

TITOLO:

ANALISI DEL RUOLO DEI SUPERCOMPLESSI RESPIRATORI NEL MITIGARE L'EFFETTO DI MUTAZIONI PATOGENE DEL COMPLESSO III

La fosforilazione ossidativa è un processo, comune a tutti gli organismi aerobi dai batteri ai mammiferi, in cui gli elettroni derivanti dall'ossidazione dei nutrienti vengono trasportati all'ossigeno con conseguente liberazione di energia utilizzata per la sintesi di ATP [1]. Nei mammiferi, i componenti principali della catena respiratoria (complesso I, CI; complesso III, CIII e complesso IV, CIV) sono complessi enzimatici costituiti da diverse subunità proteiche in parte codificate dal DNA nucleare (nDNA) e in parte dal DNA mitocondriale (mtDNA) [2]. Questi complessi catalizzano reazioni di ossidoriduzione accoppiandole al trasporto di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna. È ormai noto che i complessi respiratori possono svolgere la rispettiva funzione come unità isolate, ma possono anche essere organizzati in strutture macromolecolari chiamate supercomplessi (SC) [3]. In natura, i SC più rappresentati sono costituiti dai tre complessi respiratori CI, CIII e CIV presenti in varie stechiometrie SC I+III₂+IV₍₁₋₄₎ oppure possono essere formati da due di essi SC I+III₂ o SC III₂+IV [3]. Tuttavia, da un punto di vista evolutivo, il SC più conservato è il SC I+III₂, suggerendo che l'interazione di questi due complessi respiratori abbia un ruolo strutturale e funzionale molto importante per l'attività della catena respiratoria [4]. Il significato fisiologico dei SC rimane ancora estremamente controverso, nonostante siano state formulate diverse ipotesi [5,6]. Da un punto di vista strutturale è stato proposto che i SC possano avere un ruolo importante nel favorire la stabilizzazione di ciascun complesso respiratorio e nel prevenire l'aggregazione non specifica delle proteine nella membrana mitocondriale interna [7–9]. Da un punto di vista funzionale, invece, è stato proposto che la formazione dei SC possa favorire l'incanalamento del flusso degli elettroni, favorendo l'efficienza della catena respiratoria e limitando la produzione di specie reattive dell'ossigeno [10–13]. Sia l'organizzazione che il mantenimento dei SC hanno delle implicazioni importanti nelle malattie mitocondriali umane. In particolare, è stato osservato che nei mammiferi, il CI è quasi esclusivamente associato ai SC e mutazioni patogene che alterano la stabilità dei complessi CIII e CIV si riflettono anche in un'instabilità strutturale del CI, determinando un'alterazione dell'organizzazione dei SC, con conseguente riduzione dell'attività di tutta la catena respiratoria [7,8,14–17]. Tuttavia, mentre è ormai chiaro il ruolo dei SC nel mantenimento della stabilità e funzionalità del CI, solo recentemente il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che l'effetto di tre mutazioni patogene che alterano l'attività del CIII potrebbe essere mitigato dall'interazione del CIII con il CI, rivelando un nuovo possibile importante ruolo funzionale dei SC [17–19]. Questo fenomeno è stato osservato per mutazioni patogene nel gene che codifica per il citocromo *b* (MT-CYB), unica proteina del CIII codificata dal mtDNA e subunità integrale del nucleo catalitico dell'enzima [20]. In particolare, è stato riportato che la mutazione patogena missenso m.15579A>G/MT-CYB, che determina la sostituzione aminoacidica p.278Y>C nel citocromo *b*, è associata ad una diminuzione dell'attività enzimatica del complesso respiratorio. Tuttavia, il deficit di attività del CIII è più marcato quando i SC sono separati, rispetto a quando l'organizzazione dei SC è mantenuta intatta [18]. Inoltre, è stato osservato che anche la mutazione p.302Y>C in *Rhodobacter capsulatus*, omologa alla mutazione p.278Y>C umana, mostra un difetto nell'attività del CIII del batterio quando questo è cresciuto in condizioni fotosintetiche anaerobiche, in cui è presente solo il CIII come componente della catena respiratoria. Al contrario, l'attività del CIII del batterio è maggiore in condizioni di crescita aerobiche, in cui sono espressi tutti i complessi della catena respiratoria, suggerendo che, anche nel batterio, l'organizzazione nei SC potrebbe mitigare il difetto del CIII [21]. Un secondo studio, su un'altra mutazione missenso m.15557G>A/MT-CYB, che determina la sostituzione aminoacidica p.271E>K, ha mostrato che anche in questo caso il

difetto di attività del CIII è più evidente in mitocondri i cui SC sono separati rispetto a mitocondri contenenti SC intatti [19]. Infine, recentemente, lo studio dell'effetto di una microdelezione patogena nel citocromo *b* (m.15649-15666 che determina una delezione di 6 aminoacidi in frame Δ1300-P305) ha mostrato che, nonostante il CIII sia quasi completamente disassemblato, una piccola parte rimane associata a CI ed è ancora funzionante [17]. Questi risultati indicano chiaramente che l'effetto deleterio di mutazioni del citocromo *b*, che alterano la funzionalità del CIII possa, essere mitigato dalla sua associazione nei SC e in particolare dalla formazione del SC I+III₂ la cui struttura è particolarmente preservata nelle cellule di mammifero. Recenti studi di microscopia crioelettronica (Cryo-EM) hanno mostrato che, in mitocondri di cuore ovino, il SC I+III₂ esiste in varie conformazioni dipendenti dall'attività del SC e che cambiamenti conformazionali del CI si riflettono sul CIII mostrando una particolare flessibilità strutturale del citocromo *b* [22] e indicando quindi una stretta relazione fra questa proteina e la struttura/funzione del SC I+III₂. Nonostante le indicazioni presenti in letteratura sulla stretta interazione CI+CIII, manca ancora uno studio dettagliato e comparativo delle interazioni molecolari che intercorrono fra i due complessi e del loro effetto sulla funzione dei complessi respiratori.

SCOPO E OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA

Questo progetto di ricerca ha lo scopo di chiarire le relazioni strutturali e funzionali che intercorrono fra il CI e CIII nel SC I+III₂ in presenza di mutazioni patogene del complesso III con l'obiettivo di aumentare le conoscenze sui meccanismi che stanno alla base della funzionalità, della stabilità e della struttura di questi complessi respiratori. Il raggiungimento di questo obiettivo potrebbe avere importanti ripercussioni sia sulle conoscenze del ruolo fisiologico dei SC nella catena respiratoria che sui meccanismi alla base di alcune patologie mitocondriali, che portano a malattie neurologiche molto gravi e ancora prive di una cura.

PIANO SPERIMENTALE

Il piano sperimentale del progetto di ricerca si svolgerà secondo i seguenti punti nel laboratorio del proponente (Dr. Anna Maria Ghelli) e dei docenti associati (Prof. Francesco Francia e Prof. Francesco Musiani):

1: Analisi della stabilità dei SC e dell'attività del CIII isolato o associato al SC I+III₂ in mitocondri di cellule portatrici di mutazioni patogene nel citocromo *b* (laboratorio del proponente).

Nel laboratorio del proponente sono già disponibili diverse linee cellulari di ibridi di controllo e portatrici di mutazioni patogene del citocromo *b*, fra cui le mutazioni già citate (m.15579A>G/MT-CYB p.278Y>C; m.15557G>A/MT-CYB p.271E>K; microdelezione m.15649-15666/MT-CYB p. Δ1300-P305) e le mutazioni m15635T>C/MT-CYB (missenso che determina sostituzione p.297S>P) e m.15684A>G/MT-CYB (missenso che determina la sostituzione p.313Q>R).

Il modello cellulare dei ibridi, che è considerato uno dei modelli cellulari di elezione per lo studio delle malattie associate a mutazioni del mtDNA, è stato generato partendo da una linea cellulare di osetosarcoma (143B TK⁻) privata del suo mtDNA e ripopolata con il mtDNA normale o portatore di mutazioni patogene [23]. Queste linee cellulari perciò, hanno lo stesso nDNA e differiscono solamente per quello mitocondriale, quindi è possibile studiare gli effetti di una mutazione del mtDNA in un background nucleare virtualmente identico.

Per ciascuna di queste linee cellulari verrà valutato e confrontato il livello di assemblaggio dei complessi respiratori isolati e dei SC tramite Blue Native Gel Electrophoresis (BN-PAGE) dopo solubilizzazione delle membrane mitocondriali con dodecil- beta-maltoside (complessi isolati) o digitonina (SC) seguendo protocolli messi a punto nel laboratorio del proponente [18,19]. Inoltre, nelle stesse condizioni verrà misurata l'attività enzimatica del CIII al fine di valutare differenze

nelle due condizioni in cui il CIII si trova isolato o assemblato nei SC [18,19]. In parallelo, verranno misurate le attività anche del CI, CII e del CIV per valutare l'effetto delle mutazioni sui complessi isolati e le attività integrate CI+CIII, e CII+CIII oltre che il consumo di ossigeno e la capacità di sintesi di ATP mitocondriale utilizzando substrati per il CI (malato/piruvato) e del CII (succinato) [18,19]. In questo modo intendiamo ottenere un quadro accurato dell'effetto delle mutazioni del citocromo *b* sull'attività di ciascuno dei complessi della catena respiratoria e sull'intera fosforilazione ossidativa.

Successivamente, per chiarire meglio il ruolo del CI nella stabilizzazione e funzionalità del CIII mutato, il CI verrà eliminato geneticamente nelle linee cellulari con le mutazioni di maggiore interesse e si procederà a misurare l'attività enzimatica e la stabilità strutturale del CIII. Infatti, nelle stesse linee cellulari appena descritte, verrà indotto il disassemblaggio del CI tramite creazione di linee knockout per la subunità NDUF53 con la tecnica di editing genomico con endonucleasi "zinc finger" messa a punto nel nostro laboratorio in collaborazione con il laboratorio di genetica medica del prof. Gasparre (DIMEC) [24]. La subunità NDUF53 è una subunità a codifica nucleare essenziale nelle prime fasi del processo di biogenesi e assemblaggio del CI [25]. La sua eliminazione permetterà di ottenere linee cellulari prive di CI, di SC I+III₂+IV₍₁₋₄₎ e SC I+III₂ e si potrà perciò valutare accuratamente l'effetto delle mutazioni nel CIII in assenza della sua interazione con il CI.

2: Analisi dell'organizzazione sopramolecolare dei complessi della catena respiratoria in *R.capsulatus* e misure di attività del CIII in mutanti per il citocromo *b* in condizioni di crescita fotosintetiche e aerobie (laboratorio Prof. Francesco Francia).

È noto che i SCs sono presenti anche in alcuni batteri [26], ma non è ancora noto se *R.capsulatus* faccia parte di questa categoria. Il modello cellulare di *R.capsulatus* risulta molto interessante per questo progetto di ricerca, perché è un batterio che può crescere come organismo eterotrofo, in aerobiosi, esprimendo tutti i complessi della catena respiratoria, oppure come organismo autotrofo, in anaerobiosi, esprimendo le proteine necessarie per l'assemblaggio dei complessi fotosintetici e il CIII come unico complesso della catena respiratoria [27]. Utilizzando queste due condizioni di crescita sarà possibile studiare l'attività del CIII in presenza degli altri complessi respiratori o isolato, in entrambi i casi in condizioni fisiologiche.

Il primo obiettivo di questa parte del piano sperimentale prevede di analizzare l'eventuale presenza di SC in membrane di *R.capsulatus* cresciuto in condizioni aerobie, dopo solubilizzazione con opportuni detergenti per mantenere intatte le eventuali interazioni deboli fra i diversi complessi respiratori. Nel caso siano presenti i SC, il piano sperimentale procederà analizzando l'attività del CIII batterico con mutazioni deleterie del citocromo *b*, in condizioni in cui la struttura dei SC è preservata oppure in cui i complessi respiratori sono separati, utilizzando le tecniche descritte al punto 1. Grazie ad una lunga collaborazione del laboratorio del Prof. Francia con il laboratorio del Prof. Daldal della University of Pennsylvania, sono già disponibili ceppi batterici portatori della mutazione p.302Y>C; p.291H>L; p.329K>A and p.329K>D e sarà possibile ottenerne dei nuovi con le mutazioni corrispondenti a quelle patogene umane descritte nella sezione 1 [18,28,29].

Anche nel caso in cui non sia possibile identificare la presenza dei SC nelle membrane di *R.capsulatus*, la stabilità strutturale e l'attività del CIII verranno valutate nei ceppi wild-type e nei mutanti del citocromo *b* sia in condizioni di crescita aerobie che fotosintetiche, considerando che è già stata osservata una differenza di attività di questo complesso per alcune mutazioni del citocromo *b* [21,29]. Inoltre, durante la crescita fotosintetica, il CIII utilizza come donatori di elettroni molecole di chinone ridotte dall'attività del centro di reazione fotosintetico (CR). La

presenza del CR nelle membrane intracitoplasmatiche, facilmente isolabili dalle colture batteriche sotto forma di vescicole chiuse (cromatofori), offre una opportunità unica per analizzare in dettaglio l'attività catalitica del complesso III. I cromatofori possono essere eccitati da brevi impulsi di luce attinica e le variazioni di assorbanza indotte nei cofattori responsabili della catena di trasporto degli elettroni, iniziate dalla fotoattivazione del CR, possono essere seguite con tecniche di spettroscopia risolta nel tempo, che permette di determinare le costanti cinetiche delle reazioni di trasferimento elettronico nel complesso CIII [27].

3: Analisi delle possibili alterazioni indotte dalle mutazioni del citocromo *b* nella dinamica molecolare del SC I+III₂ (laboratorio Prof. F. Musiani)

Partendo dalla recente struttura del SC I+III₂ bovino ottenuta tramite Cryo-EM [22] sarà possibile eseguire una mappatura delle mutazioni patogene individuate, allo scopo di ottenere informazioni sulle possibili modificazioni dell'interazione fra i due complessi. Questa analisi sarà eseguita sia a livello qualitativo, studiando l'effetto delle varie sostituzioni sul ripiegamento locale, sia analizzando l'influenza di tali mutazioni sulla dinamica molecolare del SC. In particolare, utilizzando il metodo degli Elastic Networks (EN) in una sua recente implementazione in cui vengono ottimizzate le interazioni a lungo raggio tramite informazioni evoluzionistiche [30] è possibile mappare tramite calcoli poco onerosi l'eventuale influenza allosterica a lungo raggio delle mutazioni patogene. Gli effetti suggeriti dall'analisi con gli EN sarà poi confermata da calcoli di dinamica molecolare. Viste le grandi dimensioni del sistema e la scarsa risoluzione della struttura sperimentale di partenza, il livello di risoluzione scelto è quello cosiddetto "coarse grained" (in particolare impiegando il campo di forze MARTINI [31,32] sviluppato specificamente per proteine di membrana come quelle in esame). I parametri per i gruppi prostetici presenti nel SC I+III₂ sono in parte presenti in letteratura [33,34], mentre per i cluster ferro-zolfo Fe₂S₂ saranno sviluppati appositamente per questo progetto.

Risultati attesi:

1: Analisi della stabilità dei SCs e dell'attività del CIII isolato o associato al SC I+III₂ in mitocondri di cellule portatrici di mutazioni patogene nel citocromo *b*.

Da questo primo obiettivo ci aspettiamo di ottenere informazioni accurate e definitive sul ruolo del CI nella stabilità e funzionalità del CIII quando sono presenti mutazioni patogene nel citocromo *b*. I risultati di questo studio saranno fondamentali per capire meglio le interazioni dei due complessi nella fisiologia mitocondriale ed essenziali per aumentare le conoscenze dei meccanismi molecolari alla base di malattie mitocondriali che colpiscono i complessi respiratori.

2: Analisi dell'organizzazione sopramolecolare dei complessi della catena respiratoria in *R.capsulatus* e misure di attività del CIII in mutanti per il citocromo *b* in condizioni di crescita fotosintetiche e aerobie.

Da questo secondo obiettivo ci aspettiamo di ottenere informazioni sulla presenza di SC in *R. capsulatus* e se l'eventuale formazione di questi complessi possa, analogamente a quanto osservato nei complessi mitocondriali, modulare l'effetto di mutazioni deleterie del citocromo *b*. Le tecniche di spettroscopia risolta nel tempo, già applicate nel laboratorio di uno dei docenti proponenti per studiare mutazioni dannose del complesso III batterico [28,29], permetteranno di dissezionare le reazioni di trasferimento elettronico che avvengono durante la catalisi operata dal complesso III ed individuare quale/i via/e di trasferimento è/sono influenzata/e dalla mutazione.

3: Analisi delle possibili alterazioni indotte dalle mutazioni del citocromo *b* nella dinamica molecolare del SC I+III₂.

Da questo terzo obiettivo ci aspettiamo di ottenere informazioni sugli effetti dinamici delle mutazioni deleterie del citocromo *b* nella formazione o sulla stabilità del SC I+III₂ e di poter razionalizzare gli elementi strutturali necessari al corretto funzionamento del SC.

- [1] G. Lenaz, M.L. Genova, Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject, *Antioxid. Redox Signal.*, 12 (2010) 961–1008.
- [2] M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad, Mitochondrial-Nuclear Communications, *Annual Review of Biochemistry*, 76 (2007) 701–722.
- [3] T. Lobo-Jarne, C. Ugalde, Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 76 (2018) 179–190.
- [4] K.M. Davies, T.B. Blum, W. Kühlbrandt, Conserved in situ arrangement of complex I and III₂ in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115 (2018) 3024–3029.
- [5] J.A. Letts, L.A. Sazanov, Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 24 (2017) 800–808.
- [6] D. Milenkovic, J.N. Blaza, N.-G. Larsson, J. Hirst, The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex, *Cell Metab.*, 25 (2017) 765–776.
- [7] R. Acín-Pérez, M.P. Bayona-Bafaluy, P. Fernández-Silva, R. Moreno-Loshuertos, A. Pérez-Martos, C. Bruno, C.T. Moraes, J.A. Enríquez, Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria, *Mol. Cell*, 13 (2004) 805–815.
- [8] H. Schägger, R. de Coo, M.F. Bauer, S. Hofmann, C. Godinot, U. Brandt, Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 36349–36353.
- [9] J.N. Blaza, R. Serreli, A.J.Y. Jones, K. Mohammed, J. Hirst, Kinetic evidence against partitioning of the ubiquinone pool and the catalytic relevance of respiratory-chain supercomplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111 (2014) 15735–15740.
- [10] E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, A. Latorre-Pellicer, C. Colás, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P.M. Quirós, E. Calvo, M.A. Rodríguez-Hernández, P. Navas, R. Cruz, Á. Carracedo, C. López-Otín, A. Pérez-Martos, P. Fernández-Silva, E. Fernández-Vizarra, J.A. Enríquez, Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science*, 340 (2013) 1567–1570.
- [11] G. Lenaz, G. Tioli, A.I. Falasca, M.L. Genova, Complex I function in mitochondrial supercomplexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857 (2016) 991–1000.
- [12] I. Lopez-Fabuel, J. Le Douce, A. Logan, A.M. James, G. Bonvento, M.P. Murphy, A. Almeida, J.P. Bolaños, Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113 (2016) 13063–13068.
- [13] J. Berndtsson, A. Aufschnaiter, S. Rathore, L. Marin-Buera, H. Dawitz, J. Diessl, V. Kohler, A. Barrientos, S. Büttner, F. Fontanesi, M. Ott, Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome c diffusion distance, *EMBO Rep*, (2020) e51015.
- [14] F. Diaz, H. Fukui, S. Garcia, C.T. Moraes, Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts, *Mol. Cell. Biol.*, 26 (2006) 4872–4881.
- [15] F. Diaz, J.A. Enríquez, C.T. Moraes, Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV, *Mol. Cell. Biol.*, 32 (2012) 415–429.
- [16] M. Protasoni, R. Pérez-Pérez, T. Lobo-Jarne, M.E. Harbour, S. Ding, A. Peñas, F. Diaz, C.T. Moraes, I.M. Fearnley, M. Zeviani, C. Ugalde, E. Fernández-Vizarra, Respiratory supercomplexes act as a platform for complex III-mediated maturation of human mitochondrial complexes I and IV, *The EMBO Journal*, 39 (2020) e102817.
- [17] C.V. Tropeano, S.J. Aleo, C. Zanna, M. Roberti, L. Scandiffio, P. Loguercio Polosa, J. Fiori, E. Porru, A. Roda, V. Carelli, S. Steimle, F. Daldal, M. Rugolo, A. Ghelli, Fine-tuning of the respiratory complexes

stability and supercomplexes assembly in cells defective of complex III, *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics*, 1861 (2020) 148133.

- [18] A. Ghelli, C.V. Tropeano, M.A. Calvaruso, A. Marchesini, L. Iommarini, A.M. Porcelli, C. Zanna, V. De Nardo, A. Martinuzzi, F. Wibrand, J. Vissing, I. Kurelac, G. Gasparre, N. Selamoglu, F. Daldal, M. Rugolo, The cytochrome b p278Y>C mutation causative of a multisystem disorder enhances superoxide production and alters supramolecular interactions of respiratory chain complexes, *Hum. Mol. Genet.*, 22 (2013) 2141–2151.
- [19] L. Iommarini, A. Ghelli, G. Leone, C.V. Tropeano, I. Kurelac, L.B. Amato, G. Gasparre, A.M. Porcelli, Mild phenotypes and proper supercomplex assembly in human cells carrying the homoplasmic m15557G > A mutation in cytochrome b gene, *Hum. Mutat.*, 39 (2018) 92–102.
- [20] D. Xia, L. Esser, W.-K. Tang, F. Zhou, Y. Zhou, L. Yu, C.-A. Yu, Structural analysis of cytochrome bc1 complexes: implications to the mechanism of function, *Biochim. Biophys. Acta*, 1827 (2013) 1278–1294.
- [21] D.-W. Lee, N. Selamoglu, P. Lanciano, J.W. Cooley, I. Forquer, D.M. Kramer, F. Daldal, Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome b induces reactive oxygen species production by cytochrome bc1, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 18139–18148.
- [22] J.A. Letts, K. Fiedorczuk, G. Degliesposti, M. Skehel, L.A. Sazanov, Structures of Respiratory Supercomplex I+III₂ Reveal Functional and Conformational Crosstalk, *Mol. Cell*, 75 (2019) 1131–1146.e6.
- [23] M.P. King, G. Attardi, Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation, *Science*, 246 (1989) 500–503.
- [24] I. Kurelac, L. Iommarini, R. Vatrinet, L.B. Amato, M. De Luise, G. Leone, G. Girolimetti, N. Umesh Ganesh, V.L. Bridgeman, L. Ombrato, M. Columbaro, M. Ragazzi, L. Gibellini, M. Sollazzo, R.G. Feichtinger, S. Vidali, M. Baldassarre, S. Foriel, M. Vidone, A. Cossarizza, et al., Inducing cancer indolence by targeting mitochondrial Complex I is potentiated by blocking macrophage-mediated adaptive responses, *Nat Commun*, 10 (2019) 903.
- [25] S. Guerrero-Castillo, F. Baertling, D. Kownatzki, H.J. Wessels, S. Arnold, U. Brandt, L. Nijtmans, The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I, *Cell Metab.*, 25 (2017) 128–139.
- [26] A.M.P. Melo, M. Teixeira, Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857 (2016) 190–197.
- [27] R.B. Gennis, B. Barquera, B. Hacker, S.R. Van Doren, S. Arnaud, A.R. Crofts, E. Davidson, K.A. Gray, F. Daldal, The bc1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 25 (1993) 195–209.
- [28] F. Francia, M. Malferrari, P. Lanciano, S. Steimle, F. Daldal, G. Venturoli, The cytochrome b Zn binding amino acid residue histidine 291 is essential for ubihydroquinone oxidation at the Qo site of bacterial cytochrome bc1, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857 (2016) 1796–1806.
- [29] F. Francia, B. Khalfaoui-Hassani, P. Lanciano, F. Musiani, L. Noodleman, G. Venturoli, F. Daldal, The cytochrome b lysine 329 residue is critical for ubihydroquinone oxidation and proton release at the Qo site of bacterial cytochrome bc1, *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1860 (2019) 167–179.
- [30] H. Flechsig, Design of Elastic Networks with Evolutionary Optimized Long-Range Communication as Mechanical Models of Allosteric Proteins, *Biophys. J.*, 113 (2017) 558–571.
- [31] S.J. Marrink, H.J. Risselada, S. Yefimov, D.P. Tieleman, A.H. de Vries, The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations, *J Phys Chem B*, 111 (2007) 7812–7824.
- [32] L. Monticelli, S.K. Kandasamy, X. Periole, R.G. Larson, D.P. Tieleman, S.-J. Marrink, The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins, *J Chem Theory Comput*, 4 (2008) 819–834.
- [33] C.L. Ramírez, A. Petruk, M. Bringas, D.A. Estrin, A.E. Roitberg, M.A. Marti, L. Capece, Coarse-Grained Simulations of Heme Proteins: Validation and Study of Large Conformational Transitions, *J Chem Theory Comput*, 12 (2016) 3390–3397.
- [34] D.H. de Jong, N. Liguori, T. van den Berg, C. Arnarez, X. Periole, S.J. Marrink, Atomistic and Coarse Grain Topologies for the Cofactors Associated with the Photosystem II Core Complex, *J Phys Chem B*, 119 (2015) 7791–7803.

PIANO DI ATTIVITÀ

Nell'ambito del progetto di ricerca, il piano di attività prevede che il titolare dell'assegno acquisisca alcune competenze specifiche, instaurando collaborazioni con componenti del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (Prof. F. Francia, Prof. F. Musiani), con altri gruppi di ricerca dell'Università di Bologna (Prof. G. Gasparre, Dipartimento DIMEC) e con il gruppo di ricerca del Prof. F. Daldal (Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). Questo piano consentirà all'assegnista di interagire in un ambito multidisciplinare, che comprende approcci di biochimica, biologia molecolare, spettroscopia risolta nel tempo e dinamica molecolare computazionale, pur mantenendo prevalente l'attività nell'ambito disciplinare della biochimica. Specificamente il piano di attività prevede che il candidato acquisisca le esperienze sotto indicate:

1. Analisi biochimiche dell'organizzazione strutturale e dell'attività enzimatica dei complessi della catena respiratoria in mitocondri di linee cellulari umane e in cromatofori di *R.capsulatus* wild-type e con mutazioni nel gene del citocromo *b* in presenza o assenza del complesso I. Le tecniche utilizzate saranno: preparazione delle membrane mitocondriali o dei cromatofori batterici tramite centrifugazione differenziale, elettroforesi nativa su gel di poliaccrilamide, attività enzimatiche in gel, western blots, attività enzimatiche tramite metodi spettrofotometrici e spettroscopia risolta nel tempo. Queste competenze sono disponibili nel laboratorio del proponente e nel laboratorio del Prof. F. Francia.
2. Utilizzo della tecnologia di gene-editing tramite tecnologia zinc-finger per il knockout del gene NDUFS3 del complesso I (in collaborazione con il Prof. G. Gasparre, DIMEC) e successiva caratterizzazione biochimica come al punto 1. È previsto che l'assegnista segua il lavoro di gene-editing sotto la supervisione dei collaboratori e proceda autonomamente alla caratterizzazione biochimica.
3. Calcoli di dinamica molecolare ed analisi dei moti lenti a lungo raggio del SC I+III₂ sia nella forma wild-type che nelle forme mutate. Il piano di attività dell'assegnista prevede che acquisisca competenze bio-informatiche tali da poter coadiuvare il Prof. Musiani e collaboratori nell'elaborazione dei calcoli di dinamica molecolare.

La formazione dell'assegnista prevede inoltre la partecipazione ai seminari del laboratorio e dipartimentali, congressi nazionali ed internazionali e scuole di specializzazione pertinenti e utili per lo svolgimento della ricerca.