



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

Informe final publicable de proyecto

La mitocondria anaeróbica en helmintos

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155779

03/01/2023

SALINAS GRECCO, Gustavo (Responsable Técnico - Científico)

MCREYNOLDS, Melanie (Investigador)

COMAS GHIERRA, Rosina (Investigador)

BARRERA GUIASOLA, Exequiel Ernesto (Investigador)

MARTÍNEZ ROSALES, María Cecilia (Investigador)

PÓRFIDO, Jorge Luis (Investigador)

ROMANELLI CEDREZ, Laura (Investigador)

SHEPHERD, Jennifer (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DEL LITORAL, UDELAR \\
THE PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\ GONZAGA UNIVERSITY

Resumen del proyecto

El proyecto procuró entender cómo los gusanos parásitos que afectan a humanos, ganado y mascotas, obtienen energía en condiciones en las que hay poco oxígeno (hipoxia), como las que encuentran en el tracto gastrointestinal de sus hospederos mamíferos. En particular pretendimos entender qué adaptaciones bioquímicas permiten sobrevivir a estos organismos en condiciones de hipoxia, donde no pueden respirar convencionalmente, ya que el oxígeno es escaso. Nuestros resultados contribuyeron a la comprensión de estas adaptaciones. Concretamente, damos cuenta de que el uso en hipoxia del transportador de electrones rodoquinona permite optimizar una cadena de transporte de electrones alternativa donde los electrones no “mueren” en el oxígeno como ocurre en la respiración, sino en el fumarato. Además, establecemos qué mecanismo molecular permite la síntesis de ubiquinona (también conocida como Coenzima Q) transportador usado en la respiración (en presencia de oxígeno) o de rodoquinona (utilizado en ausencia de oxígeno).

Dado que establecimos que para la biosíntesis de la rodoquinona la vía de la quinurenina es esencial en helmintos, y que esta vía está incompleta en estos organismos, nos interesó saber si esta vía (que en mamíferos es responsable de la biosíntesis de NAD) es también capaz de sintetizar NAD en helmintos. El NAD es otro intercambiador esencial de electrones en todos los organismos vivos. Nuestros resultados dan cuenta que los helmintos parásitos no pueden sintetizar NAD de novo, y dependen, exclusivamente de vías de reciclado de NAD.

Así pues, nuestros resultados identifican posibles puntos de quiebre del metabolismo de gusanos parásitos: la biosíntesis de rodoquinona y las vías de reciclado de NAD.

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

Palabras clave: Mitochondria / Helminto / *C. elegans* /

Introducción

Nota: aquí planteamos Antecedentes, abordaje y descripción tal como fueron explicitados en la propuesta original (Anexo Figura 3)

La energía es esencial para todas las formas de vida. Los helmintos (nematodos y platelmintos parásitos) son anaerobios facultativos (1). Parte del ciclo de vida de los helmintos es en el tracto gastrointestinal de sus hospederos vertebrados bajo condiciones de hipoxia. Una adaptación metabólica clave de estos linajes es el uso de una cadena de transporte de electrones alternativa que les permite obtener energía en condiciones de hipoxia (2-4). En esta cadena el fumarato es el aceptor final de electrones y la rodoquinona (RQ) es utilizada como transportador de electrones (Anexo, Figura 1). La RQ difiere de la ubiquinona (UQ, transportador de electrones en aerobiosis) en un sustituyente en el anillo de benzoquinona (la RQ tiene un amino en posición 2, y la UQ tiene un grupo metoxi en esta posición). Esta sustitución confiere a la RQ un menor potencial redox (-63 mV para RQ, 110 mV para UQ) (5), facilitando que la RQ reciba electrones del NADH a través del complejo I y los ceda al fumarato a través del complejo II (1,4,6). En esta cadena transportadora de electrones alternativa, el complejo II funciona como fumarato reductasa (FRD), en la dirección opuesta a la cadena convencional en la que el complejo II funciona como succinato deshidrogenasa (SDH) (3,6). En contraste con otras vías de fermentación, la cadena de transporte de electrones alternativa permite el bombeo de protones a través del complejo I y la síntesis de ATP a través del complejo V, permitiendo una mayor eficiencia en la obtención de (~ 6ATP/glucosa) (1). La RQ, el metabolito clave de esta vía, se ha encontrado en todos los helmintos examinados hasta ahora (6,7), así como en otros animales que alternan ciclos de normoxia y anoxia (e.g. bivalvos) y en algunas bacterias y protistas (1).

La vía biosintética de la RQ se ha estudiado ampliamente en *Rhodospirillum rubrum*. En este organismo, la UQ es precursor de la RQ (8), y el gen *rquA* es esencial para su biosíntesis, pero no para la de UQ (9). Recientemente, se demostró que los eucariotas unicelulares poseen un homólogo del gen *rquA*, adquirido por transferencia horizontal (10). Estos estudios indican que *rquA* es la firma genética para la biosíntesis de RQ en bacterias y protistas. Sin embargo, los animales no requieren de UQ para la biosíntesis de RQ y carecen de *rquA* (11). La biosíntesis de RQ en animales permaneció esquivada por más de medio siglo. Nuestro grupo, en colaboración con la Prof. Jennifer Shepherd (Gonzaga University, USA), dilucidó recientemente pasos claves en la biosíntesis de RQ (12). Demostramos que la vía de la

quinurenina es esencial para la biosíntesis de RQ en *C. elegans*. La quinureninasa KYNU-1, que cataliza la biosíntesis de los ácidos antranílico y 3-hidroxiantranílico a partir de quinurenina y 3-hidroxiquinurenina, respectivamente, es esencial en la biosíntesis de RQ. Simultáneamente, otro grupo de investigación arribó a esta conclusión (13). Determinamos que a partir de estas arilaminas precursoras varias enzimas involucradas en la biosíntesis de UQ son utilizadas también para la RQ. La interferencia de la expresión de *coq-3*, *coq-5* y *coq-6* afectó por igual la biosíntesis de ambas quinonas (12). Así, proponemos que RQ y UQ tienen vías paralelas a partir de diferentes precursores. Dado que la RQ no es sintetizada ni usada por los mamíferos, pero es esencial para los helmintos, su biosíntesis es un blanco único para el diseño de fármacos antihelmínticos. Resulta importante resaltar la importancia del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* en estos estudios (12), constituyendo un modelo para estudios bioquímicos y genéticos de helmintos (14).

La vía de las quinureninas es un hub metabólico fundamental en numerosos organismos. Esta vía, además de estar involucrada en la biosíntesis de RQ, es clave en la biosíntesis de novo del NAD⁺ y de los ácidos quinurénico, xanturénico y picolínico, estos últimos relevantes en la homeostasis del sistema nervioso. Recientemente se demostró que, en *C. elegans*, la vía de la quinurenina es también responsable de la biosíntesis de novo de NAD⁺, que se presumía ausente en nematodos (15).

La RQ no es la única adaptación de la cadena alternativa de transporte de electrones en helmintos. Estudios en *Ascaris suum* han revelado que el uso de RQ es posible debido a cambios en las subunidades del complejo II (3,16,17). La transición de normoxia a hipoxia se acompaña de un intercambio de subunidades SDHA y SDHD derivadas de duplicaciones génicas, que conlleva a un cambio en la actividad enzimática del complejo II, de SDH-UQ reductasa a FRD-rhodoquinol oxidasa (3,16,17). Las actividades de FRD y SDH se han detectado también en platelmintos (18).

Recientemente, examinamos los genomas de nematodos y platelmintos completamente secuenciados y encontramos diversas duplicaciones en los genes que codifican las subunidades del complejo II y de las subunidades del complejo I que interactúan con las quinonas (19). Estas duplicaciones génicas revelan que no hay un evento evolutivo único vinculado a las cadenas alternativas de transporte de electrones en helmintos. Usando *C. elegans* como modelo, estudiamos el papel de las duplicaciones de las subunidades de los complejos I (*sdha-1* y *sdha-2*) y II (*nduf-2.1* y *nduf-2.2*). En tanto *sdha-1* y *nduf-2.1* son genes esenciales, las cepas KO en *sdha-2* y *nduf-2.2* revelaron que no son esenciales, pero afectan la progenie, disminuyendo el número de huevos. La expresión de *sdha-2* y *nduf-2.2* aumenta en el embrión temprano y en las larvas dauer, etapas en las que hay una baja tensión de oxígeno, siendo el patrón de expresión invertido al de las subunidades *sdha-1* y *nduf-2.1*. Dado que *C. elegans* enfrenta condiciones de hipoxia durante el desarrollo y así como desafío ambiental, proponemos, de forma similar a lo que se propone para helmintos, que la cadena de transporte de electrones alternativa constituye una adaptación evolutiva que permite la supervivencia en un amplio rango de tensión de oxígeno.

En la presente propuesta ahondaremos en la biosíntesis de RQ en los helmintos parásitos y en el papel de las cadenas de transporte de electrones alternativas utilizadas por *C. elegans*.

Antecedentes del equipo de trabajo

Este proyecto continúa una línea de investigación financiada por ANII en 2014 "Estudios sobre el metabolismo energético mitocondrial de helmintos: bases moleculares de la dismutación del malato". En esta vía, parte del malato es oxidado a acetato y parte reducido a succinato. El NADH generado en el ramal oxidativo de la vía es reducido en la cadena alternativa de electrones que hace uso de RQ y en la que el fumarato es el aceptor final de electrones. En estos años dilucidamos pasos claves de la biosíntesis de RQ, y aspectos biológicos y evolutivos relevantes de la cadena alternativa de transporte de electrones. Una integrante del equipo (Lic. Cecilia Martínez) está culminando su doctorado en la temática, dos investigadoras posdoctorales trabajaron durante en esta línea (Dras Lucía Otero e Inés Carrera), y la Dra. Laura Romanelli, del equipo de investigación que también realizó su doctorado en *C. elegans*, comenzó recientemente su posdoctorado en la temática. Desarrollamos una colaboración fructífera con la Prof. Jennifer Shepherd de Gonzaga University (integrante del equipo), quien dilucidó la biosíntesis de RQ en bacterias (8,20) y es corresponsable del descubrimiento de la biosíntesis RQ en animales, que culminó con una publicación de alto impacto (12). Esta colaboración incluye un manuscrito en preparación sobre metilasas que inicialmente supusimos involucradas en la biosíntesis de RQ, de las cuales sólo una de ellas parece ser relevante, pero no decisiva en esta vía. Por otro lado, el manuscrito en el que se da cuenta de avances en relación a los complejos I y II que operan en normoxia e hipoxia está actualmente en evaluación en *Frontiers in Genetics* (19). Además de los logros científicos, se avanzó de forma significativa en lo metodológico. Se puso

a punto el cultivo en hipoxia en cámara con oxímetro, la obtención de mitocondrias y de lípidos de muestras de gusanos, la transgénesis de gusanos en el Institut Pasteur, y el HPLC-masa para la detección de ácidos orgánicos en excreciones de gusanos. Por otra parte, la colaboradora de Gonzaga University posee una amplia experiencia en la detección y cuantificación de benzoquinonas de muestras lipídicas y el Dr. Barrera, con quien colaboramos en (19) posee amplia experiencia en modelado de estructuras. Es también de destacar que en un proyecto relacionado a la presente propuesta, estamos estudiando el transcriptoma (mRNAs y ncRNAs) y proteoma de *C. elegans* en condiciones de hipoxia y normoxia. En breve comenzaremos el análisis de datos de transcriptómica (ya disponibles), en tanto las muestras enriquecidas en mitocondrias en condiciones de hipoxia y normoxia están prontas, pero sólo se ha realizado un experimento piloto. En la medida que avancemos con estos datos y experimentos, surgirán pistas adicionales al presente proyecto, y más globalmente a la comprensión del switch metabólico de normoxia-hipoxia. Así pues, el punto de partida del proyecto son antecedentes directos y un equipo que posee experiencia en bioquímica de helmintos y ha consolidado un laboratorio que maneja con solvencia el organismo modelo *C. elegans*, al que se integrará un becario de maestría.

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.

Si bien aspectos claves de la biosíntesis de RQ fueron dilucidados recientemente, interrogantes relevantes subsisten. Una importante pregunta es si los helmintos sintetizan RQ a través de la misma vía que lo hace *C. elegans*. La cercanía filogenética indicaría que tal es el caso, y ésta constituye nuestra primera hipótesis de trabajo. Utilizaremos triptófano marcado isotópicamente (^{15}N) y analizaremos si el nitrógeno aromático del Trp es incorporado en la biosíntesis de RQ. Protoescólex de *E. granulosus* serán incubados en presencia de ^{15}N -Trp y se analizará por HPLC-masa la presencia de ^{15}N -RQ luego de 48 horas de cultivo. Si el nitrógeno de la RQ proviene del catabolismo del Trp entonces será posible detectarlo debido al marcado isotópico. Nota: utilizamos ^{13}C -Trp, pues tiene 5 daltons (no 1) de diferencia con respecto al no marcado.

El mapeo de la vía de la quinurenina en los helmintos completamente secuenciados es crucial para aportar información sobre la posibilidad de estos organismos de sintetizar RQ, NAD y otros metabolitos biológicamente relevantes. Concretamente nos proponemos identificar presencia/ausencia de los genes involucrados en el catabolismo del triptófano (*tdo-2*, *afmd-1*, *kynu-1*, *kmo-1*, *haao-1*, *umps-1*) en helmintos, así como eventuales variantes, derivadas de duplicaciones génicas o de transcriptos alternativos de un gen. En *C. elegans* la estirpe KO en *kynu-1* no produce RQ, en tanto el mutante en *kmo-1* disminuye drásticamente, pero no elimina, la síntesis de RQ (12). Sin embargo, *kynu-1* está presente en nematodos y platelmintos, pero *kmo-1* está ausente en platelmintos (resultados no publicados), revelando que podría haber diferencias linaje específico en la biosíntesis de RQ. El mapeo de la vía permitirá establecer con claridad su presencia parcial o total, y arrojar luz sobre el último precursor de RQ proveniente de la vía de la quinurenina.

Una pregunta clave aún no resuelta es ¿por qué linajes como el de los mamíferos, que poseen la vía de la quinurenina y las enzimas que convertirían a las arilaminas en RQ (COQ-2 a COQ-6) no sintetizan RQ? Esta pregunta lleva a otras preguntas: ¿Hay una firma génica de la biosíntesis de RQ en animales no identificada aún? ¿La discriminación entre RQ y UQ se debe a ajustes finos en los sitios activos de las enzimas? ¿Hay fenómenos regulatorios vinculados a la hipoxia? Estas preguntas no son de respuesta evidente y las hipótesis de trabajo pueden ser diversas y amplias. La búsqueda de genes presentes en animales que sintetizan RQ y ausentes en los que no la sintetizan ha sido infructuosa hasta el momento. Para abordar esta pregunta nos centraremos en una pista concreta. Existen en *C. elegans* dos isoformas de la enzima COQ-2, la enzima que cataliza la adición de la cadena isoprenoide al anillo aromático precursor de la benzoquinona. Este es el primer paso de la rama que conecta la vía de la quinurenina a la biosíntesis de RQ. Según la wormbase, estas isoformas de COQ-2 derivan de transcriptos conteniendo el exón 6A o el exón 6E, derivados de splicing alternativo mutuamente excluyente. Nuestra hipótesis de trabajo es que los exones 6A y 6E generan variantes de COQ-2 involucradas en la biosíntesis de UQ y de RQ. Por ello, generaremos estirpes de delección en el exón 6A y en el exón 6B. En estas estirpes analizaremos la biosíntesis de RQ y UQ mediante HPLC-masa. Asimismo, sobre la estructura existente de COQ-2 (de *Aeropyrum pernix*) (21) se modelará las estructuras de COQ-2 humana y de las variantes de COQ-2 de *C. elegans*, y se analizará mediante docking la interacción de UQ y RQ a estas estructuras lo cual podría revelar pistas sobre la especificidad por una u otra benzoquinona.

Otro punto central de la propuesta es el estudio de la relevancia biológica de la RQ y de las cadenas de transporte alternativo de electrones. Como mencionamos, la progenie de *C. elegans* se ve afectada en los KO en las subunidades de los complejos I y II duplicadas, pero no esenciales (*sdha-2* y *nduf-2.2*). Por otra parte, recientemente otro trabajo mostró que los mutantes en *kynu-1* también tienen afectada la progenie (15). Este último resultado fue relacionado a la biosíntesis del NAD⁺, ya que la suplementación con ácido quinolínico (precursor de NAD⁺, pero no de RQ) restablece, si bien no totalmente, el número de la progenie. Sin embargo, experimentos claves con mutantes en todos los genes de la vía de la quinurenina y posterior evaluación de la progenie u otros fenotipos no han sido realizados. Por otro lado, el papel de la RQ y de las subunidades duplicadas de los complejos I y II en hipoxia no ha sido evaluado exhaustivamente. En esta propuesta abordaremos la aptitud de diferentes cepas *C. elegans* (*silvestre*, KO en los genes de la vía de la quinurenina, y doble KO en *sdha-2* y *nduf-2.2*) en hipoxia. Además de analizar la progenie, fenotipo que en un principio ha sido asociado tanto a la biosíntesis de NAD⁺ como a la cadena alternativa de transporte de electrones, también se analizará la supervivencia de embriones en condiciones de hipoxia (eclosión de larva y desarrollo a estadios posteriores del ciclo) y la supervivencia de adultos en condiciones de hipoxia (0.2% de oxígeno). Finalmente, la importancia de las subunidades duplicadas de los complejos I y II se analizará mediante la detección de ácido succínico en las excreciones de *C. elegans* de (*silvestre* y mutantes), incubados en presencia de cianuro, que simula la hipoxia ya que inhibe el complejo IV y la cadena de electrones convencional, y se reportó que la cepa mutante en *kynu-1* no sintetiza ácido succínico en presencia de KCN (13). Recientemente, pusimos a punto la detección de ácidos orgánicos en excreciones de gusano por HPLC-masa y detectamos ácido succínico en excreciones en hipoxia, no en normoxia. La búsqueda de fenotipos se extenderá a cepas mutantes en *coq-2*, si se detecta que alguna de ellas no producen RQ.

Una fortaleza de la propuesta es que las herramientas que utilizaremos (CRISPR-Cas, extracción de lípidos de gusanos, experimentos con oxígeno controlado, minería de datos de genomas) son manejadas con solvencia en nuestro laboratorio, y el laboratorio de la Prof. Jennifer Shepherd (Gonzaga University).

Análisis de RQ y UQ en muestras de interés. Se realizará mediante LC-MS en Gonzaga University a partir de muestras lipídicas secas según (12). El envío de muestras fue optimizado previamente, constatándose que en muestras secas enviadas por FEDEX no hay degradación del estándar interno. El análisis cuantitativo es posible mediante el uso del estándar interno de UQ3 en las muestras a analizar. Utilizaremos el protocolo de molienda de gusanos y extracción lipídica detallado en (12). Todos los experimentos se realizarán por triplicado, cada muestra corresponderá a 10.000 gusanos adultos sincronizados.

Marcado isotópico. El marcado isotópico con triptófano utilizando nitrógeno “pesado” en el anillo aromático del Trp permitirá determinar si este nitrógeno, una vez metabolizado a través de la vía de la quinurenina, está presente el anillo aromático de la RQ. Esta estrategia ya ha sido utilizada con éxito en el caso de la biosíntesis de RQ en *C. elegans* (13), y la Prof. Shepherd realizará la detección y cuantificación de RQ marcada isotópicamente. Muestras no marcadas serán utilizadas de control. Los experimentos serán realizados en tres réplicas biológicas. El cultivo de protoescólex lo hemos realizado durante años en nuestro laboratorio. Los protoscólex serán obtenidos por punción de quistes hidáticos provenientes del descarte de vísceras de UREXPORT. Nota: utilizamos ¹³C-Trp en lugar de ¹⁵N-Trp como ya explicamos. Utilizamos *Mesocestoides corti* en lugar de *E. granulosus* por disponibilidad de material.

Mapeo de genes. El mapeo de los genes de la vía quinureninas se realizará por blastp utilizando como secuencias de búsqueda las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *C. elegans* que posee la vía de la quinurenina completa. Las tablas de ausencia/presencia se mapearán sobre árboles filogenéticos de especies, para revelar eventos evolutivos (e.g. pérdida o duplicación de un gen en un linaje). Las variantes derivadas de un mismo gen se analizarán por tblastn para las especies en las que se disponga de transcriptoma de calidad. Una ventaja de estos estudios es que numerosos helmintos han sido completamente secuenciados y correctamente anotados en la base de datos WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org>) (22). La minería de datos será esencialmente realizada de acuerdo a (19).

Generación de organismos mutantes y organismos transgénicos. La hipótesis de que la adición de la cola isoprenoide al anillo aromático, catalizada por COQ-2, es el paso que discrimina la benzoquinona se abordará con delección específica del exón 6A y del exón 6B mediante la tecnología de CRISPR-Cas9. Esta herramienta es muy eficiente en *C. elegans* (23), y ya está puesta a punto en nuestro laboratorio. Las estirpes con estos uno u otro exón eliminado se generarán mediante microinyección de construcciones apropiadas en las gónadas del gusano (esta técnica está optimizada en nuestro

laboratorio, haciendo uso de la plataforma de transgénesis de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del IPMON) (12). Se coinyectará el ARN guía de la secuencia blanco (exón 6A o exón 6B), y para que la delección sea precisa (por recombinación homóloga), se incluirá un molde de reparación conteniendo las secuencias que flanquean el exón a eliminar. La enzima Cas9 y un marcador de edición (dpy10) serán coinyectados. El marcador permite revelar eventos de edición y seleccionar las estirpes editadas. Los animales transgénicos serán secuenciados y una vez confirmados mutantes homocigotas utilizados para evaluar la síntesis de UQ y RQ.

Los mutantes KO en los genes de la vía de la quinurenina están disponibles en nuestro laboratorio, y han sido provistos por el Caenorhabditis Genetics Center y el National Bioresource Project for the Experimental Animal Nematode *C. elegans*. El rescate de fenotipo silvestre se realizará mediante la generación del organismo transgénico que expresa el alelo silvestre del gen de interés en el organismo mutante en dicho gen. Los transgénicos se generarán mediante microinyección de las construcciones apropiadas en las gónadas del gusano (12). La construcción conteniendo el alelo dominante rol-6 (su1006) será utilizada como marcador de transgénesis. Una vez generado el transgénico, se examinará el fenotipo deseado (e.g. síntesis de quinonas, progenie, etc).

Modelado de estructuras de COQ-2 y docking the quinonas. El modelado de COQ-2 de *C. elegans* y humana se realizará utilizando Modeller (25), usando como molde 3D de la estructura de of *A. pernix* almacenada en el Protein Data Bank, código 4OD5 (21). Las estructuras serán validadas usando la predicción del modelo del sitio de unión de la UQ. Para el docking de quinonas se utilizará AutoDock Vina 1.1.2, de forma similar a lo realizado para el complejo II (19).

Manejo general de *C. elegans* y búsqueda de fenotipos. Los métodos generales de manejo y mantenimiento de *C. elegans* están descritos (24). El conteo de huevos será realizado para 30 gusanos individuales por estirpe, a lo largo de 4 días (cada gusano pone entre 200 y 300 huevos en normoxia) o más en caso de haber retraso en la puesta. La longevidad será evaluada como % de gusanos vivos a días fijos, ya que no es posible abrir la cámara de hipoxia sin intervenir en el experimento (por ingreso de aire). En promedio, los gusanos viven entre 15 y 20 días a partir de la puesta de huevo y ponen huevos del día 3 al 7. Las excreciones serán obtenidas de gusanos en estadio L4 en M9, sin comida (para evitar la muda a adultos, ya que pueden existir diferencias en el desarrollo entre cepas, en cuyo caso sería difícil distinguir efectos debido a la afectación de la vía de los efectos debidos al estadio de desarrollo). El ácido succínico será purificado de las excreciones por LC-masa utilizando columna HILIC. Nota: se pudo usar LC, pero no LC-masa, por lo que se confirmó identidad de compuestos por NMR.

Resultados, análisis y discusión

Dos variantes de splicing alternativo de COQ-2 determinan la síntesis de ubiquinona y de rodoquinona a partir de diferentes precursores.

Una primera precisión es que el plan de actividades original fue modificado al momento de firmar el contrato ya que algunas actividades habían sido realizadas entre la postulación y el inicio del proyecto, por lo cual se quitaron algunas actividades y se incorporaron nuevas. De cualquier manera, quedaba el corolario de esas actividades ya realizadas: es decir la publicación de los resultados. Durante este proceso, uno de los revisores del manuscrito solicitó experimentos adicionales, (algunos no previstos en el plan original, ni en el modificado), los cuales contribuyeron a mejorar el manuscrito que se publicó en eLife (ver: <https://elifesciences.org/articles/56376>), una revista de muy alto impacto. Estos resultados adicionales tenían que ver con el análisis de transcritos de las isoformas de coq-2 que dan lugar a la biosíntesis de ubiquinona y rodoquinona, los transportadores de electrones lipídicos en normoxia e hipoxia, respectivamente. Esta actividad contribuyó de forma importante al avance del proyecto, más allá de la formalidad planteada en el listado de actividades a la fecha de la firma del contrato.

La conclusión central de estos resultados publicados, que conformaban parte de los objetivos generales del proyecto, es haber determinado que, en helmintos, moluscos y anélidos, a diferencia de los mamíferos, existen dos isoformas de COQ-2, derivadas de splicing alternativo mutuamente excluyente, y que una de ellas es responsable de la biosíntesis de rodoquinona (coq-2e), y la otra de ubiquinona (coq-2a) (Figura 1, anexo). Estos resultados explican por qué si bien tanto mamíferos, como helmintos, anélidos y moluscos tienen la vía de la quinurenina, sólo los último sintetizan rodoquinona. Al mismo tiempo este trabajo permitió identificar en una isoforma de COQ-2, que reconoce ácido antranílico e 3-hidroxiantranílico (pero no ácido 4-hidroxi benzoico), como un blanco farmacológico nuevo.

Los helmintos poseen una vía de la quinurenina incompleta, que permite la biosíntesis de rodoquinona pero no la biosíntesis de novo de NAD.

La vía de la quinurenina genera los precursores para la biosíntesis de rodoquinona y de NAD. Se mapearon todos los genes presuntamente involucrados en la síntesis de rodoquinona y NAD en 16 genomas elegidos por su diversidad y completitud, incluyendo además de parásitos, platelmintos y nematodos de vida libre. Los resultados indican que la mayoría de estos organismos codifican un conjunto incompleto de enzimas de la vía, tomando como referencia las enzimas reportadas para esta vía en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. La evidencia hallada sugiere que, del total de enzimas que integran la vía de la quinurenina hasta el precursor de la síntesis de rodoquinona, las únicas enzimas que serían esenciales son aquellas que catalizan la primera reacción de la vía, (triptofano dioxigenasa, TDO e indolamina dioxigenasa, IDO) y que en helmintos están codificadas bajo un patrón mutuamente excluyente, y la quinureninasa (KYNU). En efecto, varios helmintos no poseen genes para la quinurenina formamidasa (AFMD) y quinurenina monooxigenasa (KMO) (Figura 2, anexo).

El marcado metabólico con ¹³C-Trp, de *Mesocostoides corti*, helminto que no posee AFMD ni KMO, permitió demostrar que la ausencia de estos genes no impide la biosíntesis de RQ a partir de Trp (Figura 3, anexo). Otro tanto ocurre con *Echinococcus granulosus* que también carece de AFMD y KMO. Por otra parte, de acuerdo al mapeo las dioxigenasas del anillo indol del Trp (Trp 2,3-dioxigenasa. TDO o indoleamina 2,3-dioxigenasa IDO), serían esenciales para la biosíntesis de RQ a partir de Trp, además de la quinureninasa (KYNU), lo cual confirmamos con ensayos con la una estirpe mutante KO en TDO en *C. elegans*, la cual no puede sintetizar RQ. Cabe consignar que para ninguna de las enzimas se encontraron variantes derivadas de splicing alternativos o de duplicación génica, excepto para la AFMD y KMO de *C. elegans* cuya relevancia biológica no se abordó en este proyecto.

Por otra parte, la vía de la quinurenina es también precursora de la biosíntesis de novo de NAD. En este sentido era importante saber si la vía incompleta permitía la biosíntesis de NAD en helmintos. Además de la ausencia de AFMD y KMO en algunos helmintos, la mayoría de los helmintos también carecen del gen que codifica para la enzima ácido 3-hidroxiantranílico oxigenasa (HAAO), aguas abajo de KYNU en la vía de la quinurenina (ver Figura 2, Anexo). Una cepa mutante de *C. elegans* *haao-1* y *M. corti*, que carece del gen que codifica para HAAO, no pudieron sintetizar NAD de novo a partir de ¹³C-Trp.

Estos resultados nos llevaron a estudiar en detalle las vías de reciclado de NAD (Figura 4 anexo), dada su vital importancia para los helmintos, dada la ausencia del gen que codifica para HAAO en la mayoría de éstos.

Los helmintos dependen de las vías de reciclado de NAD

Los resultados del mapeo se muestran en la Figura 5 (Anexo), e indican que los cestodos son los organismos con menor capacidad de reciclaje de NAD: no pueden reciclar el ácido nicotínico ni el ribósido de nicotinamida y dependen únicamente de la nicotinamida para la síntesis de NAD. De acuerdo con este hallazgo, se realizaron cultivos in vitro en tetratiridios de *M. corti* (forma larvaria de este parásito) con inhibidores de nicotinamida fosforribosil transferasa. La inhibición específica de esta enzima condujo a una disminución sustancial del NAD total y a la muerte de los tetratiridios (Figura 6, anexo).

El mapeo del COQ sintoma en helmintos no reveló variantes adicionales a COQ-2

Para terminar de mapear la biosíntesis de RQ y de ubiquinona (UQ), además de la vía de la quinurenina se mapeó las restantes enzimas de la biosíntesis de RQ a partir de ácido para hidróxi antranílico, y de UQ a partir de para hidroxibenzoico, el "CoQ sintoma" (Figura 7, anexo). En particular, la existencia de variantes en estas enzimas podría revelar especificidad de sustratos. Este mapeo reveló que el COQ sintoma es, en principio el mismo para ambas benzoquinonas (RQ and UQ). No se detectó ninguna otra enzima "COQ" que tuviera más de una isoforma derivada de duplicaciones génicas o variantes de splicing. Un resultado interesante es la ausencia del gen que codifica para *coq-4* en varios platelmintos. Si bien no se sabe la función precisa de este gen, se pensaba que el mismo era esencial para la biosíntesis de ubiquinona y/o su regulación.

Las duplicaciones génicas de subunidades de los complejos I y II no serían relevantes en *C. elegans* en la transición del metabolismo aeróbico-anaeróbico

Se presumía de trabajos en helmintos que las duplicaciones génicas de subunidades de los complejos I (*sdha-1*,

convencional/sdha-2, alternativa) y II (gas-1 o nduf-2.1, convencional/nduf-2.2, alternativa) estarían vinculadas a las transiciones del metabolismo aeróbico- anaeróbico (y uso de ubiquinona-rodoquinona, respectivamente). Por otra parte, sabemos que la RQ es esencial en la respuesta al "ahogo" por cianuro (estirpe GUC02, gráfico de la derecha, debajo), no así el mutante que no sintetiza UQ (estirpe GUC01, gráfico del medio) o el gusano silvestre (N2, que sintetiza UQ y RQ) (Figura 8, panel A). Así pues, sometimos estirpes mutantes en las subunidades "alternativas" (no convencionales) de los complejos I y II de la cadena respiratoria al ahogo por cianuro, para ver si se recuperaban o no (Figura 8, panel B). Los resultados indican que sin las subunidades alternativas los gusanos sobreviven al cianuro de forma similar a N2, echando por tierra la hipótesis de que en *C. elegans* estas subunidades participarían en la transición normoxia-hipoxia. Por otra parte, en estos mutantes, la disminución de la progenie en hipoxia no se vio más afectada que en normoxia, y otro tanto ocurre con el doble mutante generado en este trabajo.

Las duplicaciones génicas de las subunidades de los complejos I y II se expresan diferencialmente en los diferentes órganos y tejidos de *C. elegans*

El análisis de la expresión espacio temporal de sdha-1, sdha-2, gas-1 y nduf-2.2 en *C. elegans* a partir de datos de RNAseq reveló un patrón de expresión mutuamente excluyente de las subunidades duplicadas en el gusano adulto: las subunidades canónicas sdha-1 y gas-1 (nduf-2.1) se expresan exclusivamente en las células somáticas del organismo, pero no en la línea germinal, en tanto las subunidades no canónicas se expresan exclusivamente en la línea germinal (Figura 9, anexo). Estos resultados hacen pensar que la duplicación génica de estas subunidades está asociada a un metabolismo energético diferente de las células en división versus las células somáticas.

Finalmente, el patrón de expresión de sdha-1 del reportero fue consistente con los datos de análisis de RNAseq (ver informe de avance 2). La expresión de GFP se observó en las mitocondrias de células somáticas, con alta expresión en las células musculares. Por otra parte, las estirpes transgénicas reporteras en sdha-2 y nduf-2.2 no fluorescieron, consistente con la expresión exclusiva en línea germinal, que silencia la expresión de los transgenes.

La progenie de una estirpe mutante que no sintetiza rodoquinona no se ve afectada en condiciones de 0.5% de oxígeno

La estirpe mutante GUC02 que no produce RQ no se recuperó de cianuro en condiciones que se suponen son equivalentes a la anoxia (a partir de 200 μ M), como se mencionó más arriba. Se procuró observar que ocurría con esta estirpe en condiciones de hipoxia (98% de nitrógeno, 2% de aire, es decir aproximadamente 0.5% de oxígeno) en particular si afectaba la progenie o el desarrollo temprano. Se eligió esa condición porque se supone que entre 0.1 y 1% de oxígeno ocurre la transición metabólica normoxia-hipoxia. Sin embargo, no observamos ninguna diferencia en la progenie de gusanos adultos luego de 18 horas de hipoxia, entre la estirpe silvestre, mutantes deficientes en UQ (GUC01) y mutantes deficientes en RQ (GUC02). Como control se utilizó una cepa mutante en el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) que se sabe que la progenie es afectada severamente en hipoxia (Figura 10, anexo). Por otro lado, vimos que la supervivencia de gusanos adultos, luego de 24 horas en hipoxia era similar para los mutantes deficientes en RQ que para la estirpe silvestre. Establecer condiciones de hipoxia que manifiesten un fenotipo claro, dependiente de rodoquinona, requiere mayor estudio. Esto no es sencillo; requiere una cámara anaeróbica con control de oxígeno, con mezclas especiales de gases. Se proseguirá avanzando en esta línea, al tiempo que incubaciones con cianuro pueden ser un proxy relevante no sólo para anoxia (ver más arriba) sino también, de ajustar condiciones de concentración y tiempo, para hipoxia.

Los productos de excreción de la mutante deficiente en RQ difieren de los que excretados por la estirpe silvestre

En relación con la determinación de ácido succínico por las diferentes estirpes, utilizamos abordajes ortogonales: por medio de HPLC utilizando una columna que separa ácidos orgánicos mediante la cual pudimos determinar lo que en principio sería ácido succínico en las excreciones de la cepa silvestre. Dado que el HPLC usado no determina masa, la confirmación se realizó por NMR, utilizando marcado metabólico con ^{13}C -glucosa. Las excreciones revelaron la presencia de acético (mayoritariamente), láctico, propiónico, y en menor medida succínico y etanol. En la estirpe mutante deficiente de RQ, en cambio, detectamos etanol y algo de láctico, sugiriendo un rol de estas fermentaciones en ausencia de RQ. Estos resultados sugieren que las excreciones de acético, propiónico y láctico estarían asociadas a la utilización de la RQ, lo cual es consistente con la vía propuesta de la dismutación del malato, en la cual una parte de éste, derivado de la glucosa, es oxidada a acetato y otra parte reducida a succinato, y este último podría decarboxilarse a propionato (Figura 11, anexo). Actualmente estamos esperando turno en el equipo de NMR para ver las excreciones del mutante deficiente de RQ genéticamente rescatado por transgénesis. A futuro será importante ver que sucede por un lado en condiciones de hipoxia

y anoxia, y con excreciones de helmintos en diferentes condiciones. El conocimiento en profundidad de estas vías que permiten obtener energía en hipoxia (cadena alternativa de transporte de electrones, dismutación del malato) nos permitió remitir un artículo en formato "Matters Arising" a Nature Communications, actualmente en revisión (NCOMMS-22-53735).

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, que aquí ampliamos:

- 1) Dos variantes de splicing alternativo de COQ-2 determinan la síntesis de ubiquinona y de rodoquinona a partir de diferentes precursores, a partir del ácido 4-hidroxibenzoico y del ácido 3-aminoantranílico.
- 2) No hay variantes de otros genes COQ que codifiquen para la biosíntesis de ubiquinona y rodoquinona: estas biosíntesis "paralelas" dependerían de precursores diferentes, variantes de COQ2, y el resto del CoQ sintoma sería común a ambas vías.
- 4) La rodoquinona es importante en la respuesta al "ahogo" por cianuro, si bien en condiciones de hipoxia de 0.5% de oxígeno los gusanos sin rodoquinona no se ven afectados, ni tampoco la progenie.
- 3) Algunos helmintos carecen de COQ-4, lo cual cuestiona que este gen sea indispensable para la biosíntesis de ubiquinona y rodoquinona.
- 4) Los helmintos poseen una vía de la quinurenina mínima, que en estos organismos fue evolutivamente preservada para la biosíntesis de rodoquinona, pero no para la biosíntesis de novo de NAD.
- 5) La mayoría de los helmintos no puede sintetizar NAD de novo, y depende de las vías de reciclado de NAD. La nicotinamida fosforribosil transferasa puede ser un blanco de drogas interesante para los cestodos, ya que no poseen síntesis de novo de NAD y sólo una vía de reciclado de NAD.
- 6) Los genes duplicados que codifican para las subunidades alternativas del complejo I (NDUF-2.2) y del complejo II (SDHA-2) de la cadena de transporte de electrones no son relevantes en la respuesta a hipoxia ni al ahogo por cianuro (anoxia).
- 7) Las duplicaciones génicas de las subunidades de los complejos I y II se expresan diferencialmente en los diferentes órganos y tejidos de *C. elegans*. Las subunidades convencionales *nduf-2.1/gas-1* y *sdha-1* se expresan en las células somáticas, en tanto las subunidades alternativas *nduf-2.2* y *sdha-2* se expresan exclusivamente en línea germinal. Esto sugiere un metabolismo diferente en línea germinal.
- 9) Los productos de excreción de la mutante deficiente en RQ difieren de los que excretados por la estirpe silvestre. Los ácidos orgánicos excretados por estirpes silvestres y deficientes en la síntesis de rodoquinona son consistentes con el uso de la rodoquinona en la dismutación del malato.

Referencias bibliográficas

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

1. van Hellemond, J. J., van der Klei, A., van Weelden, S. H., and Tielens, A. G. M. (2003). Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 358, 205–215. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1182>
2. Yamashita, T., Ino, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Osanai, A., Nakamaru-Ogiso, E., and Kita, K. (2004) Rhodoquinone reaction site of mitochondrial complex I, in parasitic helminth, *Ascaris suum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1608, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.10.006>
3. Iwata, F., Shinjyo, N., Amino, H., Sakamoto, K., Islam, M. K., Tsuji, N., and Kita, K. (2008) Change of subunit composition of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. *Parasitol. Int.* 57, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.08.002>.
4. Muller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., and Martin, W. F. (2012) Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 444-495. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05024-11>
5. Erabi, T., Higuti, T., Kakuno, T., Yamashita, J., Tanaka, M., and Horio, T. (1975). Polarographic studies on ubiquinone-10 and rhodoquinone bound with chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* 78, 795–801. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130968>
6. Van Hellemond, J. J., Klockiewicz, M., Gaasenbeek, C. P., Roos, M. H., and Tielens, A. G. (1995) Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 270, 31065-31070. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.31065>
7. Allen, P. C. (1973) Helminths: Comparison of their rhodoquinone. *Exp. Parasitol.* 34, 211-219. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(73\)90080-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(73)90080-5)
8. Brajcich, B. C., Iarocci, A. L., Johnstone, L. A. G., Morgan, R. K., Lonjers, Z. T., Hotchko, M. J., Muhs, J. D., Kieffer, A., Reynolds, B. J., Mandel, S. M., Marbois, B. N., Clarke, C. F., and Shepherd, J. N. (2010) Evidence that ubiquinone is a required intermediate for rhodoquinone biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 192, 436-445. <https://doi.org/10.1128/JB.06319-11>
9. Lonjers, Z. T., Dickson, E. L., Chu, T. P., Kreutz, J. E., Neacsu, F. A., Anders, K. R., and Shepherd, J. N. (2012) Identification of a new gene required for the biosynthesis of rhodoquinone in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 194, 965-971. <https://doi.org/10.1128/JB.06319-11>
10. Stairs, C. W., Eme, L., Muñoz-Gómez, S. A., Cohen, A., Dellaire, G., Shepherd, J. N., Fawcett, J. P., and Roger, A. J. (2018) Microbial eukaryotes have adapted to hypoxia by horizontal acquisitions of a gene involved in rhodoquinone biosynthesis. *eLife.* 7, e34292. <https://doi.org/10.7554/eLife.34292>
11. Jonassen, T., Larsen, P. L., and Clarke, C. F. (2001) A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 421-426. <https://doi.org/10.1073/pnas.021337498>
12. Buceta, P.M.R., Romanelli-Cedrez, L., Babcock, S.J., Xun, H., VonPaige, M.L., Higley, T.W., Schlatter, T.D., Davis, D.C., Drexelius, J.A., Culver, J.C., Carrera, I., Shepherd, J.N., Salinas, G. (2019) The kynurenine pathway is essential for rhodoquinone biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 294(XXX) 1-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.009475>
13. Del Borrello, S., Lautens, M., Dolan, K., Tan, K.H., Spensley, A., Caudy, A.A., and Fraser, A.G. (2019) Identification of the pathway of rhodoquinone biosynthesis in *C. elegans*. *BioRxiv*. Preprint posted on May 04. <https://doi.org/10.1101/627737>
14. Salinas, G. Risi, G. (2018) *Caenorhabditis elegans*: nature and nurture gift to nematode parasitologists. *Parasitology.* 145(8):979-987. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002165>
15. McReynolds, M.R., Wang W., Holleran L.M., Hanna-Rose W. (2017) Uridine monophosphate synthetase enables eukaryotic de novo NAD⁺ biosynthesis from quinolinic acid. *J Biol Chem.* 292(27):11147-11153. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.795344>
16. Takamiya, S., Matsui, T., Taka, H., Murayama, K., Matsuda, M., and Aoki, T. (1999) Free-living nematodes *Caenorhabditis*

elegans possess in their mitochondria an additional rholoquinone, an essential component of the eukaryotic fumarate reductase system. Arch. Biochem. Biophys. 371, 284-289. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1465>

17. Amino, H., Wang, H., Hirawake, H., Saruta, F., Mizuchi, D., Mineki, R., et al. (2000). Stage-specific isoforms of *Ascaris suum* complex. II: The fumarate reductase of the parasitic adult and the succinate dehydrogenase of free-living larvae share a common iron-sulfur subunit. Mol. Biochem. Parasitol. 106, 63-76. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00200-5)

18. Matsumoto, J., Sakamoto, K., Shinjyo, N., Kido, Y., Yamamoto, N., Yagi, K., et al. (2008). Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 164-170. <https://doi.org/10.1128/AAC.00378-07>.

19. Otero, L., Martinez-Rosales, C., Barrera, E., Pantano, S., and Salinas, G. (2019) Complex I And II Subunit Gene Duplications Provide Increased Fitness To Worms. Frontiers in Genetics, en revisión (Manuscript ID: 467800).

20. Lonjers, Z. T., Dickson, E. L., Chu, T. P., Kreutz, J. E., Neacsu, F. A., Anders, K. R., and Shepherd, J. N. (2012) Identification of a new gene required for the biosynthesis of rholoquinone in *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 194, 965-971.

21. Cheng, W, and Li, W. (2014). Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. Science 343(6173), 878-681. <https://doi.org/10.1126/science.1246774>.

22. Bolt, B.J., Rodgers, F.H., Shafie, M., Kersey, P.J., Berriman, M., and Howe, K.L. (2018) Using WormBase ParaSite: An Integrated Platform for Exploring Helminth Genomic Data. Methods Mol Biol. 1757:471-491. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7737-6_15.

23. Farboud, B., Severson, A.F., Meyer, B.J (2019) Strategies for Efficient Genome Editing Using CRISPR-Cas9. Genetics. 211(2):431-457. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301775>.

24. Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77, 71-94. PMID: 4366476.

25. Webb, B., and Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER in Current Protocols in Protein Science (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 2.9.1-2.9.37. <https://doi.org/10.1002/cpp.20>.

Licenciamiento

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