

# Projet 2 : Complexe multi-protéique de biosynthèse de l'ubiquinone: études biochimiques et structurales

Responsable : Murielle Lombard

## Permanents impliqués dans le projet (01/10/18):

Murielle Lombard (CRCN CNRS), Ludovic Pecqueur (IR 2 CDF), Bruno Faivre (IE CDF) and Marc Fontecave (Pr CDF)

L'ubiquinone, ou coenzyme Q (CoQ ou Q), est un lipide de la membrane plasmique bactérienne qui assure un rôle de transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire ainsi qu'un rôle antioxydant. L'ubiquinone est constituée d'un noyau benzoquinone rédox actif substitué par une chaîne polyisoprényle de 8 unités chez *Escherichia coli* (Q8), de 9 unités chez la levure (Q9) et de 10 unités chez l'homme (Q10) (Fig. 1). L'ubiquinone a un rôle crucial pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Chez l'homme, des déficiences primaires en CoQ ainsi que des mutations dans les gènes de sa biosynthèse ont été associées à diverses pathologies (myopathies, néphropathies, ataxies cérébelleuses, etc).

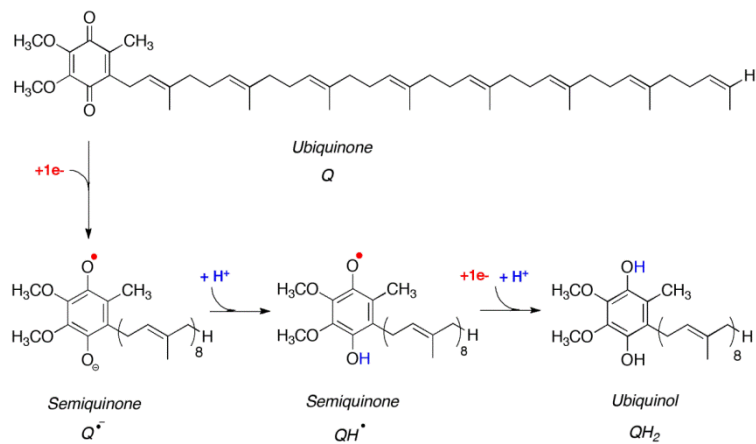


Fig. 1 : Structure de l'ubiquinone et de ses différents états redox

La biosynthèse de CoQ comporte plusieurs étapes de transformation de son noyau aromatique: une réaction de prénylation, une décarboxylation, trois hydroxylations, et trois méthylations (Fig. 2). Chez *Escherichia coli*, 9 protéines ont été identifiées à ce jour dans cette voie de biosynthèse (ubiA-ubiH, ubiX), et des études génétiques réalisées par nos collaborateurs (*F. Pierrel*, UJF-Grenoble ; *F. Barras*, Marseille) ont permis d'identifier 3 nouvelles protéines : VisC (Ubil), YigP (UbiJ) et YqiC (UbiK), toutes trois impliquées dans la biosynthèse de l'ubiquinone. Cette voie de biosynthèse est bien conservée des procaryotes jusqu'à l'homme.

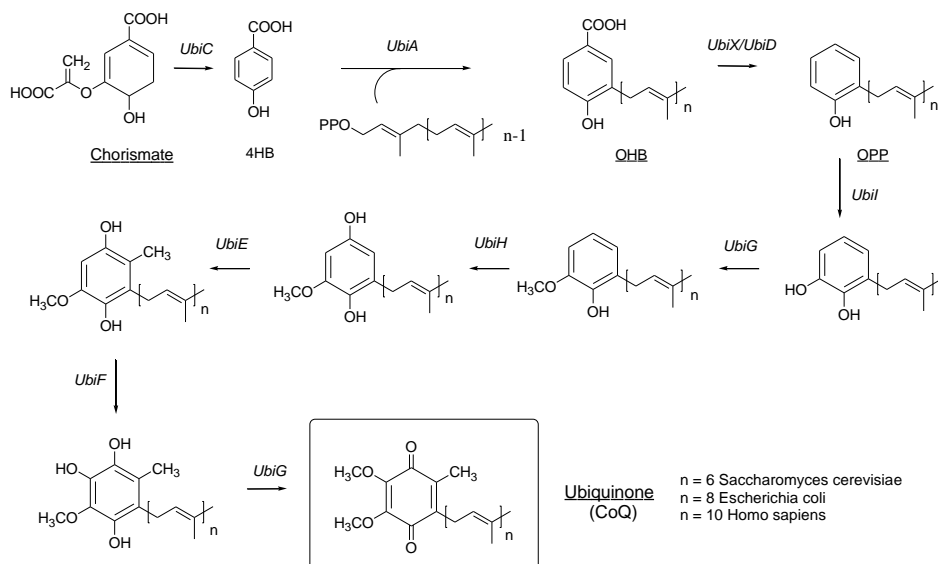


Fig. 2 : Voie de biosynthèse de l'ubiquinone proposée chez *E.coli*

Par ailleurs, ces protéines semblent former un large assemblage multi-protéique associé à la membrane, ainsi que cela semble être le cas pour les protéines Coq, qui sont les protéines homologues des Ubi bactériennes, et qui sont impliquées dans la biosynthèse du CoQ9 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 3).

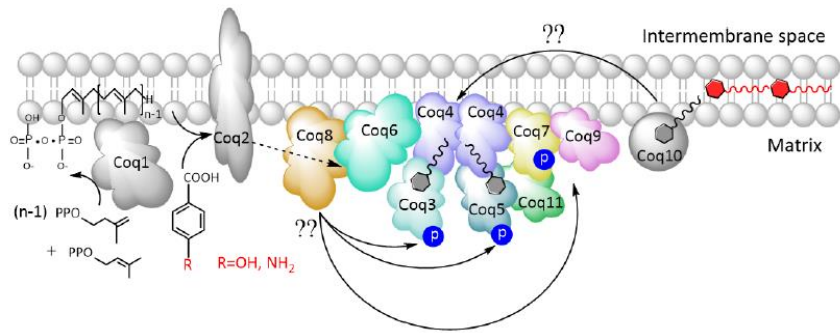


Fig. 3 : Modèle du complexe de biosynthèse du CoQ chez la levure *S. cerevisiae* (Clarke CF, J Biol Chem, 2014).

En dépit de l'importance physiologique de l'ubiquinone dans la chaîne de transfert d'électrons et l'implication dans les pathologies décrites ci-dessus, la fonction de chacune des protéines Ubi n'est à ce jour pas connue entièrement, et de très nombreuses incertitudes demeurent quant à l'identification des protéines responsables de chacune des étapes de la biosynthèse, ainsi que de l'ordre de ces réactions. Nous avons également peu d'informations biochimiques concernant la spécificité de substrat ou les mécanismes réactionnels de ces enzymes. Ceci est partiellement dû au fait que les substrats de ces enzymes sont des composés lipophiles très hydrophobes, peu solubles dans l'eau, et peu facile d'accès. De plus, l'obtention de données physico-chimiques *in vitro* sur des systèmes enzymatiques faisant partie d'un complexe multi-protéique *in vivo* peut être délicat.

Au laboratoire, nous nous intéressons à l'ensemble des protéines de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone chez *Escherichia coli* d'un point de vue structural et fonctionnel. Nous cherchons à déterminer de façon précise la fonction exacte de chacune des protéines ou enzymes qui constituent ce complexe multi-protéique. La caractérisation biochimique *in vitro* des protéines Ubi et la détermination de leur structure tridimensionnelle devraient permettre de mieux comprendre leur fonction, et leur mécanisme au niveau moléculaire. Nous cherchons aussi à déterminer leur mode de structuration en un complexe de haut poids moléculaire (composition exacte de ce complexe, taille et stœchiométrie, localisation cellulaire) et leur ancrage hydrophobe à la membrane (collaboration F. Pierrel, UMR5163, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UJF-Grenoble). Notre objectif est d'avoir une meilleure connaissance au niveau fondamental de la voie de biosynthèse de CoQ chez *E. coli*. Pour cela, nous utilisons une combinaison d'approches multidisciplinaires de biochimie, biophysique moléculaire (spectroscopie sous pression, transfert d'énergie par résonance FRET, dichroïsme circulaire, laser flash photolyse, Djemel Hamdane) et biologie structurale (cristallographie RX, Ludovic Pecqueur) dont nous disposons au sein de l'unité.

Nous avons étudié **Ubil**, l'enzyme qui catalyse la réaction d'hydroxylation en C5 du 2-octaprenyl phenol (OPP). Ubil présente 30% d'identité de séquence avec UbiF et UbiH, deux autres protéines de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, et qui catalysent elles-mêmes chacune une réaction d'hydroxylation du noyau aromatique (C1 pour UbiH et C6 pour UbiF). L'étude des séquences de ces trois enzymes (Ubil, UbiF et UbiH) montre qu'elles appartiennent toutes à la famille des mono-oxygénases à flavine. Nous avons purifié une forme instable d'Ubil qui avait une forte tendance à l'agrégation. Après protéolyse limitée, nous avons obtenu une forme apo (sans FAD), parfaitement soluble et tronquée de 35 acides aminés au niveau C-terminal. Nous avons réussi à

obtenir des cristaux de cette forme apo et tronquée d'Ubil et nous avons déterminé la **structure tridimensionnelle** de l'enzyme par diffraction de RX (2 Å résolution, code PDB 4K22). Cette enzyme partage de fortes similarités structurales avec une protéine de la famille des mono-oxygénases à flavine, la pHBH (p- Hydroxybenzoate hydroxylase) (Fig. 4). Ceci constitue le premier exemple de la structure d'une hydroxylase Ubi.

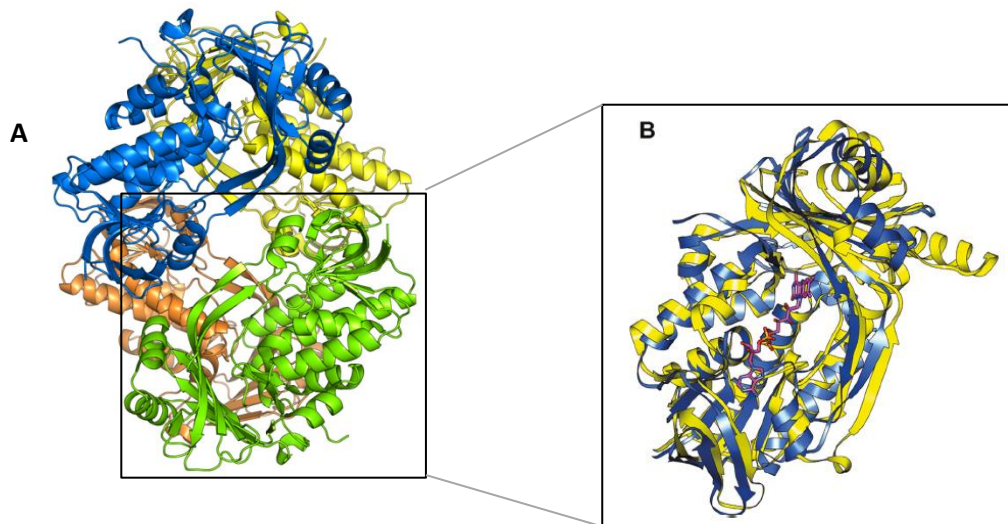
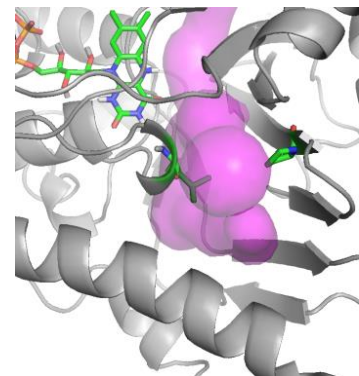


Fig. 4: A- Structure tridimensionnelle aux RX d'Ubil tronquée et apo d'*E.coli* (code PDB 4K22) et B- superposition d'Ubil (bleue) avec PHBH (jaune), code PDB 1PBE (Hajj Chehade, 2014).

Nous avons également initié une étude de modélisation moléculaire par homologie de Coq6 dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme. Cette étude nous a permis, par des calculs de dynamique moléculaire et de docking, de mettre en évidence trois voies d'accès potentielles des substrats (Fig. 5).

Fig. 5 : Modèle proposé de site actif de Coq6 (FAD en vert) avec un tunnel d'accès potentiel du substrat en violet (Caver).



Nous avons entrepris l'étude biochimique et structurale de deux protéines nouvellement identifiées par nos collaborateurs, **UbiJ** et **UbiK**, et dont les fonctions biologiques sont jusqu'à ce jour inconnues. Des études antérieures ont montré qu'UbiK de *Salmonella typhimurium* permet l'agrégation de liposomes *in vitro*, suggérant une activité fusogénique de membrane. UbiK présente 31% d'identité de séquence avec Brick1, une protéine d'assemblage du complexe Wave du cytosquelette, ce qui laisse à penser qu'UbiK pourrait avoir un rôle de **protéine scaffold**, ayant un rôle important pour la formation, la structuration et la stabilité du complexe Ubi. Nous avons montré au laboratoire qu'**UbiK forme un complexe protéique avec UbiJ**, une protéine présentant des homologies de séquence avec les protéines de la famille SCP2 (Sterol Carrier Protein 2) qui sont capables de lier des lipides.

Nous avons récemment obtenu **la structure du domaine SCP2 d'UbiJ à 1.7 Å de résolution**. Le domaine SCP2 est un dimère formé de 5 hélices  $\alpha$  et de 5 feuillets  $\beta$ , avec une **cavité hydrophobe** dont le plancher est constitué par les feuillets  $\beta$  et les parois formées par les hélices  $\alpha$ . La géométrie et la taille de la cavité sont en cohérence avec **la liaison des intermédiaires lipidiques** de la biosynthèse de l'ubiquinone.

## Méthodes et expertises

- Cultures cellulaires : bactéries (*E. coli*)
- Clonage, expression de protéines recombinantes procaryotes ou eucaryotes, mutagénèse dirigée, purification de protéines
- Enzymologie (steady-state et pre-steady-state : stopped-flow)
- Spectroscopies optiques (UV-visible, fluorescence)
- Caractérisation de produits de métabolisme par spectrométrie de masse
- Etude cristallographique de protéines

## Collaborations principales

- Fabien Pierrel, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UMR 5163, CNRS, UJF-Grenoble
- Frédéric Barras, Laboratoire de Chimie Bactérienne, UPR 9043, CNRS, Marseille

## Publications

A soluble metabolon synthesizes the isoprenoid lipid ubiquinone.

Hajj Chehade M, Pelosi L, **Fyfe C**, Loiseau L, Rascalou B, Brugière S, Kazemzadeh K, **Vo CDT**, Aussel L, Couté Y, Ciccone, L, **Fontecave M**, Barras F, **Lombard M**, Pierrel F.

Submission.

The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ.

Loiseau L, **Fyfe C**, Aussel L, Hajj Chehade M, Hernández SB, **Faivre B**, **Hamdane D**, **Mellot-Draznieks C**, Rascalou B, Pelosi L, Velours C, Cornu D, **Lombard M**, Pierrel F, **Fontecave M**, Barras F.

J Biol Chem. 2017 Jul 14;292(28):11937-11950

Coenzyme Q Biosynthesis: Evidence for a Substrate Access Channel in the FAD-Dependent

Monooxygenase Coq6. Ismail, A., Leroux, V., Smadja, M., Gonzalez, L., **Lombard, M.**, Pierrel, F. Mellot-Draznieks, Fontecave, M. PLoS Comput Biol 2016 Jan ; 12(1) :e1004690.

Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. Aussel L, Pierrel F, Loiseau L, **Lombard M**, **Fontecave M**, Barras F. Biochim Biophys Acta. 2014 Jul ;1837(7):1004-11.

ubiJ, a new gene required for aerobic growth and proliferation in macrophage, is involved in coenzyme Q biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Aussel L, Loiseau L, Hajj Chehade M, Pocachard B, **Fontecave M**, Pierrel F, Barras F. J Bacteriol. 2014 Jan, 196(1):70-9.

ubil, a new gene in *Escherichia coli* coenzyme Q biosynthesis, is involved in aerobic C5-hydroxylation.

Hajj Chehade M, Loiseau L, **Lombard M**, **Pecqueur L**, **Ismail A**, **Smadja M**, **Golinelli-Pimpaneau B**,

**Mellot-Draznieks C**, Hamelin O, Aussel L, Kieffer-Jaquinod S, Labessan N, Barras F, **Fontecave M**, Pierrel F. J Biol Chem. 2013 Jul; 288(27):20085-92.

Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. Xie LX, Ozeir M, Tang JY, Chen JY, Jaquinod SK, **Fontecave M**, Clarke CF, Pierrel F. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23571-81

Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. Ozeir M, Mühlenhoff U, Webert H, Lill R, **Fontecave M**, Pierrel F. Chem Biol. 2011 Sep 23;18(9):1134-42.

Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Mühlenhoff U, Ozeir M, Lill R, **Fontecave M**. Chem Biol. 2010 May 28;17(5):449-59.