

# Informe final publicable de proyecto

## Rodoquinona: ¿un transportador de electrones de respuesta a hipoxia, sulfuro y cianuro?

Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2020\_1\_162629

17/10/2023

**ROMANELLI CEDREZ, Laura** (Responsable Técnico - Científico)

**COMAS GUIERRA, Rosina** (Investigador)

**PASTORINO ABALOS, Valeria Romina** (Investigador)

**SALINAS GRECCO, Gustavo** (Investigador)

**VAIROLETTI TABORDA, Franco** (Investigador)

---

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

## Resumen del proyecto

Animales en hipoxia o anoxia requieren un mecanismo de obtención de energía sin oxígeno. Una adaptación bioquímica a la hipoxia en algunos animales involucra una cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM) alternativa, donde la rodoquinona (RQ) sustituye a la ubiquinona (UQ) como transportador de electrones lipídico y el fumarato reemplaza al oxígeno como aceptor final.

En *C. elegans*, nuestros resultados sugieren que la RQ no es esencial en las condiciones de hipoxia estudiadas, planteando un posible rol adicional. Este gusano se enfrenta a altas concentraciones de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y bacterias patógenas que producen cianuro de hidrógeno (HCN). Tanto el H<sub>2</sub>S como el HCN inhiben el complejo-IV de la CTEM canónica. Por lo tanto, la RQ podría defender al gusano contra estos compuestos tóxicos. En este trabajo, observamos que estirpes mutantes sin RQ no sobreviven con altas concentraciones de H<sub>2</sub>S y son más sensibles a *Pseudomonas aeruginosa* PA01, que produce HCN. Esto sugiere un nuevo rol de la RQ en la protección del organismo contra el envenenamiento.

Un mecanismo de eliminación del H<sub>2</sub>S conocido implica la CTEM y la enzima SQR (SQRD-1 en *C. elegans*), que oxida el H<sub>2</sub>S y entrega electrones a la UQ. Proponemos que la RQ actúe como aceptor de electrones de la SQR y los ceda al fumarato por la CTEM alternativa.

*C. elegans* tiene un gen homólogo a SQRD-1, Y9C9A.16, considerado previamente como pseudogen. Nuestros resultados indican que Y9C9A.16 codifica una enzima relevante en la respuesta al H<sub>2</sub>S, y que SQRD-1 y Y9C9A.16 podrían actuar secuencialmente.

Por último, determinamos que el gen *rips-1* está involucrado en la respuesta al H<sub>2</sub>S, posiblemente como regulador negativo de la proteína RHY-1 mediante metilación. Finalmente, con nuestros resultados y estudios previos, proponemos un modelo de mecanismo molecular de respuesta del organismo en presencia de H<sub>2</sub>S.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología redox/Metabolismo**

**Palabras clave: Rodoquinona / Sulfuro / *Caenorhabditis elegans* /**

## Introducción

Nota: aquí planteamos Antecedentes, abordaje y descripción tal como fueron explicitados en la propuesta original.

En los helmintos, la principal forma de obtención de energía en hipoxia involucra una cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial alternativa a la canónica, en la cual la rodoquinona (RQ) es el componente clave y el fumarato el aceptor final de electrones[1–3]. La RQ es el transportador alternativo de electrones en la CTE en hipoxia y difiere de la ubiquinona (UQ) en un grupo sustituyente del anillo benzoquinona (Anexo-Fig.1). La presencia del grupo amino(RQ) en lugar del grupo metoxi(UQ) afecta el potencial redox estándar de la quinona (RQ: -63 y UQ: +100 mV). Este potencial redox permite que la RQ pueda ser reducida por el NADH (mediante el complejo-I) y reducir al fumarato (mediante el complejo-II). Así, el complejo-II de la CTE funciona en la dirección contraria a la convencional[3,4](Anexo-Fig.1). Interesantemente, en esta CTE abreviada, el complejo-I bombea H<sup>+</sup> de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana permitiendo acoplar la síntesis de ATP al gradiente protomotriz(Anexo-Fig.1).

La RQ está presente en bacterias, protistas y dentro de los animales se ha descrito en nematodos, platelmintos, moluscos y anélidos[5]. En bacterias y protistas, pero no en helmintos, la RQ deriva de la UQ[6,7]. Recientemente demostramos que la biosíntesis de RQ en *C. elegans* requiere precursores que derivan del catabolismo del triptófano a través de la vía de la kinurenina(Anexo-Fig.2). En paralelo con otro grupo de investigación, se demostró que la enzima kinureninasa (KYNU-1) es esencial para la síntesis de RQ, pero no de UQ[8,9]. KYNU-1 cataliza la formación de antranilato y 3-hidroxiantranilato a partir de kinurenina y 3-hidroxikinurenina, respectivamente[10](Anexo-Fig.2). Más allá de la RQ, KYNU-1 es una enzima clave de la vía de la kinurenina que conecta el metabolismo del triptófano con el del NAD[11] y está presente en animales que no sintetizan RQ. El punto clave que permite que algunos linajes sintetizen RQ y otros no, se encuentra en el paso de poliprenilación del precursor de las quinonas[12].

En la síntesis de UQ, el primer paso involucra a la polipreniltransferasa COQ-2, una proteína de membrana que cataliza la adición del sustituyente poli-isoprenoide al ácido 4-hidroxibenzoico(Anexo-Fig.2). Recientemente, identificamos que sólo los organismos que sintetizan RQ tienen dos isoformas de COQ-2 (COQ-2a y COQ-2e), las cuales derivan del splicing alternativo de dos exones mutuamente excluyentes[12]. El exón específico de COQ-2e (exón 6e) sólo se encuentra en las especies que sintetizan RQ. La estirpe de *C. elegans* mutante en dicho exón (de ahora en adelante referida como *coq-2D6e*) no sintetiza

RQ y sí UQ; lo contrario ocurre con la estirpe mutante que carece del exón específico de COQ-2a (coq-2D6a)[12]. Así, estas variantes de COQ-2 son la clave en la discriminación de la biosíntesis de RQ o UQ.

En organismos que enfrentan condiciones de hipoxia o anoxia en alguna etapa de su ciclo de vida, por ejemplo helmintos que habitan el intestino de un hospedero o moluscos, que quedan sumergidos en agua según las mareas, necesitan obtener energía sin utilizar oxígeno y la RQ es crucial en estas condiciones[13]. A diferencia de los helmintos, *C.elegans* no enfrenta condiciones de hipoxia obligadas durante su ciclo de vida. No obstante, se ha especulado que el estadio larva Dauer, de resistencia a condiciones adversas, tiene un bajo consumo de oxígeno y no lo utilizaría como aceptor final de electrones[14]. Esto plantea la pregunta clave de este proyecto: ¿Cuál es la función de la RQ en *C.elegans*? Es importante señalar que este organismo puede encontrarse con bacterias patógenas, algunas de las cuales causan la muerte del gusano mediante la generación de ácido cianhídrico (HCN) y sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), ambos compuestos inhibidores del complejo-IV de la CTE[15,16]. En este contexto, nos preguntamos si una función de la RQ en *C. elegans* podría estar vinculada a la defensa del organismo frente a HCN y H<sub>2</sub>S. Consistente con esta idea, la estirpe mutante coq-2D6e no puede recuperarse luego de una exposición a concentraciones elevadas de HCN comparado con la estirpe silvestre[9]. Nuestros resultados previos indican que este mutante es hipersensible al H<sub>2</sub>S a diferencia del organismo silvestre y del mutante coq-2D6a (resultados no publicados, Anexo-Fig.3). Esto sugiere un posible rol de RQ en la protección del gusano por envenenamiento con estos compuestos producidos por algunos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*.

El H<sub>2</sub>S es una molécula producida endógenamente en células animales que a concentraciones fisiológicas tiene roles en la señalización celular[17], por lo que concentraciones elevadas, además de inhibir la CTE canónica, desregulan su función en la señalización[17,18]. El mecanismo esencial de detoxificación de H<sub>2</sub>S involucra su oxidación en la mitocondria. Interesantemente, la primera enzima de esta vía es la sulfuro-quinona oxidoreductasa (SQR), que oxida el H<sub>2</sub>S y reduce la UQ[19](Anexo-Fig.4A). Este mecanismo de transformación del H<sub>2</sub>S en compuestos menos tóxicos también favorece la detoxificación de HCN. En *C.elegans* la metabolización de HCN involucra a la enzima CYSL-2 que cataliza la transformación de HCN y cisteína en H<sub>2</sub>S y beta-cianoalanina(Anexo-Fig.4C). Si la SQR utilizara RQ en lugar de UQ, la detoxificación de H<sub>2</sub>S y HCN sería más eficiente, ya que la CTE alternativa no es inhibida por dichos compuestos.

En *C. elegans*, la respuesta al H<sub>2</sub>S está coordinada por dos vías de señalización celular: una que depende del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) y otra que depende del factor de transcripción SKN-1. La primera ha sido descrita en detalle y se sabe que HIF-1 aumenta la expresión de SQR en respuesta a H<sub>2</sub>S. La vía de respuesta regulada por SKN-1 no se comprende completamente, no obstante se propone como esencial a la proteína RHY-1. En la presente propuesta se espera entender cabalmente en *C.elegans* la función del transportador RQ y sus mecanismos moleculares en la defensa del organismo frente a compuestos naturales tóxicos y/o durante su estadio Dauer. La comprensión de estos mecanismos en *C. elegans* podrían ser extrapolables a otros organismos, como los helmintos parásitos. Más globalmente, otros organismos con RQ como anélidos marinos y moluscos habitan ambientes ricos en sulfuro, abriendo posibilidades de repensar una nueva función clave de la RQ, quizás ancestral.

Descripción: El proyecto propone avanzar en el estudio del rol de la RQ en la detoxificación de H<sub>2</sub>S y HCN y en la defensa del organismo frente a patógenos en *C.elegans*. Más allá de *C.elegans*, otros organismos que sintetizan RQ están expuestos a este tipo de sustancias potencialmente tóxicas; por ejemplo, gusanos parásitos con estadios del ciclo de vida que habitan en el intestino de sus hospederos mamíferos, ambientes con altas concentraciones de H<sub>2</sub>S debido a las bacterias de dichos órganos[20]. Adicionalmente, algunos anélidos y moluscos también habitan en condiciones con alto sulfuro[21,22]. Por lo tanto estudiar el rol de la RQ en la detoxificación aborda una nueva función para este transportador de electrones conservado en linajes diversos. Diferentes estudios describen en detalle el mecanismo de detoxificación de H<sub>2</sub>S. Este compuesto, generado endógenamente o proveniente del ambiente, es oxidado secuencialmente a sulfato en la mitocondria. La primera enzima de esta vía es la sulfuro-quinona oxidoreductasa (SQR), que oxida al H<sub>2</sub>S y transfiere los electrones a la ubiquinona (UQ) y la UQ reducida se vuelve a oxidar transfiriendo los electrones al complejo-III de la CTE[19](Anexo-Fig.4A). Esta capacidad de detoxificar es limitada, ya que el H<sub>2</sub>S inhibe la CTE a nivel del complejo-IV. Nuestra hipótesis es que la RQ funciona en la detoxificación de H<sub>2</sub>S como aceptor de electrones, catalizado por la SQR(Anexo-Fig.4B). La SQR convencional oxida H<sub>2</sub>S y reduce UQ, usando FAD como cofactor. El potencial de reducción del FAD unido a SQR es, aproximadamente, -123 mV[19], por lo tanto teóricamente es posible que se transfieran los electrones desde la SQR a la RQ. La ventaja de usar RQ y no UQ en condiciones de alto H<sub>2</sub>S sería poder transferir los electrones desde RQ reducida al fumarato, ya que la CTE convencional estaría inhibida por el H<sub>2</sub>S, y el potencial redox de la UQ no permite la reducción del fumarato. Esta detoxificación del H<sub>2</sub>S permitiría además una detoxificación eficiente de HCN, ya que éste metabolito (y cisteína) en *C.elegans* es convertido en H<sub>2</sub>S y beta-cianoalanina por la enzima CYSL-2(Anexo-Fig.4C). Por lo tanto, frente a una intoxicación por HCN y H<sub>2</sub>S la RQ conferiría una ventaja. Para determinar si el rol de la RQ en la respuesta al H<sub>2</sub>S se debe a una función dependiente o independiente de SQR, se generarán organismos dobles mutantes sin el exón 6e de coq-2 (coq-2D6e, estirpe que no sintetiza RQ) y sin el gen sqrd-1 y se evaluará la supervivencia en H<sub>2</sub>S. Existen varias

estructuras cristalográficas de SQR de diferentes organismos, y en algunos casos con la UQ unida[23,24]. Estas estructuras se utilizarán para analizar mediante modelos estructurales, generados por homología, la posible interacción de la RQ en el sitio de unión de la UQ de la SQR cristalizada y en modelos de la SQR de *C.elegans*. La vía de señalización de respuesta al H<sub>2</sub>S ha sido ampliamente estudiada en *C.elegans* y se ha demostrado que el factor de transcripción HIF-1 es esencial en la respuesta al HCN y H<sub>2</sub>S[15]. HIF-1 es responsable de la expresión génica en respuesta a diferentes tipos de estrés (hipoxia, H<sub>2</sub>S, HCN, ROS)[25,26]. La regulación de la actividad de HIF-1 involucra a la prolil-hidroxilasa EGL-9[27]. En condiciones normales, HIF-1 es hidroxilado por EGL-9 y marcado así para su degradación en el proteosoma. En presencia de determinados agentes de estrés, EGL-9 se inactiva permitiendo así la translocación de HIF-1 al núcleo y la regulación de la transcripción de sus genes blanco[27,28]. La exposición de gusanos a concentraciones de H<sub>2</sub>S no letales activa HIF-1 resultando en la regulación de los genes de respuesta al H<sub>2</sub>S y esta activación involucra a la proteína CYSL-1[15,29]. En *C.elegans* CYSL-1 es una proteína de transducción de señal; en presencia de H<sub>2</sub>S, CYSL-1 se une directamente a EGL-9 resultando en la estabilización de HIF-1 y finalmente en la transcripción de los genes de respuesta al H<sub>2</sub>S[15,30], entre los que se encuentra el gen que codifica para la SQR (en *C.elegans* *sqrd-1*)[15](Anexo-Fig.5). Está descrito otro mecanismo de detoxificación de H<sub>2</sub>S independiente de HIF-1 y dependiente SKN-1. En *C.elegans* SKN-1 juega un rol importante en la respuesta a patógenos, al estrés redox y a xenobióticos[31]. SKN-1 es regulado negativamente por la proteína WDR-23. En condiciones normales, WDR-23 “marca” a SKN-1 para su degradación en proteosoma y en presencia de estrés, WDR-23 se inactiva y SKN-1 regula la expresión de sus genes blanco de respuesta al estímulo recibido[17]. En condiciones de H<sub>2</sub>S, SKN-1 aumenta la expresión de *rhy-1*. Si bien *rhy-1* también es regulado por HIF-1, en base a experimentos genéticos, se propone que RHY-1 es necesario y suficiente para la detoxificación de H<sub>2</sub>S independiente de HIF-1 y SQR[17]. WDR-23 y EGL-9 son reguladores de las dos vías involucradas en la respuesta al H<sub>2</sub>S. Con la estirpe doble mutante *sqrd-1, coq-2D6e*, se evaluará la supervivencia en H<sub>2</sub>S interfiriendo la expresión de los genes *wdr-23* y *egl-9* de forma independiente. La interferencia de la expresión de *wdr-23* y *egl-9* en la estirpe silvestre conduce a una mayor resistencia al H<sub>2</sub>S dado la activación constitutiva de SKN-1 y HIF-1, respectivamente, y sólo la vía de HIF-1 induce la expresión de la SQR[17]. Así, si la resistencia al H<sub>2</sub>S dada por la RQ es debida solamente a la SQR entonces sólo se observará resistencia al H<sub>2</sub>S del doble mutante. En suma, se busca comprender la función de la RQ en *C.elegans*, hasta ahora descrito con un rol esencial en la obtención de energía en hipoxia. Resultados previos, indican que la RQ no sería esencial en hipoxia y anoxia, y sí en condiciones de H<sub>2</sub>S y HCN. Dado que H<sub>2</sub>S y HCN son producidos por patógenos de *C.elegans*, la RQ podría ser clave en la respuesta a patógenos. En este contexto, se abordará el estudio del mecanismo por el cual la RQ está cumpliendo esta nueva función de defensa a condiciones estresantes de H<sub>2</sub>S y HCN. Finalmente, utilizando el mutante *coq-2D6e*, determinaremos si es esencial para el estadio Dauer, estadio que estaría sujeto a hipoxia.

### Metodología/diseño del estudio

Se plantea la metodología/diseño de la propuesta original. Aspectos en lo que alguna metodología/diseño fue incorporada/o cambiada/o durante el curso del estudio lo incluimos, como NOTA.

Diseño de investigación y metodología:

Como se describe en los antecedentes y descripción del proyecto, a partir de los resultados obtenidos con la estirpe de *C.elegans* que no sintetiza rodoquinona (RQ) (estirpe *coq-2(syb1721)*, referida como *coq-2D6e*) en presencia de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y ácido cianhídrico (HCN)(Anexo-Fig.3), se propone un rol clave de la RQ en la metabolización de dichos compuestos, disminuyendo así la toxicidad. Siguiendo en esta línea, se cuantificará RQ en la estirpe silvestre en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>S y HCN. Concentraciones de 1.5 mM de H<sub>2</sub>S durante 16 horas y 150 uM 15 horas en HCN[12] son letales para gusanos que no sintetizan RQ (*coq-2D6e*), pero no para la estirpe silvestre, por lo tanto se utilizará dicha condición para realizar estos experimentos. La detección de RQ se realizará en colaboración con la Dra. Jennifer Shepherd, (Gonzaga University), quien tiene optimizada la detección de RQ y UQ por HPLC-MRM. La preparación y lisis de gusanos, y la extracción de lípidos totales para la detección de quinonas se realizarán de acuerdo a procedimientos ya optimizados incluyendo un estándar interno de UQ3 para la cuantificación precisa de RQ[8]. El cultivo de gusanos se realiza como se indica en [32], brevemente los gusanos se crecen en placas de Petri con el medio NGM (Nematode growth media) y un césped de bacterias *Escherichia coli* que se utiliza como alimento. En medio líquido los gusanos nadan y pueden cultivarse agregando bacterias y suplementos al medio líquido. Con el objetivo de determinar el rol de la RQ en la defensa de *C.elegans* frente a bacterias patógenas, se expondrá la estirpe silvestre y estirpe mutante *coq-2D6e* (que no sintetiza RQ) al patógeno *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Dicho experimento se realizará siguiendo el protocolo ya optimizado en las referencias [33,16]. NOTA: Este experimento no se pudo reproducir. No obtuvimos los resultados esperados con la estirpe silvestre. Por lo tanto se modificó el abordaje seguido. Esta actividad se realizó utilizando el WMcrotracker exponiendo los gusanos de las distintas estirpes al cultivo de bacterias de *P. aeruginosa* PA01. Como control se utilizó sólo el medio de cultivo (KingB) y la bacteria *E. coli* OP50 crecida en el mismo medio de cultivo.

El estudio del posible rol de la RQ recibiendo electrones provenientes del H<sub>2</sub>S a través de la enzima sulfuro-quinona oxidoreductasa (SQR), se realizará mediante un abordaje genético haciendo uso de mutantes, disponibles en nuestro laboratorio. Ha sido reportado que mutantes en el gen *sqrd-1* (*sqrd-1(tm3378)*, mutante con una delección en el gen *sqrd-1* que resulta en pérdida de función) mueren en presencia de bajas concentraciones de H<sub>2</sub>S (1.5 mM) [17,15,34]. Por otro lado, la estirpe *sqrd-1(tm3378)* con interferencia de la expresión del gen *egl-9* (*sqrd-1(tm3378)*, ARNi\_egl-9), en presencia de H<sub>2</sub>S son más resistentes que el mutante *sqrd-1(tm3378)* sin interferir [15]. Esto indica que existe un mecanismo dependiente de HIF-1 e independiente de SQR que detoxifica H<sub>2</sub>S. Se generará la estirpe doble mutante en *sqrd-1* y *coq-2D6e* (*sqrd-1(tm3378)*, *coq-2D6e*), mediante el cruce de las estirpes mutantes simples antes mencionadas y se estudiará la supervivencia de la misma en presencia de H<sub>2</sub>S. Utilizando concentraciones de H<sub>2</sub>S no letales para el mutante en *sqrd-1(tm3378)*, si la estirpe doble mutante es más sensible que el simple mutante, se puede inferir que la RQ estaría participando en un mecanismo adicional a la SQR. Además se realizará la interferencia del gen *egl-9* en la estirpe doble mutante (*sqrd-1(tm3378)*, *coq-2D6e*, ARNi\_egl-9) y se evaluará la sensibilidad de dicho organismo en presencia de 1.5 mM de H<sub>2</sub>S. Si el organismo *sqrd-1(tm3378)*, *coq-2D6e*, ARNi\_egl-9 frente a 1.5 mM de H<sub>2</sub>S se comporta igual que el simple mutante interferido, indicaría que la RQ sólo participa en el mecanismo de detoxificación dependiente de HIF-1 y SQR. Como se mencionó anteriormente, en *C. elegans* se ha descrito un mecanismo de detoxificación de H<sub>2</sub>S independiente de HIF-1 y regulado por SKN-1. Para abordar un posible rol de la RQ en esta vía, se realizará un abordaje análogo al descrito en el punto anterior. Horsman et. al 2019, describe que la interferencia del gen *wdr-23* en la estirpe *sqrd-1(tm3378)*, en presencia de H<sub>2</sub>S son más resistentes que la estirpe sin interferir. Por lo tanto, se realizará la interferencia de *wdr-23* en la estirpe doble mutante *sqrd-1(tm3378)*, *coq-2D6e* y se evaluará la supervivencia en H<sub>2</sub>S en comparación con el organismo *sqrd-1(tm3378)* interferido. La interferencia por ARN se realizará mediante la alimentación de los gusanos con bacterias (*E. coli* HT115) que expresan el ARN doble hebra de la secuencia blanco de interés. Existe una biblioteca con bacterias *E. coli* HT115 para la interferencia de la mayoría de los genes de *C. elegans* disponibles para toda la comunidad científica. Se solicitará las clonas para la interferencia de *egl-9* y *wdr-23*. Las estirpes serán examinadas frente a H<sub>2</sub>S en un formato de ensayo en placa de 96 pocillos, utilizando el equipo WMicrotracker ONE (Phylumtech), que cuantifica el movimiento de los gusanos en medio líquido por el tiempo deseado [35]. Como se mencionó anteriormente, los gusanos en medio líquido nadan, y la disminución de la movilidad se correlaciona con la muerte de los mismos y luego la mortalidad se corrobora mediante la observación bajo la lupa.

NOTA: las actividades de interferencia de los genes *wdr-23* y *egl-9* sobre los organismos simples mutantes y doble mutante se desestimó. En la sección Actividades y Objetivos, se detalla la justificación. Brevemente, el resultado obtenido con la estirpe mutante en SQRD-1 en presencia de sulfuro no fue análoga a la reportada previamente. La estirpe mutante es mas sensible que la estirpe silvestre, pero recupera el movimiento cuando el sulfuro disminuye. Adicionalmente, por análisis de secuencia encontramos la existencia de una presunta segunda SQR (que nosotros nos referimos como SQRD-2). Adicionalmente, se describió un nuevo gen que podría estar vinculado en la vía de respuesta al sulfuro que involucra a RHY-1, rips-1. Por lo tanto, se resolvió estudiar el rol de estos genes "nuevos" en la respuesta al sulfuro. La metodología fue la misma que anteriormente (cuantificación de motilidad con WMicrotracker).

En paralelo con los estudios genéticos, se realizará el modelado de la SQR con la RQ utilizando estructuras cristalográficas de la SQR de diferentes organismos con alta similitud con la SQRD-1 de *C. elegans*. La posibilidad de que la SQR acepte RQ como sustrato puede estudiarse estimando la afinidad con metodologías de docking y dinámica molecular. Esta aproximación permitiría también localizar aquellos residuos involucrados en la interacción con la quinona y estudiar posibles diferencias entre organismos capaces de producir RQ y aquellos que sólo cuentan con UQ. Para estos estudios estructurales in silico de la SQR de *C. elegans*, con RQ como sustrato, se plantea la generación de modelos por homología a partir de las estructuras de SQR depositadas en PDB, utilizando Modeller [36], i-Tasser [37], Phyre2 [38], MOE [39], y Swiss-Model [40]. La calidad de los modelos generados será evaluada mediante inspección visual y utilizando herramientas computacionales (ProCheck [41], MolProbity [42], QMean [43]). Aquellos modelos satisfactorios serán seleccionados en la etapa de docking molecular, utilizando un protocolo previamente validado para reproducir las poses cristalográficas de las quinonas co-cristalizadas con SQR disponibles. Los complejos SQR-quinona generados serán sometidos a corridas de dinámica molecular para verificar su estabilidad. NOTA: También se realizó este estudio utilizando la secuencia de la SQRD-2 (Y9C9A.16). En el caso de confirmarse que la RQ participe en la detoxificación de H<sub>2</sub>S con la SQR, se abordará la puesta a punto de ensayos para medir la actividad enzimática SQR. Hay varios protocolos para medir dicha actividad utilizando a la UQ y H<sub>2</sub>S como aceptor y dador de electrones, respectivamente. Inicialmente planteamos medir esta actividad utilizando extractos mitocondriales de la estirpe mutante *coq-2D6e* y la estirpe silvestre. Cabe resaltar que es un procedimiento que no tenemos puesto a punto en el laboratorio, y que la obtención de grandes cantidades de mitocondrias no es sencilla. Además, la realización de estos experimentos utilizando la enzima recombinante no son simples: se trata de una enzima de membrana y no se comercializa RQ, que sería necesaria para el ensayo enzimático. Dado el relevante

rol de HIF-1 y SKN-1 en la respuesta a H<sub>2</sub>S y el amplio número de genes blanco cuya expresión regulan, se evaluará si la expresión del gen *coq-2* es regulada por alguno o ambos factores de transcripción. Mediante RT-PCR cuantitativa se cuantificará las isoformas de *coq-2* en mutantes con ganancia de función de *skn-1* y *hif-1* (mutantes con SKN-1 y HIF-1 activos constitutivamente). Por último, para terminar de esclarecer un posible rol de RQ frente a baja tensión de oxígeno en *C. elegans*, proponemos estudiar la larva Dauer en la estirpe que no sintetiza RQ (*coq-2D6e*). La larva Dauer es un estadio de resistencia en el cual el organismo puede permanecer durante meses interrumpiendo el desarrollo. El ciclo de vida de *C. elegans* posee 4 estadios larvarios y el adulto, y en determinadas condiciones estresantes (por ejemplo alta temperatura o falta de comida) la larva L1 ingresa en el estadio de larva Dauer en el cual el animal no se alimenta, la cutícula se vuelve más impermeable y el consumo de oxígeno disminuye[14]. Como se describió antes, la estirpe *coq-2D6e* en hipoxia y anoxia se comporta igual que la estirpe silvestre. Estos experimentos se realizaron utilizando adultos y larvas excepto Dauer. Para determinar si la estirpe *coq-2D6e* en condiciones estresantes muda a Dauer y sobrevive, se aislarán estas larvas de placas con al menos 8 días sin comida y luego se analizará la salida del estadio (con presencia de alimento) a diferentes periodos de tiempo. El aislamiento de este estadio involucra un procedimiento utilizando una solución con 1% de SDS[44]. Estas actividades se realizarán en el marco de una pasantía en el laboratorio de la Dra. Andrea Calixto, cuya línea de investigación principal involucra el trabajo con Dauer. Más allá del estudio específico del rol de la RQ en Dauer, consideramos importante adquirir experiencia en el manejo de este estadio que requiere condiciones ambientales y manipulación muy precisa. NOTA: En lugar de utilizar la estirpe mutante *coq-2D6e*, se utilizó la estirpe mutante *kynu-1(tm4924)*, la cual no sintetiza RQ, y su comportamiento es igual al *coq-2D6e* en condiciones de hipoxia y anoxia. El estadio de larva Dauer se estudió utilizando los mutantes en *daf-7* y *daf-2* y generando los dobles mutantes *daf-7(e1372);kynu-1(tm4924)* y *daf-2(e1368);kynu-1(tm4924)*. Dichas estirpes se evaluaron respecto a su resistencia a SDS 1% y se cuantificó los lípidos mediante tinción con Oil Red O. Esta pasantía se realizó en el laboratorio del Dr Daniel Hochbaum (en la universidad de Maimónides), quien dirige un laboratorio que se centra en el estudio de diversos aspectos del desarrollo en la larva Dauer.

## Resultados, análisis y discusión

*C. elegans* posee dos SQR: SQRD-1 y SQRD-2. Tanto SQRD-1 como SQRD-2 tienen un rol en la respuesta al H<sub>2</sub>S.

Mediante análisis de secuencias, adicionalmente a la SQRD-1, encontramos otro gen de *C. elegans* (Y9C9A.16) con alta homología con la SQR de humanos (*sqrd-2* de ahora en adelante). Este segundo gen, fue previamente descrito como un pseudogen y sin función relacionada al H<sub>2</sub>S.

Estirpes mutantes en *sqrd-1* y *sqrd-2* se expusieron a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>S en medio líquido y se cuantificó la motilidad de los gusanos. Como resultado se obtuvo que la estirpe mutante *sqrd-1(tm3378)* inicialmente disminuye su motilidad al igual que la estirpe silvestre, sin embargo, la recuperación de la motilidad cuando la concentración de H<sub>2</sub>S disminuye es más lenta que en la estirpe silvestre(Figura 1a). Finalmente alcanza el nivel de motilidad inicial, al igual que la estirpe silvestre. Por otro lado, la estirpe mutante en *sqrd-2*, tempranamente disminuye su motilidad a niveles menores que la estirpe silvestre y luego se recupera de forma similar al silvestre(Figura 1b).

Los resultados obtenidos indican que, además de la SQRD-1 previamente descrita, también la SQRD-2 está involucrada en la respuesta del organismo al H<sub>2</sub>S, y se puede proponer que la relevancia de estas en los distintos momentos de contacto con el H<sub>2</sub>S no es igual. Los resultados sugieren que la SQRD-2 tiene un rol más relevante en un primer contacto con la condición estresante. La SQRD-1 en tanto, parece tener un rol más relevante a tiempos más posteriores (concretamente luego de 160-180 min en H<sub>2</sub>S).

Determinación de la variación de concentración de H<sub>2</sub>S en solución en función del tiempo, en el sistema utilizado.

Dado que el *WMicrotracker* es un sistema abierto, la concentración de H<sub>2</sub>S en solución disminuye con el tiempo. Por lo tanto, medimos la concentración de H<sub>2</sub>S en solución durante el curso temporal de los experimentos y determinamos que la concentración disminuye desde 0.5 mM a 0 mM en 2 horas, y desde 1.5 mM a 0 mM en 3 horas(Figura 2a-b).

Análisis *in silico* sugieren que la RQ y la UQ se unen con similar afinidad a SQRD-1 y a SQRD-2 en *C. elegans*.

Se realizó el modelado de SQRD-1 y de SQRD-2 de *C. elegans* utilizando como molde la estructura hSQR (PDB id:6oib/6oic). Se realizó el redocking de la UQ en el cristal 6oib. Como el cristal incluye la UQ, se comparó la pose predicha con la experimental usando como medida el RMSD (parámetro de distancia geométrica). En este, se espera que el docking haga caer el ligando a menos de 2 Ångstrom de RMSD de la pose experimental y como resultado se obtuvo un valor de 0.14 Ångstrom.

Se realizó la estimación de la afinidad de las dos quinonas por el sitio de unión de SQRD-1 y de SQRD-2. En estos experimentos, se determinó que las interacciones más importantes de los aminoácidos del sitio de unión de la proteína son con los C1 y C4 del anillo aromático de las quinonas (grupos carbonilo (forma oxidada), grupos hidroxilo (forma reducida)) y entre el anillo de las quinonas y una Alanina del sitio activo de la proteína. No se observó que el sustituyente que difiere

entre las quinonas (amino(RQ) y metoxi(UQ)) tenga una interacción clara en el sitio activo, lo cual sugiere que ambos sustratos puedan aceptarse en ambas SQRs.

La RQ es esencial para la supervivencia en H<sub>2</sub>S.

Dado que KYNU-1 es esencial para la síntesis de RQ, analizamos el mutante con pérdida de función *kynu-1(tm4924)* en respuesta al H<sub>2</sub>S. Esta estirpe fue significativamente más sensible al H<sub>2</sub>S, comparado con la estirpe silvestre; este mutante reduce su motilidad en comparación con la silvestre (Figura 4a-b). Es importante destacar, que casi ningún gusano *kynu-1(tm4924)* sobrevive luego de 180 minutos en H<sub>2</sub>S, mientras que la mayoría de los gusanos silvestres estaban vivos en las mismas condiciones. Por otro lado, el mutante nulo *clk-1(qm30)*, que no sintetiza UQ, fue más sensible que la estirpe silvestre, sin embargo, a diferencia del mutante *kynu-1(tm4924)*, cuando la concentración de H<sub>2</sub>S disminuye, la motilidad de *clk-1(qm30)* se recupera al igual que lo hace la estirpe silvestre (Figura 4a-b). Estos resultados indican que la RQ es más importante que la UQ para la respuesta al H<sub>2</sub>S. Resultados análogos fueron obtenidos con las estirpes mutantes en las isoformas de COQ-2 (COQ-2A y COQ-2E). La estirpe mutante con una delección en el exón 6e (*coq-2?6e*), un exón esencial para la síntesis de RQ es más sensible al H<sub>2</sub>S que la estirpe silvestre y que la estirpe mutante en la isoforma COQ-2a (*coq-2?6a*) deficiente en UQ).

Luego analizamos la estirpe mutante en el gen *kynu-1* en presencia de una atmósfera de H<sub>2</sub>S por 20 horas y cuantificamos el número de progenie por gusano. Como resultado se obtuvo que en presencia de H<sub>2</sub>S, el mutante *kynu-1(tm4924)* tiene un menor número de progenie que la estirpe silvestre la cual no se ve afectada por el H<sub>2</sub>S (Figura 5a-b). Adicionalmente, la expresión del alelo silvestre de *kynu-1* en la estirpe mutante *kynu-1(tm4324)* restaura el número de progenie en H<sub>2</sub>S, confirmando así el rol de KYNU-1 en la respuesta al H<sub>2</sub>S.

La RQ está involucrada en la respuesta del organismo a la bacteria patógena *P. aeruginosa* PAO1

En su ambiente natural, *C. elegans* se encuentra con altas concentraciones de H<sub>2</sub>S y HCN. Estos metabolitos pueden ser producidos por bacterias y ambos son inhibidores de la CTEM canónica, a nivel del complejo IV. La detoxificación de HCN en *C. elegans* involucra a la cianoalanina sintasa CYSL-2, la cual cataliza la conversión de HCN y cisteína en H<sub>2</sub>S y cianoalanina. De esta manera, CYSL-2 asimila el HCN producido por bacterias y media la resistencia del gusano a la infección. Por lo tanto, el uso de la RQ en el metabolismo del H<sub>2</sub>S también conferiría una ventaja en la respuesta del organismo a HCN y a la intoxicación por bacterias productoras de HCN. De hecho, el rol de la RQ en el metabolismo del HCN ya ha sido demostrado previamente. Por lo tanto, estudiamos las estirpes deficientes en RQ en respuesta a *P. aeruginosa* PAO1, una estirpe bacteriana que paraliza y mata al gusano mediante la producción de HCN (mecanismo denominado fast killing). Como resultado observamos una tendencia de la estirpe *kynu-1(tm4924)* a ser más sensible a la bacteria patógena que la estirpe silvestre (Figure 6a). Por otro lado, la estirpe mutante *clk-1(qm30)* se comporta de manera similar a la estirpe silvestre en las mismas condiciones (Figure 6b). Finalmente, si la exposición a la bacteria continua, la motilidad disminuye para todas las estirpes; esto indica que hay otro mecanismo involucrado, posiblemente el mecanismo conocido como slow killing (diferente fast killing por HCN) en el cual el gusano muere por infección bacteriana. Resultados análogos se obtuvieron con los mutantes en las isoformas de COQ-2; *coq-2?6e* fue más sensible a la bacteria PAO1 que las estirpes silvestre y *coq-2?6a*. Cabe mencionar que no hubo diferencias entre las estirpes de gusanos en presencia de la bacteria *Escherichia coli* OP50 (bacteria alimento del gusano) (Figura 7a-b). Estos resultados sugieren un rol de la RQ en la respuesta del organismo a la bacteria productora de HCN.

La RQ no cumple un rol en la respuesta a un estrés oxidante (paraquat) a diferencia de la UQ.

Actualmente aun es un tema de debate si el H<sub>2</sub>S genera un estrés oxidativo o un estrés reductor. Al mismo tiempo, hay un consenso respecto al rol antioxidante de la UQ. Por lo tanto, con el objetivo de estudiar un posible rol de la RQ en respuesta al estrés oxidativo, y conocer si RQ puede sustituir en todas las funciones a UQ, se estudió la respuesta de los mutantes deficientes en RQ en presencia de paraquat. Como era esperado, el mutante deficiente en UQ (*clk-1(qm30)*) resultó ser más sensible al paraquat que el silvestre. Sin embargo, los mutantes deficientes en RQ se comportaron de manera similar que la estirpe silvestre (Figura 8), sugiriendo que la RQ no estaría cumpliendo un rol en la defensa del organismo contra un estrés oxidante y que no todas las funciones relacionadas con la UQ pueden ser sustituidas con la RQ.

El estudio del rol de la RQ en presencia de DTT (estrés reductor), queda planteado como perspectiva.

La síntesis de RQ no aumenta en presencia de H<sub>2</sub>S o de HCN.

Para determinar si la síntesis de RQ es regulada en respuesta a los estímulos H<sub>2</sub>S o de HCN, se expusieron gusanos de la estirpe silvestre a concentraciones no letales de H<sub>2</sub>S o de HCN y se realizó una extracción de lípidos y cuantificación de RQ y UQ. Como resultado no se observó diferencias en la cantidad de quinonas entre los gusanos expuestos a H<sub>2</sub>S o HCN en comparación con las condiciones sin estresante (Figura 9a-b). Una posible explicación es que el nivel constitutivo de RQ ya haya sido evolutivamente optimizado para la detoxificación de H<sub>2</sub>S o HCN y que no sea necesaria la inducción de su síntesis, sino la de las proteínas que hacen uso de RQ, como la SQRD-1.

RHY-1 y RIPS-1 están involucrados en la respuesta al H<sub>2</sub>S y sus funciones tienen impacto en el fenotipo de motilidad a

diferentes tiempos de exposición al estrés.

Recientemente se identificó que el gen R08E5.3, está involucrado en la respuesta de *C. elegans* a compuestos reductores como por ejemplo el DTT y el beta-mercaptoetanol. Este gen codifica para una presunta metil-trasferasa. Como se menciona anteriormente, aún está en debate si el H<sub>2</sub>S genera un estrés reductor o un estrés oxidativo. En este marco, el gen R08E5.3 podría tener un rol relevante en respuesta al H<sub>2</sub>S. Paralelamente a las publicaciones antes referidas, otro grupo de investigación de forma independiente nombra al gen R08E5.3 como rips-1 (RHY-1-Interacting Protein in response to Sulfide). RHY-1 es una proteína vinculada a la respuesta al H<sub>2</sub>S en *C. elegans*: i) por un lado, se describe a RHY-1 como un regulador negativo del factor HIF-1 (RHY-1 regula negativamente a CYSL-1, y CYSL-1 en presencia de H<sub>2</sub>S favorece la activación de HIF-1 y el aumento de expresión de sus genes blanco, entre ellos la sqrd-1). ii) Por otro lado, RHY-1 participa en una vía alternativa de eliminación de H<sub>2</sub>S, independiente de HIF-1, en la cual se propone que en condiciones de H<sub>2</sub>S, el factor de transcripción SKN-1 aumenta la expresión de rhy-1, y este último es necesario y suficiente para la eliminación de H<sub>2</sub>S.

En este contexto, entendimos relevante e interesante el estudio de RIPS-1 y RHY-1 en la respuesta al H<sub>2</sub>S. Como resultado de la exposición a diferentes concentraciones de la estirpe mutante en rips-1 (rips-1(tm7111)) se observó que fueron más sensibles que la estirpe silvestre (Figura 10a-b).

Por otro lado, también evaluamos la respuesta de la estirpe mutante en rhy-1(ok1402) en condiciones de H<sub>2</sub>S. A diferencia de lo que ocurre en rips-1, y de manera similar a lo observado en el mutante en sqrd-2, en presencia de H<sub>2</sub>S la motilidad del mutante en rhy-1 cae significativamente más rápido que la estirpe silvestre, pero también se recupera hasta el nivel inicial más rápido que el silvestre (Figura 10c-d). Este resultado sugiere que RHY-1 tendría roles diferentes en distintos momentos de exposición al H<sub>2</sub>S: inicialmente es relevante para la resistencia del gusano al H<sub>2</sub>S y luego de aprox. 100 minutos en H<sub>2</sub>S, funcionaría como un regulador negativo del mecanismo de resistencia al H<sub>2</sub>S (esto explica que la estirpe silvestre, la cual tiene a RHY-1, demora más en recuperar la motilidad que el organismo deficiente en RHY-1).

La síntesis de quinonas no cambia en los mutantes en rhy-1 y rips-1.

Con el objetivo de determinar un posible rol de rhy-1 y rips-1 en la biosíntesis de la RQ y UQ, realizamos extracción de lípidos totales de los mutantes rhy-1(ok1402) y rips-1(tm7111) y se cuantificaron las quinonas. Como resultado no se observó un cambio significativo de cantidad de quinonas en los mutantes comparado con la estirpe silvestre (Figura 11). Estos resultados indican que ninguno de los dos genes tiene un rol directo en la cantidad de las quinonas en extractos de gusanos.

## Conclusiones y recomendaciones

Las conclusiones más importantes del presente proyecto se expresaron en la sección de resultados, análisis y discusión; son los subtítulos de cada sección de resultados.

Enumeración de conclusiones:

1- *C. elegans* posee dos SQR: SQRD-1 y SQRD-2. Tanto SQRD-1 como SQRD-2 tienen un rol en la respuesta al H<sub>2</sub>S.

Hay dos puntos importantes en los resultados obtenidos: 1) indican que sqrd-2 no sería un pseudogen, sino que codificaría para una enzima relevante en la respuesta a H<sub>2</sub>S, y 2) SQRD-1 y SQRD-2 podrían actuar secuencialmente en el tiempo.

2- Análisis in silico sugieren que la rodoquinona (RQ) y la ubiquinona (UQ) se unen con similar afinidad a SQRD-1 y a SQRD-2 en *C. elegans*.

A pesar de que el score de docking no es ideal para calcular la afinidad, por impreciso, se observa que no hay diferencias importantes entre una quinona y la otra y ninguna de las dos tienen un impedimento evidente para acomodarse en el sitio activo, tanto de SQRD-1 como de SQRD-2.

3- La RQ es esencial para la supervivencia en H<sub>2</sub>S.

Nuestros resultados indican que la RQ es requerida para la respuesta del organismo al "ahogo" por H<sub>2</sub>S, en tanto en esta respuesta la UQ no tiene la misma relevancia. En otras palabras, sin RQ los gusanos son mucho más sensibles al H<sub>2</sub>S que sin UQ.

4- La RQ está involucrada en la respuesta del organismo a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 productora de HCN.

5- La RQ no cumple un rol en la respuesta a un estrés oxidante (paraquat) a diferencia de la UQ, y por lo tanto no puede sustituir a la UQ en todas sus funciones.

6- La síntesis de RQ no aumenta en presencia de H<sub>2</sub>S o de HCN. RHY-1 y RIPS-1 están involucrados en la respuesta al H<sub>2</sub>S y sus funciones tienen impacto en el fenotipo de motilidad a diferentes tiempos de exposición al estrés.

7- La síntesis de RQ y UQ no cambia en los mutantes en los genes en rhy-1 y rips-1.

## Referencias bibliográficas

Referencias originales, presentadas al momento de la presentación de la propuesta.

1. Tielens AGM. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol Today*.1994;10: 346–352. doi:10.1016/0169-4758(94)90245-3
2. Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, Harada S, Kita K. Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: From parasites to cancer cells. *Biochim Biophys Acta – Gen Subj*.2012;1820: 643–651. doi:10.1016/j.bbagen.2011.12.013
3. Kita K, Nihei C, Tomitsuka E. Parasite Mitochondria as Drug Target: Diversity and Dynamic Changes During the Life Cycle. *Curr Med Chem*.2003;10: 2535–2548. doi:10.2174/0929867033456549
4. Ma YC, Funk M, Dunham WR, Komuniecki R. Purification and characterization of electron-transfer flavoprotein:rhodoquinone oxidoreductase from anaerobic mitochondria of the adult parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem*.1993;268: 20360–20365.
5. Tielens AGM, Van Hellemond JJ. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*.1998;1365: 71–78. doi:10.1016/S0005-2728(98)00045-0
6. Stairs C, Eme L, Munoz-Gómez A, Cohen G, Shepherd J, Fawcett J, et al. Microbial eukaryotes have adapted to hypoxia by horizontal acquisitions of a gene involved in rhodoquinone biosynthesis. *Elife*.2018; 1–23. doi:10.7554/eLife.34292
7. Brajcich BC, Iarocci AL, Johnstone LAG, Morgan RK, Lonjers ZT, Hotchko MJ, et al. Evidence that ubiquinone is a required intermediate for rhodoquinone biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*.2010;192: 436–445. doi:10.1128/JB.01040-09
8. Roberts Buceta PM, Romanelli-Cedrez L, Babcock SJ, Xun H, VonPaige ML, Higley TW, et al. The kynurenine pathway is essential for rhodoquinone biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*.2019;294: 11047–11053. doi:10.1074/jbc.AC119.009475
9. Del Borrello S, Lautens M, Dolan K, Tan JH, Davie T, Schertzberg MR, et al. Rhodoquinone biosynthesis in *C. elegans* requires precursors generated by the kynurenine pathway. *Elife*.2019;8: 1–21. doi:10.7554/elife.48165
10. van der Goot AT, Nollen EAA. Tryptophan metabolism: Entering the field of aging and age-related pathologies. *Trends Mol Med*.2013;19: 336–344. doi:10.1016/j.molmed.2013.02.007
11. Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*.2002;1: 609–620. doi:10.1038/nrd870
12. Tan JH, Lautens M, Romanelli-cedrez L, Wang J, Michael R. et al. Alternative splicing of COQ-2 determines the choice between ubiquinone and rhodoquinone biosynthesis in animals.2020; 1–30.
13. Muller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, et al. Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*.2012;76: 444–495. doi:10.1128/MMBR.05024-11
14. Calixto A. Life without Food and the Implications for Neurodegeneration [Internet]. *Advances in Genetics*. Elsevier Ltd; 2015. doi:10.1016/bs.adgen.2015.09.004
15. Budde MW, Roth MB. The response of *caenorhabditis elegans* to Hydrogen Sulfide and Hydrogen Cyanide. *Genetics*.2011;189: 521–532. doi:10.1534/genetics.111.129841
16. Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1999;96: 15202–15207. doi:10.1073/pnas.96.26.15202
17. Horsman JW, Heinis FI, Miller DL. A Novel Mechanism To Prevent H<sub>2</sub>S Toxicity in *Caenorhabditis elegans* . *Genetics*.2019;213: 481–490. doi:10.1534/genetics.119.302326
18. Mishanina T V., Libiad M, Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol*. 2015;11: 457–464. doi:10.1038/nchembio.1834
19. Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical Biology of H<sub>2</sub>S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev*. 2018;118: 1253–1337. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00205
20. Theissen U, Martin W. Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J*. 2008;275: 1131–1139. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06273.x
21. Lincoln Freese J, O'Clair CE. Reduced survival and condition of the bivalves *Protothaca staminea* and *Mytilus edulis* buried by decomposing bark. *Mar Environ Res*. 1987;23: 49–64. doi:10.1016/0141-1136(87)90016-X
22. Wang Y, Hekimi S. Understanding Ubiquinone. *Trends Cell Biol*. 2016;26: 367–378. doi:10.1016/j.tcb.2015.12.007
23. Cherney MM, Zhang Y, James MNG, Weiner JH. Structure-activity characterization of sulfide:quinone oxidoreductase variants. *J Struct Biol*. 2012;178: 319–328. doi:10.1016/j.jsb.2012.04.007
24. Landry AP, Moon S, Kim H, Yadav PK, Guha A, Cho US, et al. A Catalytic Trisulfide in Human Sulfide Quinone

- Oxidoreductase Catalyzes Coenzyme A Persulfide Synthesis and Inhibits Butyrate Oxidation. *Cell Chem Biol.* 2019;26: 1515–1525.e4. doi:10.1016/j.chembiol.2019.09.010
25. Budde MW, Roth MB. Hydrogen Sulfide Increases Hypoxia-inducible Factor-1 Activity Independently of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-1 in *C. elegans*. *Mol Biol Cell.* 2010;21: 4042–4056. doi:10.1091/mbc.E09.
26. Nguyen TL, Durán R V. Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;80: 71–80. doi:10.1016/j.biocel.2016.09.026
27. Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107: 43–54. doi:10.1016/S0092-8674(01)00507-4
28. Shao Z, Zhang Y, Powell-Coffman JA. Two distinct roles for EGL-9 in the regulation of HIF-1-mediated gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2009;183: 821–829. doi:10.1534/genetics.109.107284
29. Miller DL, Budde MW, Roth MB. HIF-1 and SKN-1 coordinate the transcriptional response to hydrogen sulfide in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2011;6: e25476. doi:10.1371/journal.pone.0025476
30. Ma DK, Vozdek R, Bhatla N, Horvitz HR. CYSL-1 interacts with the O<sub>2</sub>-sensing hydroxylase EGL-9 to promote H<sub>2</sub>S-modulated hypoxia-induced behavioral plasticity in *C. elegans*. *Neuron.* 2012;73: 925–40. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.037
31. Li WH, Chang CH, Huang CW, Wei CC, Liao VHC. Selenite enhances immune response against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 via SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2014;9: e105810. doi:10.1371/journal.pone.0105810
32. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974;77: 71–94. doi:10.1002/cbic.200300625
33. Gallagher LA, Manoel C. by Cyanide Poisoning. *Society.* 2001;183: 6207–6214. doi:10.1128/JB.183.21.6207
34. Romanelli-credrez L, Doitsidou M, Alkema MJ, Salinas G. HIF-1 Has a Central Role in *Caenorhabditis elegans* Organismal Response to Selenium. 2020;11: 1–11. doi:10.3389/fgene.2020.00063
35. Simonetta SH, Golombek DA. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods.* 2007;161: 273–280. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.11.015
36. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci.* 2016;54: 2.9.1-2.9.37. doi:10.1002/cpps.20.
37. Yang J, Yan R, Ambrish R, Dong X, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2015;12: 7–8. doi:10.1038/nmeth.3213
38. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10: 845–858. doi:10.1038/nprot.2015.053
39. Molecular Operating Environment (MOE). Montreal: Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7; 2015.
40. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 3381–3385. doi:10.1093/nar/gkg520
41. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr.* 1993;26: 283–291. doi:https://doi.org/10.1107/S0021889892009944
42. Chen VB, Arendall W, Headd J, Keedy D, Immormino R, Kapral G, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* 2010;66: 12–21. doi:10.1107/S0907444909042073
43. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics.* 2011;27: 343–350. doi:10.1093/bioinformatics/btq662
44. Caneo M, Julian V, Byrne AB, Alkema MJ, Calixto A. Diapause induces functional axonal regeneration after necrotic insult in *C. elegans*. *PLoS Genetics.* 2019. doi:10.1371/journal.pgen.1007863

## Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)