



Title of the PhD project: Structural and functional characterization of the ubiquinone biosynthetic complex from *Escherichia coli*

PhD supervisors:

ludovic.pelosi@univ-grenoble-alpes.fr
mickael.cherrier@ibs.fr

Host laboratory:

- Institut de Biologie Structurale (IBS), Metalloproteins Unit.
<https://www.ibs.fr/research/research-groups/metalloproteins-group/>
- Laboratoire Recherche Translationnelle et Innovation en Médecine et Complexité (TIMC), TrEE team. <https://www.timc.fr/tree>

Key words:

Biochemistry, multiprotein complex, 3D structure, biosynthesis pathway, ubiquinone, cryo-electron microscopy, modular cloning.

Project summary:

Ubiquinone is conserved from bacteria to humans and plays a crucial role in cellular bioenergetics. The biosynthesis of ubiquinone (UQ) requires nine chemical reactions and involves twelve proteins in the model bacterium *Escherichia coli*. In 2019, we showed that seven Ubi proteins form a soluble complex, called Ubi complex that catalyzes the last six reactions of the UQ biosynthesis pathway in *E. coli* (Figure 1). Similar multiprotein complexes likely exist in eukaryotes but have not been characterized so far.

The project *UbiComplex* proposes to build on our previous results by addressing now the functional and structural characterization of the Ubi complex of *E. coli*, which would represent the first description of a UQ biosynthesis complex. The project will be developed in collaboration between the TrEE team (TIMC laboratory) and the METALLO team (IBS laboratory) and will provide a high level training in molecular biology, biochemistry and structural biology. The 4 objectives of the project are: 1) to construct an overexpression system for the Ubi complex and to obtain enough material for structural studies, 2) to develop an *in vitro* activity assay for the Ubi complex using substrate analogs which are less hydrophobic than the natural substrates, 3) to purify the Ubi complex and establish the stoichiometry of the constituting Ubi proteins, 4) to obtain the tridimensional structure of the Ubi complex by cryo-electron microscopy.

Each objective of the project will be valuable in itself and will represent a significant advance from the state of the art. The structural characterization of the Ubi complex would be a major step forward as it would help to answer several outstanding questions regarding UQ biosynthesis, it would provide a basis for studying eukaryotic complexes and could potentially open innovative antibacterial approaches.

Résumé du projet :

L'ubiquinone est un lipide qui joue un rôle fondamental dans les processus bioénergétiques des cellules et qui est conservé des bactéries à l'homme. La voie de biosynthèse de l'ubiquinone (UQ) fait intervenir neuf réactions chimiques et compte une douzaine de protéines Ubi différentes chez la bactérie modèle *Escherichia coli*. En 2019, nous avons montré que sept protéines Ubi forment un complexe soluble, appelé complexe Ubi, qui catalyse les six dernières étapes de la voie de biosynthèse de l'UQ (figure 1). Des complexes multiprotéiques de ce type existent probablement chez les eucaryotes mais n'ont pas encore été caractérisés.

Le projet *UbiComplex* propose de capitaliser sur nos résultats antérieurs en réalisant la caractérisation structurale et fonctionnelle du complexe Ubi d'*E. coli*, ce qui représenterait la première description d'un complexe de biosynthèse de l'UQ. Le projet sera développé en collaboration entre l'équipe TrEE (laboratoire TIMC) et l'équipe METALLO (laboratoire IBS) et procurera une formation de haut niveau en biologie moléculaire, biochimie et biologie structurale. Les 4 étapes du projet consisteront à 1) construire un système de surexpression du complexe Ubi pour produire suffisamment de matériel pour une étude structurale, 2) mettre au point un test d'activité *in vitro* du complexe Ubi en s'affranchissant de l'hydrophobie des substrats naturels, 3) purifier le complexe Ubi et établir la stœchiométrie des protéines le composant, 4) obtenir la structure tridimensionnelle du complexe Ubi par microscopie électronique.

Chaque étape du projet sera valorisable en tant que telle et constituera une avancée significative par rapport à l'état de l'art. La caractérisation structurale de complexe Ubi serait une percée très importante qui résoudrait de nombreuses questions sur la voie de biosynthèse de l'UQ et ouvrirait potentiellement la voie à des approches antibactériennes ciblées et innovantes.

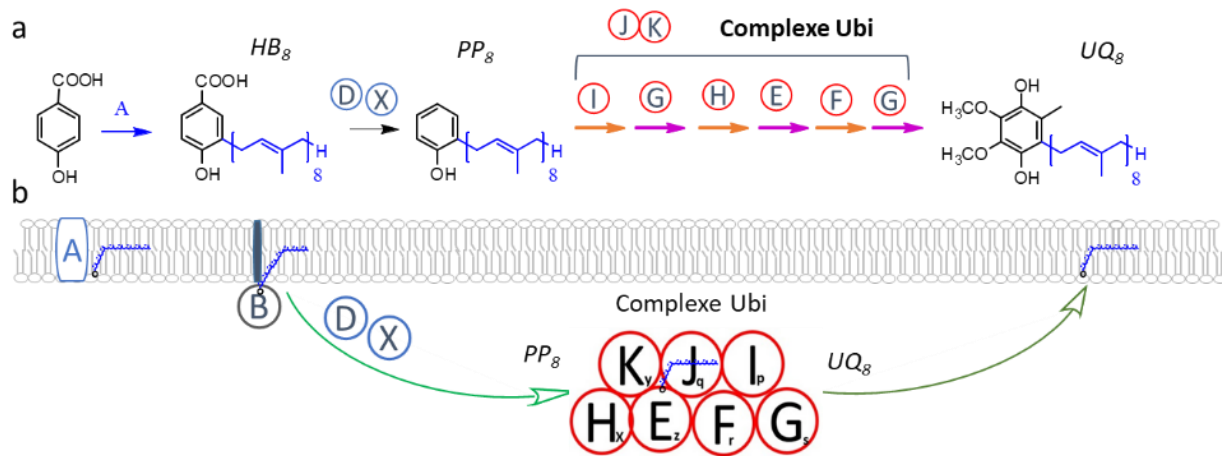


Figure 1. Etapes de la voie de biosynthèse de UQ₈ chez *E. coli*. **a)** Etapes de la voie de biosynthèse de UQ₈ chez *E. coli* (→hydroxylation, →méthylation) et nom des protéines Ubi (ex : A pour UbiA). **b)** Position des protéines et des intermédiaires de biosynthèse par rapport à la membrane. La stœchiométrie et l'arrangement spatial des 7 protéines du complexe Ubi sont inconnus, figure adaptée de Hajj Chehade, M. *et al.* PP₈ : octaprenylphénol, UQ₈ : ubiquinone 8.

Preferred skills:

The candidate will be in his/her second year of Master specialty Biochemistry, Structural Biology or equivalent. The candidate will have an interest to study biosynthesis pathways related to metabolism and for structural approaches on multiprotein complexes.

Relevant publications of the host teams:

- Cherrier, M.V. et al.** Oxygen-Sensitive Metalloprotein Structure Determination by Cryo-Electron Microscopy. *Biomolecules* **2022**, 12, 441.
- Hajj Chehade, M. *et al.* A Soluble Metabolon Synthesizes the Isoprenoid Lipid Ubiquinone. *Cell chemical biology* **26**, 482-492 e7 (2019).
- Cherrier, M. V. et al.** Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *EMBO J* **28**, 3269–3276 (2009).
- Cherrier, M. V. et al.** An icosahedral algal virus has a complex unique vertex decorated by a spike. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11085–11089 (2009).

- Abby, S. S., Kazemzadeh, K., Vragliau, C., **Pelosi, L.** & Pierrel, F. Advances in bacterial pathways for the biosynthesis of ubiquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1861**, 148259 (2020).
- Hajj Chehade, M. *et al.* ubil, a New Gene in Escherichia coli Coenzyme Q Biosynthesis, Is Involved in Aerobic C5-hydroxylation. *J Biol Chem* **288**, 20085–92 (2013).
- Pelosi, L.** *et al.* Evolution of Ubiquinone Biosynthesis: Multiple Proteobacterial Enzymes with Various Regioselectivities To Catalyze Three Contiguous Aromatic Hydroxylation Reactions. *mSystems* **1**, e00091-16 (2016).
- Loiseau, L. *et al.* The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *The Journal of biological chemistry* **292**, 11937–11950 (2017).
- Pelosi, L.** *et al.* Ubiquinone Biosynthesis over the Entire O₂ Range: Characterization of a Conserved O₂-Independent Pathway. *mBio* **10**, e01319-19 (2019).