A, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. Cytochrome *c*₁ exhibits two binding sites for cytochrome *c* in plants. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg* (2014) **1837**: 1717–1729.

Moreno-Beltrán B, Díaz-Moreno I, González-Arzola K, Guerra-Castellano A, Velázquez-Campoy A, De la Rosa MA, Díaz-Quintana A. Respiratory complexes III and IV can each bind two molecules of cytochrome *c* at low ionic strength. *FEBS Lett* (2015) **589**: 476–483.

Moreno-Beltrán B, Guerra-Castellano A, Díaz-Quintana A, Del Conte R, García-Mauriño SM, Díaz-Moreno S, González-Arzola K, Santos-Ocaña C, Velázquez-Campoy A, De la Rosa MA, Turano P, Díaz-Moreno I. Structural basis of mitochondrial dysfunction in response to cytochrome *c* phosphorylation at tyrosine 48. *Proc Natl Acad Sci USA Plus* (2017) **114**: E3041–E3050.

Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* (2000) **8**: 1777–1783.

Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg* (2002) **1555**: 154–159.

Shimada S, Shinzawa-Itoh K, Baba J, Aoe S, Shimada A, Yamashita E, Kang J, Tateno M, Yoshikawa S, Tsukihara T. Complex structure of cytochrome *c*-cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. *EMBO J* (2017) **36**: 291–300.

Shoubridge EA. Supersizing the mitochondrial respiratory chain. *Cell Metab* (2012) **15**: 271–272.

Strogolova V, Furness A, Robb-McGrath M, Garlich J, Stuart RA. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome *bc*₁-cytochrome *c* oxidase supercomplex. *Mol Cell Biol* (2012) **32**: 1363–1373.

Vukotic M, Oeljeklaus S, Wiese S, Vögtle FN, Meisinger C, Meyer HE, Ziesenis A, Katschinski DM, Jans DC, Jakobs S, Warscheid B, Rehling P, Deckers M. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metab* (2012) **3**: 33–347.