



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad** Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Papel del residuo W483 en las propiedades redox del  
factor de Apoptosis Humano (hAIF)

*“Role of W483 in the redox properties of Human Apoptosis  
Inducing Factor (hAIF)”*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Autor: Javier Gregori Arlandis

Directoras: Dra. Patricia Ferreira Neila y Raquel Moreno Loshuertos

Fecha: Febrero 2023



## ÍNDICE BREVE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>33</b>
<b>6. Discusión</b> .....	<b>45</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>45</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>51</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>54</b>

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Estructura, isoformas y entrada de hAIF en la mitocondria</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Función de hAIF dependiente de NADH vinculado a CHCHD4 en homeostasis mitocondrial.....	7
2.1.2. Papel de AIF en células dañadas – Vía Parthanatos .....	9
<b>2.2. Descripción de la proteína a nivel molecular</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Estructura cristalográfica .....	10
2.2.2. Actividad redox dependiente de NADH .....	12
2.2.3. Papel del residuo W483 en la función de hAIF.....	16
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>19</b>

---

INDICES

<b>3.1. Objetivo general</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. Material biológico</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. Transformación de células competentes con la plásmido por variante de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>21</b>
<b>4.3. Prueba expresión a pequeña escala</b> .....	<b>22</b>
<b>4.4. Producción a media escala de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>23</b>
<b>4.5. Purificación de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>23</b>
4.5.1. Purificación por cromatografía de afinidad.....	23
4.5.2. Purificación por cromatografía de exclusión molecular.....	26
<b>4.6. Técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.7. Caracterización de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>28</b>
4.7.1. Determinación de los coeficientes de extinción molar de las variantes de hAIF <sub>Δ77</sub> .....	28
4.7.2. Evaluación de la estabilidad del dímero.....	29
4.7.3. Cinética en estado estacionario .....	29
4.7.4. Tiempo de vida media del complejo de transferencia de carga .....	30
<b>5. Resultados</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1. Expresión y purificación de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>33</b>
5.1.1. Pruebas de expresión a pequeña escala .....	33
5.1.2. Purificación de las variantes de hAIF <sub>Δ77</sub> .....	34
<b>5.2. Caracterización de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub></b> .....	<b>37</b>
5.2.1. Espectros de absorción UV-visible de AIF WT, y determinación de sus coeficientes de extinción .....	37
5.2.2. Efecto de las mutaciones W483Y, W483L y W483G en la estabilidad del dímero .....	39
5.2.3. Caracterización cinética en estado estacionario de hAIF <sub>Δ77</sub> WT y de las variantes W483Y, W483L y W483G..	40
5.2.4. Efecto de las mutaciones en la estabilidad del complejo de transferencia de carga .....	42
<b>6. Discusión</b> .....	<b>45</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>49</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>51</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>54</b>

9.1. Anexo 1. Información adicional del desarrollo experimental .....	54
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estructura del precursor de hAIF .....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Gen e isoformas de hAIF.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Inserción y maduración de hAIF en la mitocondria.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 4. Representación esquemática del modelo de interacción y función entre hAIF y CHCHD4/MIA40. ....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 5. Representación vía Parthanatos .....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 6. AIF humana y su estructura cristalográfica. ....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 7. Estructura del dímero <math>hAIF_{\Delta 1-102rd}:2NAD(H)</math> .....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 8. Sitios de unión FAD y NAD(H) en el complejo <math>hAIF_{\Delta 1-102rd}:2NAD(H)</math> .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 9. Cambios conformacionales observados en hAIF con la inducción a la dimerización mediante NADH .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 10. Expresión de <math>hAIF_{\Delta 77}</math> en la cepa de E.coli C41 (DE3), tras su inducción con IPTG 0,5 mM en 24 h a 37 °C .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11. Perfil de elución de la variante W483Y de <math>hAIF_{\Delta 77}</math> en su purificación por cromatografía de afinidad (A) y por su cromatografía de exclusión molecular (B) .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12. Perfil de elución de las variantes W483L y W483G de <math>hAIF_{\Delta 77}</math> en su purificación por cromatografía de afinidad A y C, respectivamente, y por su cromatografía de exclusión molecular B y D, respectivamente .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13. Espectros de absorción UV-vis de la proteína <math>hAIF_{\Delta 77}</math> WT y sus variantes en fosfato 50 mM, pH = 7,4.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 14. Ensayos de dimerización de la proteína <math>hAIF_{\Delta 77}</math> WT y las variantes W483Y, W483L y W483G .....</b>	<b>39</b>

---

INDICES

**Figura 15. Dependencia de la actividad NADH oxidasa de hAIF $\Delta$ 77 WT y sus variantes W483Y, W483L y W483G a distintas concentraciones de NADH en tampón 50 mM a 25 °C con DCPIP 95  $\mu$ M como aceptor artificial de electrones .....41**

**Figura 16. Evolución espectral absorbida de la reoxidación de hAIF $\Delta$ 77 WT (A) y de las variantes hAIF  $\Delta$ 1-77 W483Y (B), W483L (C) y W483G (D), tras la reducción previa de la proteína con NADH .....43**

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1. Composición de los geles para la electroforesis SDS-PAGE .....28**

**Tabla 2. Caracterización del espectro de absorción UV-visible de la proteína hAIF $\Delta$ 77 WT y las variantes W483Y, W483L y W483G. ....38**

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de hAIF $\Delta$ 77 WT y sus variantes W483Y, W483L y W483G.....42**

**Tabla 4. Tiempo de vida media de los CTC y tiempo medio de la reoxidación de FAD.....44**

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>450</sub></b>	Absorbancia a 280 nm / Absorbancia a 450 nm
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AIF</b>	Factor de inducción de apoptosis
<b>AIFM1</b>	Factor de inducción de apoptosis mitocondrial 1
<b>AIFM2</b>	Factor de inducción de apoptosis mitocondrial 2
<b>AIFsh</b>	AIF corto
<b>Ala 54</b>	Alanina 54
<b>ALR</b>	Potenciador de la regeneración hepática
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BS3</b>	Bis(sulfosuccinimidil) suberato
<b>CHCHD4</b>	Proteína de ensamblaje e importe al espacio intermembrana mitocondrial 40
<b>CPC</b>	Segmento cisteína-prolina-cisteína
<b>CTC</b>	Complejo de transferencia de carga
<b>C-terminal</b>	Carboxilo terminal
<b>(CX<sub>9</sub>C)<sub>2</sub></b>	Dos motivos de seis residuos de cisteína
<b>CypA</b>	Ciclofilina A
<b>DCPIP</b>	2,6-diclorofenolindofenol
<b>EDTA</b>	Ácido etildiaminotetraacético
<b>Erv1</b>	Esencial para la respiración y la viabilidad 1
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad
<b>G</b>	Glicina
<b>g/L</b>	Gramos/litro
<b>H2AX</b>	Histona 2AX
<b>hAIF</b>	Factor de inducción de apoptosis humano
<b>Hsp70</b>	Proteína shock térmico de 70 kDa
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad de ion metal inmovilizado
<b>IMM</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>IMS</b>	Espacio intermembrana mitocondrial
<b>IPTG</b>	Isopropil-b-tio-D-galactopiranosido
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kcat</b>	Constante catalítica
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>Km</b>	Constante Michaelis
<b>Kpi</b>	Fosfato potásico
<b>L</b>	Leucina

<b>L</b>	Litro
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>mAIF</b>	AIF murina
<b>Met 53</b>	Metionina 53
<b>mg/ml</b>	Miligramos/mililitro
<b>MIA40</b>	Proteína para importación y ensamblaje del espacio intermembrana mitocondrial 40
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLS</b>	Secuencia localización mitocondrial
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>NAD(P)H</b>	Dinucleótido fosfato de nicotiamida y adenina
<b>Ni</b>	Niquel
<b>NLS</b>	Secuencia de localización nuclear
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NTA</b>	Ácido nitrilotriacético
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>O.D</b>	Densidad Óptica
<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa
<b>PAR</b>	Poli (ADP-ribosa)
<b>PARP-1</b>	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1
<b>PEST</b>	Secuencia peptídica rica en residuos de prolina, ácido glutámico, serina, y treonina
<b>Redox</b>	Reducción-oxidación
<b>r.c.f</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TMS</b>	Segmento transmembrana mitocondrial
<b>TOM40</b>	Translocasa membrana externa mitocondrial 40
<b>Trx1</b>	Tiorredoxina 1
<b>UV-vis</b>	UltraVioleta-visible
<b>V</b>	Volúmenes
<b>W</b>	Triptófano
<b>XIAP</b>	Proteína inhibidora de la apoptosis ligado al cromosoma X
<b>Xq</b>	Brazo largo cromosoma X
<b>Y</b>	Tirosina
<b>2xYT</b>	Extracto de levadura triptona 2x
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

## 1. RESUMEN

AIF es una flavoproteína que produce la inducción de apoptosis, conocida esencialmente por su acción pro-apoptótica; sin embargo, debido a su cofactor FAD exhibe una acción NAD(P)H óxido-reductasa, además es posible creer que estas funciones estén relacionadas. En el presente estudio se ha realizado un estudio de la implicación en la actividad NADH oxidasa de hAIF $_{\Delta 1-77}$  en la posición del residuo 483 (triptófano por Tirosina, Leucina y Glicina). Para ello, se ha probado la expresión a pequeña escala, se han producido a media escala las variantes de interés, se purifican las mutantes hAIF $_{\Delta 77}$ . Referente a la caracterización se determina el coeficiente de extinción molar de cada mutante, la estabilidad del dímero, la cinética en estado estacionario además del tiempo de vida media del complejo de transferencia de carga. Por esto, ha quedado expuesto que hAIF WT en concentraciones equimolares de NADH posee la capacidad de reducirse completamente. Asimismo, la forma oxidada de hAIF WT exhibe por NAD<sup>+</sup> poca afinidad. También los residuos del centro activo son fundamentales para la función óxido-reductasa.

**Palabras clave:** AIF, función óxido-reductasa, NADH, actividad redox y actividad apoptogénica de AIF.

---

Abstract

## 1. ABSTRACT

AIF is a flavoprotein that produces the induction of apoptosis, essentially known for its pro-apoptotic action; however, due to its cofactor FAD, it exhibits a NAD(P)H oxido-reductase action, and it is also possible to believe that these functions are related. In the present study, a study of the involvement in the NADH oxidase activity of hAIF $_{\Delta 1-77}$  at residue position 483 (tryptophan by Tyrosine, Leucine and Glycine) has been carried out. To do this, expression has been tested on a small scale, the variants of interest have been produced on a medium scale, and the hAIF $_{\Delta 77}$  mutants are purified. Regarding the characterization, the molar extinction coefficient of each mutant, the stability of the dimer, the kinetics in steady state, as well as the half-life of the charge transfer complex, are determined. Therefore, it has been exposed that hAIF WT in equimolar concentrations of NADH has the ability to be completely reduced. Likewise, the oxidized form of hAIF WT exhibits little affinity for NAD<sup>+</sup>. Also the residues of the active center are fundamental for the oxido-reductase function

**Key Words:** AIF, oxido-reductase function, NADH, redox activity and apoptogenic activity of AIF.

## 2. INTRODUCCIÓN

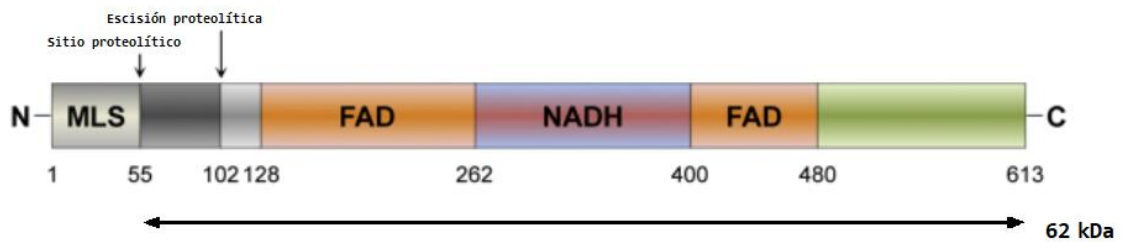
### 2.1. Estructura, isoformas y entrada de hAIF en la mitocondria

El factor inductor de apoptosis (Apoptosis-Inducing Factor, AIF) es una flavoproteína mitocondrial filogenéticamente conservada. Las flavoproteínas son proteínas que contienen como grupo prostético al menos uno de los nucleótidos de flavina (dinucleótido de flavina y adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN)), que son derivados de la riboflavina (vitamina B2). Estos cofactores permiten a la flavoproteína participar en numerosas reacciones bioquímicas entre las que destacan las reacciones de óxido-reducción (redox). AIF ejerce dos funciones principales, como regulador de la función mitocondrial mediante su actividad redox y como inductor de muerte celular independiente de caspasas. La inducción de la muerte celular comienza con la importación de AIF desde la mitocondria al núcleo y, su unión al ADN, favoreciendo su degradación (Arena, 2020).

Las funciones principales que presenta hAIF (AIF humano) se pueden explicar a través de su estructura, compuesta por 613 residuos y con un tamaño de 67 kDa (Dawson, 2014). La función redox, que tiene lugar en la mitocondria, se debe a los residuos del 1 al 480 y la función de inductor de muerte celular al extremo C-terminal. Aun así, ambas funciones presentan una conformación óptima distinta y, por lo tanto, no pueden realizarse simultáneamente. El gen de esta proteína, AIFM1, se encuentra en el cromosoma X (Xq25-Xq26) codificando 16 exones que se traducen en la proteína precursora de hAIF. En cuanto a su estructura, en el extremo N-terminal, hAIF posee una secuencia de localización mitocondrial (MLS) (residuos 1 a 53), una secuencia señal de unión a la membrana mitocondrial interna (IMM) junto a un segmento transmembrana (TMS) (residuos 67-85) y dos sitios proteolíticos (residuos 96-120). En el área central de la proteína hay dos secuencias de unión a FAD (residuos 128 a 262 y 401 a 480) que enmarcan un segmento de unión del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>/NADH) que se sitúa entre los residuos 263 y 400 (Sevrioukova, 2011 y Arena, 2020). La proteína cuenta además con dos

## Introducción

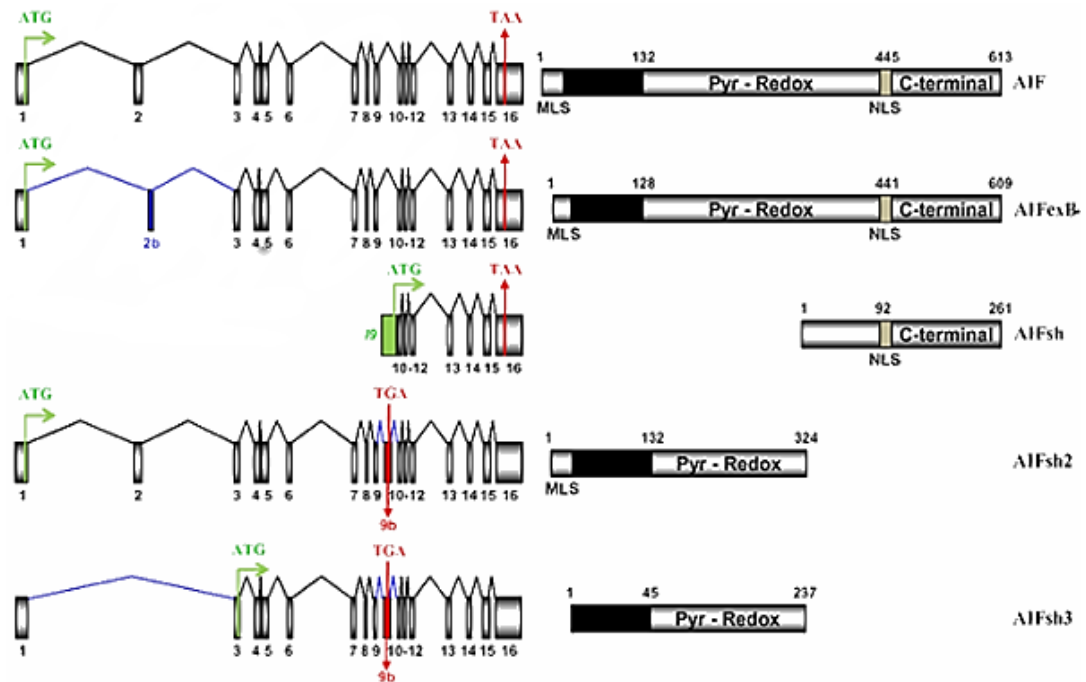
secuencias de localización nuclear (NLS). Por último, los residuos 481 al 613 componen el extremo C-terminal, en los cuales presenta una segunda secuencia de unión a NADH, en el residuo 493, y una región de unión a PAR, localizada entre los aminoácidos 567 y 592 (Figura 1) (Ferreira, 2014; Andrabi, 2011).



**Figura 1. Estructura del precursor de hAIF.** Dominio de unión a FAD (naranja), dominio de unión a NADH (morado) y C-terminal (verde). Las secuencias de localización mitocondrial en N-terminal, MLS (gris). Los números se corresponden al primer y último aminoácido de cada dominio, la forma sin procesar de AIF (1-613) y la forma madura de 62 kDa (54-613). **Fuente:** Bano (2018).

El proceso de maduración postranscripcional del ARNm de hAIF, da lugar a múltiples isoformas mediante splicing alternativo. Las dos variantes más frecuentes son AIFM1 y AIFM2, que dan lugar al precursor hAIF (Figura 2) que se localiza en la mitocondria (Sevrioukova, 2011; Arena, 2020).

De forma general, el transcrito primario de la proteína AIFM1 se sintetiza en todas las células del organismo, debido al ajuste y empalme de la primera parte del exón 2 (exón 2a); mientras que la expresión de la isoforma AIFM2 es específica de tejido del cerebro y retina, y se genera por el ajuste y empalme de la segunda parte del exón 2 (exón 2b). La diferencia principal entre estas dos isoformas se presenta en el segmento transmembrana del extremo N-terminal, con la posibilidad de afectar en la capacidad de anclaje a la membrana mitocondrial y, por lo tanto, a su morfología mitocondrial (Arena, 2020).



**Figura 2. Gen e isoformas de hAIF.** Estructura del gen hAIF e isoformas conocidas. Organización genómica de hAIF y transcripciones de ARNm de AIF, AIF-exB, AIFsh, AIFsh2 y AIFsh3 resultantes (esquemas a la izquierda). Se indican los codones de inicio (ATG, en verde) y de finalización (TGA/TAA, en rojo) de la traducción, y el producto proteico predicho se muestra a la derecha. Los números en AIF designan exones (en transcritos de ARNm) y aminoácidos (en las proteínas predichas). **Fuente:** Victor (2007).

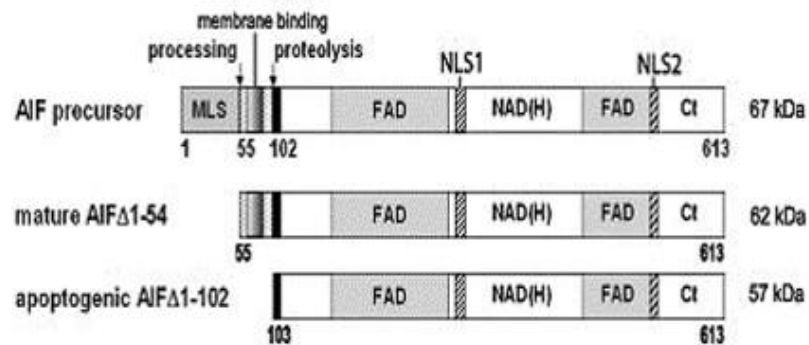
Las otras tres isoformas descritas hasta ahora son AIFshort (AIFsh), AIFsh2 y AIFsh3. AIFsh presenta un inicio transcripcional alternativo en el intrón 9 y carece de MLS. AIFsh2 y AIFsh3, por su parte, son resultado de una variante de empalme alternativo del exón 9b por lo que ambas carecen de NLS2 y extremo C-terminal, y AIFsh3 tampoco presenta MLS (Figura 2). Debido a la existencia de múltiples isoformas, la función y la señalización mediada por hAIF pueden regularse tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Sevrioukova, 2011).

Respecto al precursor de hAIF, la isoforma AIFM1 o en cerebro la variante AIFM2, presentan una señal de localización mitocondrial en el dominio N-terminal que permite su importación a la mitocondria. Este fragmento de la proteína precursora está cargado positivamente y permite su entrada a la mitocondria de forma desplegada, atravesando la membrana externa por el transportador TOM40 (Sevrioukova, 2011; Arena, 2020).

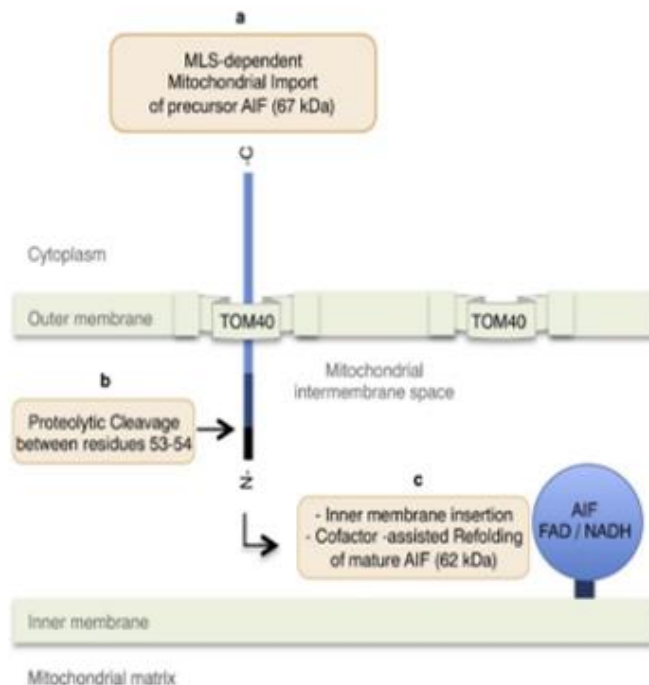
Introducción

Tras la importación a la mitocondria, el precursor de la proteína hAIF de 67 kDa (1-613 residuos) es proteolizado por una peptidasa mitocondrial que escinde los primeros 53 residuos entre los aminoácidos Met53/Ala54 liberando la MLS del extremo N-terminal (fig. 3A y 3B).

A



B



**Figura 3. Inserción y maduración de hAIF en la mitocondria.** A) Estructura proteica de hAIF durante el proceso de entrada, anclaje y/o inducción apoptótica en la mitocondria. B) Proceso de importación e inserción de hAIF en la membrana interna. **Fuente:** Sevrioukova (2011) y Arena (2020).

A continuación, se dirige mediante una señal de localización específica del espacio intermembrana (IMS) y se inserta en la membrana mitocondrial interna mediante su dominio transmembrana (residuos 67-85), pasando por una maduración conformacional que requiere la incorporación de su cofactor FAD, plegándose adecuadamente para dar lugar a hAIF maduro de 62 kDa completamente procesado anclado en la IMM y orientado hacia el espacio intermembrana (Ishihara, 2005; Sevrioukova, 2011; Arena, 2020) (fig. 3A y 3B).

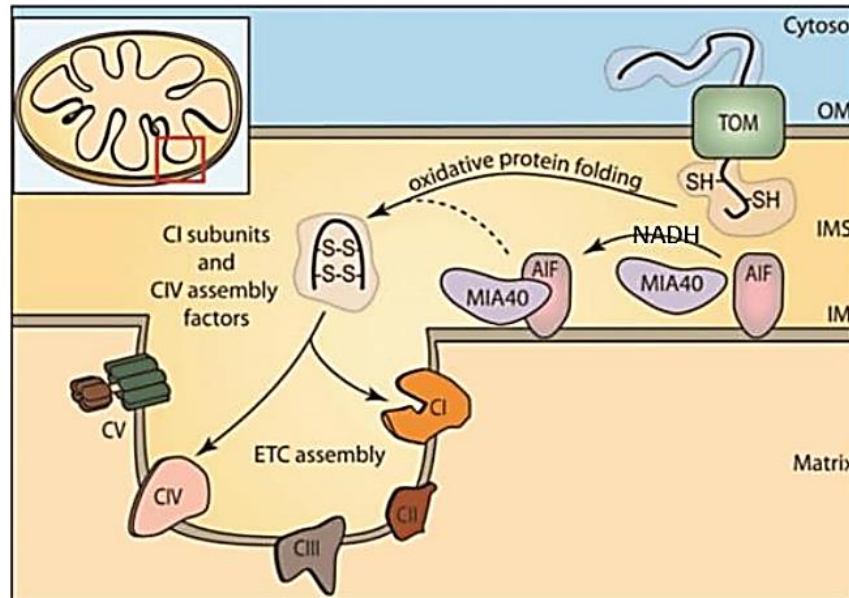
### **2.1.1. Función de hAIF dependiente de NADH vinculado a CHCHD4 en homeostasis mitocondrial**

La proteína CHCHD4 (MIA40 en levaduras) es una proteína soluble de 16 kDa que se encuentra en el IMS mitocondrial, conservando evolutivamente un segmento cisteína-prolina-cisteína (CPC) con actividad redox, que cataliza el mecanismo de plegamiento oxidativo de pequeñas proteínas ricas en cisteínas, y los motivos de seis residuos de cisteína (CX9C)<sub>2</sub>, que participan en la importación mitocondrial de estas proteínas sustrato. Tras la entrada de la pre-proteína (proteína sustrato) al IMS, es reconocida por CHCHD4 que se acopla a ésta uniéndose covalentemente por un enlace disulfuro al motivo CPC e induce un plegamiento de la proteína sustrato y favoreciendo su retención en el IMS. Con este plegamiento, CHCHD4 dona su disulfuro a la proteína sustrato y el motivo CPC del CHCHD4 se reduce. Para su posterior reoxidación, cuenta en el centro activo redox CPC con un dominio de unión a proteínas de unión a FAD como ALR/Erv1 (Augmenter of Liver Regeneration) y hAIF, que actúan como reguladores de la función de importación de CHCHD4 (Grumbt, 2007).

En cuanto a la estabilidad y expresión de CHCHD4, hAIF parece afectar al estado redox y a la disponibilidad de CHCHD4, ya que se requiere para el importe co-traducciona l y localización adecuada del CHCHD4 al IMS (Arena, 2020). Por otro lado, parece fundamental la conformación resultante de la unión de NADH a hAIF para que pueda unirse a CHCHD4 (Arena, 2020) y favorecer su importación al IMS. Asimismo, se ha evidenciado que tanto la depleción de hAIF como la de CHCHD4 originan defectos parecidos sobre un conjunto

## Introducción

determinado de proteínas mitocondriales, donde también se incluyen subunidades de algunos de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática del modelo de interacción y función entre hAIF y CHCHD4/MIA40. Fuente: Hernández (2017).**

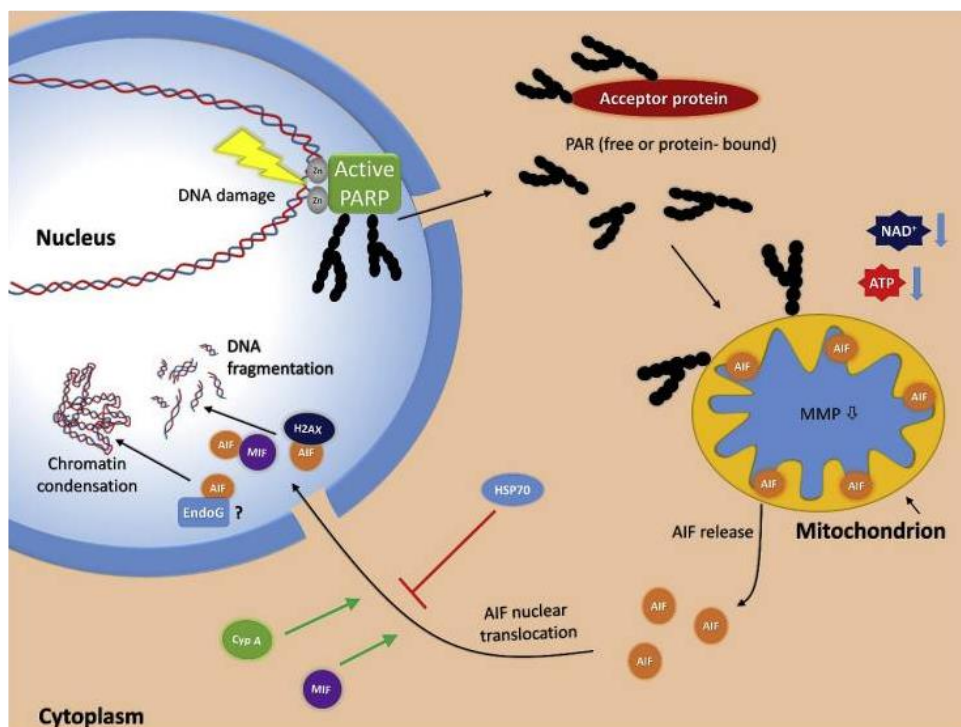
Por otra parte, el funcionamiento óptimo de la ruta de importación de CHCHD4, que está regulado por hAIF, requiere una interacción clave hAIF-CHCHD4 siendo esencial para el ensamblaje y biogénesis de los complejos proteicos de la cadena respiratoria (Romero 2020).

En varios estudios, se ha demostrado que la pérdida de hAIF provoca una disfunción bioenergética causada principalmente por la deficiencia de la proteína CHCHD4 y la subsiguiente pérdida de las proteínas sustrato de CHCHD4 (Modjtahedi, 2016 y Reinhardt, 2020). Finalmente, diversas mutaciones de hAIF se han asociado con mitocondriopatías neurodegenerativas humanas, presentando una relación genotipo/fenotipo, como el síndrome de Cowchock, mutación G262S, o la deficiencia combinada de fosforilación oxidativa 6 (COXPD6) (mutaciones  $\Delta$ R201, V243L, G308E, G338E y Q479R) que cursa con neuropatía axonal senso-motora provocando retraso cognitivo, hipotonía y arreflexia. Estas mutaciones patogénicas de hAIF, como  $\Delta$ R201, que produce un plegamiento

deficiente en el sitio de unión de NADHB, V243L y G262S, causantes de un plegamiento defectuoso que afecta a la incorporación de FAD, o G308 y G338, que son residuos críticos para la estabilización de  $\text{NADH}_A$  (Ferreira 2018), se caracterizan por una deficiencia en la actividad de los complejos I, III y IV del sistema OXPHOS con el potencial para perturbar la vía de importación de hAIF/CHCHD4 (Hangen, 2015 y Meyer, 2015).

### 2.1.2. Papel de AIF en células dañadas – Vía Parthanatos

Una de las funciones principales de AIF es la inducción de muerte celular mediante una vía apoptótica independientemente de caspasas, llamada vía Parthanatos. La muerte celular se activa cuando las células se exponen a un estímulo tóxico (provocado por estrés oxidativo, estrés nitrosativo, hipoxia, isquemia, o agentes alquilantes de ADN) que induce un daño profundo en el ADN; y, por lo tanto, la célula puede recurrir a este mecanismo de muerte celular (Fatokun, 2014).



**Figura 5.** Representación vía Parthanatos. **Fuente:** Robinson (2019).

En este sentido, la cascada de Parthanatos (Figura 5) comienza con una sobreactivación de poli (ADP-ribosa) polimerasa-1(PARP-1) en el núcleo, enzima que agota

---

## Introducción

la reserva celular de NAD<sup>+</sup> y ATP, generando polímeros ramificados de cadena larga de poli (ADP-ribosa) (PAR). Dicho PAR se transloca al citosol, provoca una externalización de fosfatidilserina que conlleva a la disipación del potencial de membrana mitocondrial y a la solubilización parcial de la membrana mitocondrial interna (Fatokun, 2014).

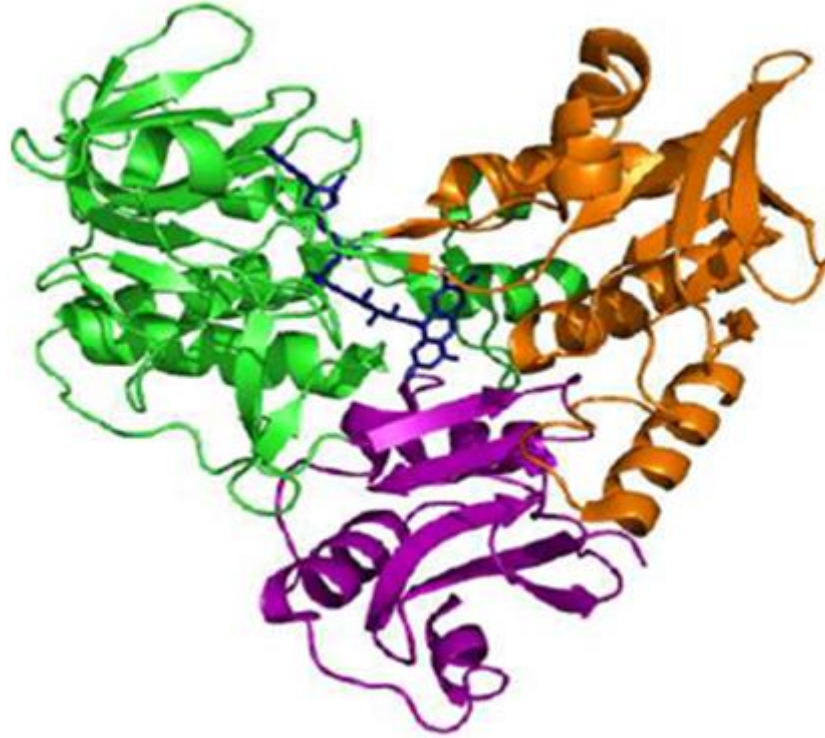
La liberación de AIF mitocondrial es provocada por PAR probablemente mediante mecanismos de señalización celular, aunque también se sostiene la idea de la necesidad de una interacción física de PAR y AIF para la liberación de AIF de 62 kDa del anclaje a IMM, ya que ésta precede a la activación de caspasas (Fatokun, 2014 y Yu, 2009). Así la unión de PAR al motivo de unión a PAR en AIF se realiza a través del extremo C-terminal de AIF (aa 567-592 del dominio D3). A continuación, a nivel citosólico, se puede producir una translocación de hAIF al núcleo mediado por PAR; o interactuar hAIF con Hsp70, por la horquilla  $\beta$  150-228, o con XIAP, ubiquitinación con Lys255, o con la tiorredoxina 1 (Trx1) reducida (Ferreira 2018), para inducir la supervivencia celular (Ferreira, 2013); o unirse a endonucleasas como la ciclofilina A (CypA) que favorece la co-translocación nuclear del complejo AIF-CypA (Romero 2020). Una vez dentro del núcleo, el complejo AIF-CypA debe unirse a la histona H2AX y, por lo tanto, al ADN, formando un complejo de degradación del ADN, se condensa la cromatina y se degradación el ADN en fragmentos de  $\approx$ 50 Kb (Romero, 2020).

## **2.2. Descripción de la proteína a nivel molecular**

### **2.2.1. Estructura cristalográfica**

La estructura de AIF se encuentra resuelta con un plegamiento natural mediante cristalización tanto para las variantes humana como murina (mAIF). La estructura de la proteína de ratón, mAIF está cristalizada de los residuos 121 a 610 y de 128 a 610 mientras para hAIF se ha resuelto la estructura entre los residuos 128-608. Así, se ha observado que el plegamiento de la proteína hAIF (AIFM1) se organiza en tres dominios estructurales: un dominio de unión a FAD (residuos 128-262 y 401-480) y un dominio de unión a NAD(H) (residuos 263-400) con una topología clásica de Rossmann, y un dominio preapoptótico C-

terminal (residuos 481-613), compuesto por cinco hojas  $\beta$  antiparalelas y dos hélices  $\alpha$  (Choi, 2018; Figura 6).



**Figura 6. AIF humana y su estructura cristalográfica.** Se representa en color verde el dominio de unión a FAD, en naranja el dominio de unión a NADH y en morado el dominio C-terminal. El cofactor FAD, en su forma natural oxidada, se representa en color azul. **Fuente:** Ye (2002).

El cofactor FAD se une de forma elongada a la interfaz entre los tres dominios con un enlace no covalente y se estabiliza su anillo de isoaloxacina siendo parcialmente accesible al solvente. El entorno de la parte de pteridina del anillo de isoaloxacina tiene un carácter polar positivo que sugiere que contribuye a la modulación del punto medio del potencial de reducción de la flavina (Ferreira, 2013). El par carga-carga Lys176-Glu313 en AIF ayuda a la unión de FAD y regula la eficiencia catalítica, mientras que el aminoácido Phe309 desempeña un papel de guardián que controla el acceso de los cofactores de nucleótidos de pirimidina al sitio activo (Mate, 2002).

AIF muestra una inserción específica única del dominio de unión AIF: FAD, la inserción N-terminal (aa. 190–202) que se pliega como una horquilla  $\beta$  en el módulo de unión a FAD. Este péptido establece múltiples contactos con el núcleo principal a través de residuos

---

## Introducción

hidrofóbicos (Leu190, Phe192, Trp195) y polares (Gln194, Arg200) (Mate, 2002 y Senda, 2000).

Finalmente, otra inserción específica es el dominio C-terminal. Presenta una horquilla  $\beta$  llamado bucle C regulador con funciones apoptogénicas (residuos 510-560), con una secuencia PEST (aa 529-560) ricas en prolina/ácido glutámico/serina/threonina que suelen estar implicadas en interacciones proteína a proteína; y también contiene un motivo rico en prolinas (aa 544-554) con potencial de reconocimiento y sitio de interacción para proteínas implicadas en la regulación de diferentes procesos celulares, como CypA o endonucleasa G (Ferreira, 2013; Artus, 2010).

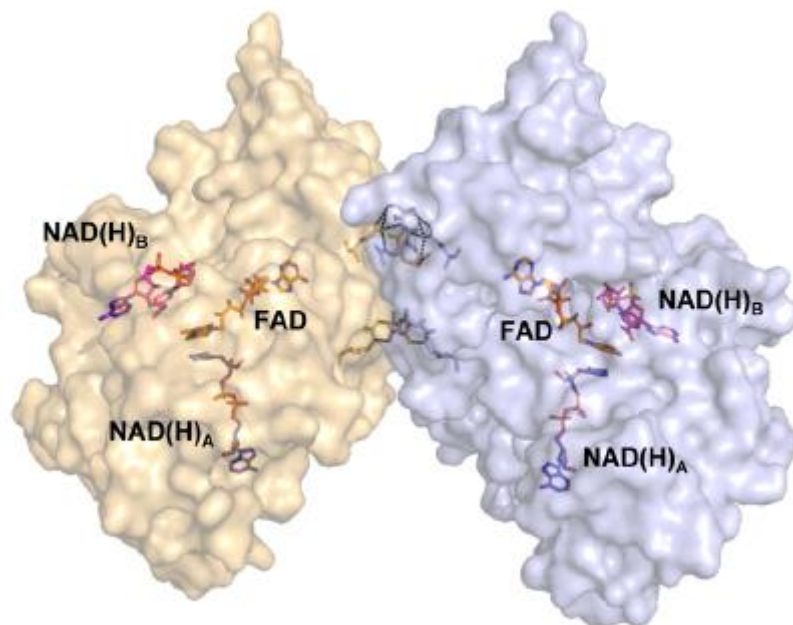
En hAIF, el bucle regulador C-terminal (aa 510-560) y la horquilla  $\beta$  (aa 190-202) conectan los dominios NADH y FAD al dominio preapoptótico C-terminal. La estructura de AIF presenta sobre todo la presencia de un fuerte potencial electrostático positivo en la superficie, a pesar de que el punto isoeléctrico teórico para la proteína entera sea neutral (Ferreira, 2013).

### **2.2.2. Actividad redox dependiente de NADH**

En condiciones fisiológicas, en mitocondrias sanas, AIF se encuentra en un equilibrio monómero-dímero desplazado hacia el monómero, mientras que la unión de NADH y la reducción de la flavina aumenta considerablemente la proporción de dímeros, como organización cuaternaria. La unión de la coenzima NADH a AIF inicia cambios conformacionales asociados a la formación de un complejo de transferencia de carga (CTC) FADH<sup>-</sup>-NAD<sup>+</sup> estable al oxígeno y, por lo tanto, una reducción de FAD que promueve el aumento de la proporción de dímeros de proteína (Churbanova, 2008 y Ferreira, 2013). La estabilización del CTC se produce por interacciones de apilamiento  $\pi$  coplanares entre los anillos de nicotinamida del NADH, isoaloxacina del FAD y Phe309 de hAIF (Ferreira, 2013).

El mapa de densidad electrónica del centro activo presenta una molécula de FAD y dos de NAD(H) por protómero (Figura 7; Ferreira, 2014). También se observó la reducción de la flavina, la formación de un CTC con al menos una molécula de NAD<sup>+</sup>, en concreto, la

estructura  $mAIF_{red}:NAD^+$  con un NADH unido al sitio  $NADH_A$ . Además, la estabilidad de los dímeros se realiza a través de posibles puentes salinos y de hidrógeno entre el propio protómero o de un protómero al otro que concuerdan con la reorganización estructural mediada por la reducción por NADH (Ferreira, 2014). Estas observaciones concuerdan con una estructura  $hAIF_{red}:2NAD(H)$  y, por lo tanto, confirman la presencia de dos sitios de unión de NAD(H) en la enzima que, por tanto, presenta la zona de unión  $NADH_A$  y la unión a  $NADH_B$ . También, puede observarse que la estructura de  $AIF_{red}:NAD^+$  con solo un NAD(H) unido al sitio  $NADH_A$  presenta los cambios conformacionales para la unión de un segundo NAD(H) en el sitio de unión de  $NADH_B$ .



**Figura 7. Estructura del dímero  $hAIF_{\Delta 1-102rd}:2NAD(H)$ .** Representación de la superficie de dos dímeros de hAIF, uno amarillo y otro azul. Se muestran los átomos de carbono de FAD,  $NAD(H)_A$ , y  $NAD(H)_B$  en naranja, azul y rosa, respectivamente. **Fuente:** Ferreira (2014).

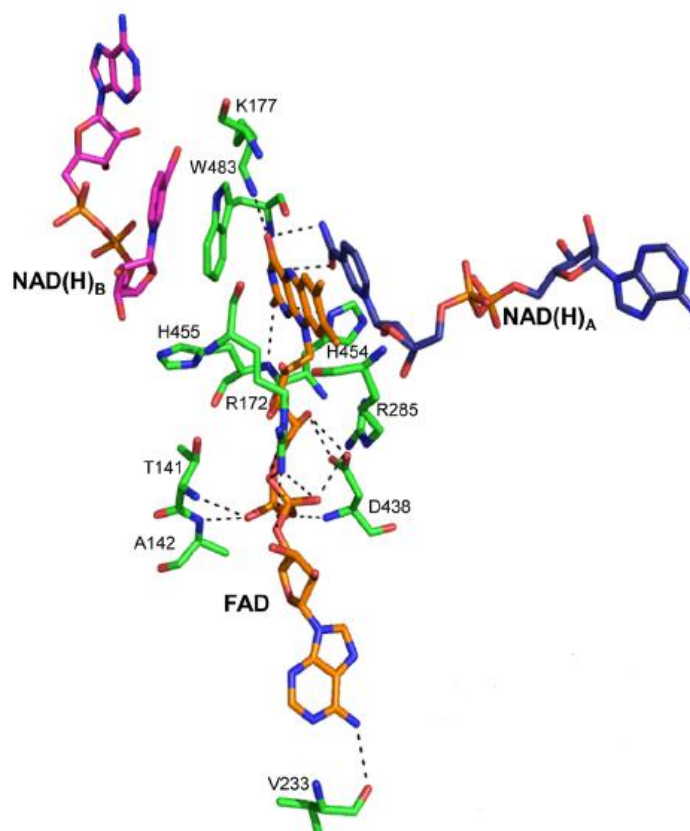
La unión de NADH a  $NADH_A$  muestra una conformación extendida con su apilamiento de nicotinamida entre la cara *Re* de FAD y los anillos de F310, conformación que parece óptima para la transferencia de carga, mientras que su grupo amida forma enlaces de hidrógeno con los residuos E314 y H454 (Villanueva, 2015). Su unión está estabilizada por una red de enlaces de hidrógeno que involucran a los residuos G308, F310, L311, E314,

---

## Introducción

E336, G399, E453, H454 y W483 (Ferreira, 2018). La unión a  $\text{NADH}_A$ , desplaza las cadenas laterales K177, F310 y H454 para acomodar la nicotinamida de  $\text{NADH}_A$ , produciendo un apilamiento entre los anillos de nicotinamida y flavina aparentemente óptimo para la transferencia de carga, formando un CTC  $\text{FADH}^-/\text{NAD}^+$  de larga duración (Ferreira, 2014). Los residuos K177 y E314 establecen la conformación del sitio activo, al unirse el NADH (Villanueva, 2015). En estado reducido u oxidado de AIF, la hélice  $\alpha$  173-180 del N-terminal (residuo P173), se apila contra el anillo de pirazina en la cara Si de FAD, modulando la afinidad enzimática por NADH, mientras que W483 se apila contra el anillo de pirimidina de FAD (Ferreira, 2014). Por último, F310 y H454 contribuyen al sitio activo compacto esencial para la unión de NADH, la estabilización de CTC y una fuerte afinidad de  $\text{NAD}^+$  para el estado reducido de hAIF (Ferreira, 2018).

El CTC formado para la estructura  $\text{AIF}_{\text{red}}:\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}_A$  es ineficiente en la transferencia de electrones, pero es capaz de inducir una reorganización conformacional de proteínas ligadas a redox y su posterior dimerización. Con la formación del CTC, la cadena lateral H454 sufre un cambio conformacional que interacciona y orienta la nicotinamida de NADH al sitio activo, modulando el punto medio del potencial de reducción de FAD. Estos cambios redox desplaza a la horquilla  $\beta$  (aa 190-202) que desencadena la remodelación del bucle C, restringiendo el acceso a NLS2 (NLS relacionado con el importe nuclear de AIF), y promueven la liberación de la horquilla  $\beta$  al solvente (Ferreira, 2013 y Sevrioukova, 2009). Estos cambios conformacionales inducen la formación alostérica del segundo sitio de unión de NADH no catalítico ( $\text{NADH}_B$ ) y la dimerización de la proteína (Romero, 2020) y relacionan la unión de NADH a la zona  $\text{NADH}_A$  con la función de hAIF como una oxidorreductasa dependiente de NADH (Villanueva, 2015).



**Figura 8. Sitios de unión FAD y NAD(H) en el complejo hAIF $\Delta_{1-102rd}$ :2NAD(H).** Red de enlaces H e interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión de FAD. Se muestran los átomos de carbono de FAD, NAD(H)<sub>A</sub>, y NAD(H)<sub>B</sub> en naranja, azul y rosa, respectivamente. **Fuente:** Ferreira (2014).

La segunda molécula de NAD(H) (NAD(H)<sub>B</sub>), identificada en el complejo hAIF $\Delta_{1-102rd}$ :2NAD(H), apila su nicotinamida en un lado de W483 y, en el otro lado de W483, se apila contra el anillo de pirimidina de FAD por su cara Si. La unión a NAD(H)<sub>B</sub> induce el desplazamiento de F582 y W196 para acomodar la adenina del NADH<sub>B</sub> mediante interacciones de apilamiento; W196 y E493 también contribuyen a estabilizar las fracciones de pirofosfato, ribosa y nicotinamida de la coenzima (Ferreira, 2014). La acomodación de NADH<sub>B</sub> es asistida por cambios conformacionales inducidos por redox de dos inserciones específicas en el dominio apoptótico de AIF, en la horquilla  $\beta$  (aa 190–202) y en la horquilla  $\beta$  del segmento 509–560 del dominio apoptótico, así como en la interfaz de dimerización molecular (segmento 439–453) (Ferreira, 2018). NAD(H)<sub>B</sub> está situado en la posición de las dos hélices cortas (517-524 y 529-533) de hAIF oxidado (parte del dominio C-terminal)

---

## Introducción

estabilizadas por un enlace de hidrógeno y un puente salino entre la cadena lateral de R201 y las de T526 y E531, respectivamente, estas hélices cortas disminuyen la accesibilidad del solvente al sitio activo del anillo de FAD a través de W483. Al reducirse hAIF por NADH<sub>B</sub>, las hélices cortas se desordenan y evitan su estabilización a través de la horquilla β (aa 190–202), particularmente con la cadena lateral R201 (Ferreira, 2014). El R201 resulta desplazado formando un enlace de H con las cadenas principales de Y204 y S202, contribuyendo así al desplegamiento de las hélices cortas, permitiendo la estabilización de NAD(H)<sub>B</sub> y liberando la orientación de la horquilla β (aa 190–202) al solvente (Ferreira, 2014).

Con la unión y reducción de NADH, AIF sufre dimerización. Además de formar dímeros, se ha observado la formación de trímeros y organizaciones superiores (Ferreira, 2014). Los cambios conformacionales que inducen la dimerización, cambios que involucran los motivos ricos en prolinas (543-554) de la región apoptótica, deben regular la unión de AIF a otras moléculas; o al estado oligomérico de AIF, paso de monómero a dímero, considerados como dos funciones podrían ser controladas por la función redox en base a las fluctuaciones en los niveles de NAD(H) afectando tanto en la mitocondria como a niveles citoplasmáticos y nucleares (Ferreira, 2013). En caso de la depleción de NADH, el equilibrio se desplaza a la forma monomérica de AIF que es más susceptible a la proteólisis del N-terminal y la translocación al citosol para iniciar la apoptosis, y así el estado redox trasciende las diferentes proteínas de interacción modulando la respuesta a vías metabólicas dependientes de NADH a la apoptosis (Sevrioukova, 2011).

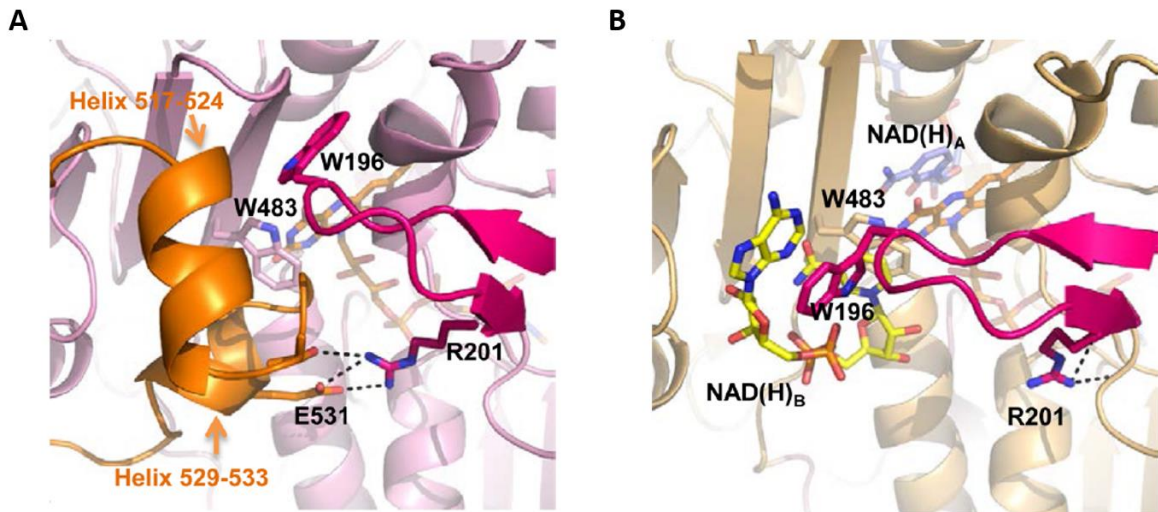
De forma general, se ha observado la importancia del doble papel biológico de AIF a nivel molecular, como el estado de oxidorreducción de hAIF es dependiente de la unión a su coenzima y la modulación del dominio apoptótico C-terminal.

### **2.2.3. Papel del residuo W483 en la función de hAIF**

El residuo W483 de hAIF se apila contra el anillo de pirimidina de FAD en NADH<sub>A</sub>, y forma el centro catalítico que realiza la función oxido-reductasa junto con las cadenas

laterales K177, F310 y H454 y la hélice  $\alpha$  en P173, modulando la interacción de FAD con el NADH.

También, el residuo W483 mantiene la misma posición tanto en estado oxidado como reducido evitando el apilamiento directo entre la nicotinamida y los anillos de isoaloxazina y pirimidina de FAD, forzando así a NAD(H)<sub>B</sub> a una conformación doblada (Ferreira, 2014).



**Figura 9. Cambios conformacionales observados en hAIF con la inducción a la dimerización mediante NADH.** A) Representación de la estructura hAIF<sub>ox</sub> y B) hAIF<sub>red</sub>:2NAD(H), se destacan los residuos W483, W196 y R201. En rosa se observa la horquilla  $\beta$  y las hélices cortas en naranja. Se muestran los átomos de carbono de FAD, NAD(H)<sub>A</sub>, y NAD(H)<sub>B</sub> en naranja, azul y amarillo, respectivamente. **Fuente:** Ferreira (2014).

En hAIF oxidado, el residuo W483 evita la accesibilidad del solvente al sitio activo del anillo de FAD separando las hélices cortas (517-524 y 529-533, Figura 9 A) de hAIF. Al reducirse hAIF, se reorganizan las hélices cortas de forma que se estabiliza NAD(H)<sub>B</sub> y la horquilla  $\beta$  (aa 190–202) sea accesible al solvente (Figura 9 B).

También, la presencia de NAD(H)<sub>B</sub> en la estructura hAIF<sub>red</sub>:NAD-(H) podría sugerir un camino alternativo, al involucrar su anillo de nicotinamida y W483 en la vía de transferencia de electrones hacia la superficie (Ferreira, 2014). Para obtener información sobre el funcionamiento de este residuo, una de las vías de investigación es realizar un estudio con mutaciones puntuales con distintos aminoácidos al triptófano en el residuo 483.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Estudiar la implicación del residuo W483 en la actividad NADH oxidasa de AIF.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Expresar y purificar las variantes de AIF $_{\Delta 77}$  (W483Y, W483L y W483G) a pequeña escala.
- Determinar el impacto de las mutaciones en la posición W483 en la correcta incorporación del cofactor flavínico al centro redox mediante caracterización espectroscópica.
- Evaluar el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad del dímero.
- Determinar la capacidad de reducción de AIF WT y de las variantes de AIF $_{\Delta 77}$  en presencia de NADH.

---

Objetivos

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

Los cDNAs de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIFmt $\Delta$ 1-77 se clonaron en el vector de expresión Pet-28a(+) (Novagen, catalogue number 69864-3) y se llevó a cabo su expresión heteróloga utilizando la cepa C41 (DE3) (Invitrogen) de *Escherichia coli*. Los cDNA presentan la forma mitocondrial de hAIF con una delección en  $\Delta$  1-77, que elimina los residuos de la hélice transmembrana, para la obtención de su forma soluble. Dentro del vector de expresión Pet-28a(+) (con resistencia a kanamicina), el cDNA se clona entre los sitios de NcoI y NdeI (Anexo 1. Fig. 1) con una cola de seis histidinas en el C-terminal que favorezca la posterior purificación de la proteína. La cepa C41 (DE3) contiene el lisógeno DE3 que porta el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lac UV5, promotor que requiere isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión (Invitrogen). Esta cepa deriva de la cepa BL21 (DE3), descendiente de la cepa de B de *E. coli* construida específicamente para la expresión de alto nivel de proteínas recombinantes, y presenta algunas mutaciones que previenen la muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas (Schreiber, 2017).

### 4.2. Transformación de células competentes con las distintas variantes de hAIF $\Delta$ 77

Para la transformación se tomaron 100  $\mu$ L de células competentes (*E. coli* C41) y plásmido (pET-28a(+); 1  $\mu$ L) en 1 mL de LB (10 g/L Triptona, 5 g/L extracto levadura, 10 g/L NaCl), mismos volúmenes para cada una de las 3 variantes de hAIF $\Delta$ 77. Se transformaron por choque térmico en condiciones de esterilidad. Las mezclas se dejaron incubando 15 minutos en hielo, después se calentaron en seco en el termobloque a 42 °C durante 50 segundos y, posteriormente, se dejaron 2 min en hielo. Para finalizar, se añadió 1 mL de medio LB y se realizó una incubación en agitación de 1 h 30 min a 37 °C para permitir que las células expresasen la resistencia antibiótica antes de sembrarlas en placa de cultivo para

---

## Materiales y métodos

su selección. Como controles positivo y negativo se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de células competentes sin transformar con 1 mL de medio LB por variante de hAIF $_{\Delta 77}$ .

A continuación, se sembraron cuatro placas de LB agar (10 g/L Triptona, 5 g/L extracto levadura, 10 g/L NaCl y agar al 1,5%) por variante de hAIF $_{\Delta 77}$ , tres con kanamicina 0,05 mM (dos siembras con células transformadas y una restante como control negativo) y un control positivo sin kanamicina. Luego se sembraron las placas para el control positivo con 50  $\mu\text{L}$  de células competentes sin transformar, de la misma forma para los controles negativos pero con adición de kanamicina, y dos siembras de células transformadas por variante hAIF $_{\Delta 77}$ , una de 50  $\mu\text{L}$  y otra de 100  $\mu\text{L}$ . En el control negativo se adiciona antibiótico para comprobar que no hay crecimiento de las células competentes ya que están sin transformar. Para finalizar, una incubación overnight a 37 °C.

Tras la incubación, se comprobó que no existiesen indicios de contaminación en las placas de los controles y se aislaron 6 colonias distintas de cada variante de hAIF $_{\Delta 77}$  que se resembraron en una misma placa de cultivo de LB con antibiótico y se incubaron de 10 a 12 horas a 37 °C.

### **4.3. Prueba expresión a pequeña escala**

Para hacer el preinóculo se cultivó una colonia por cada variante de hAIF $_{\Delta 77}$ , aislada de la placa de resiembra, en 10 mL de medio 2xYT (16 g/L Triptona, 10 g/L extracto de levadura y NaCl 5 g/L) con kanamicina 0,05 mM. Las células se incubaron overnight a 37 °C con agitación a 180 r.p.m.

Tras la incubación, se cogieron 500  $\mu\text{L}$  de preinóculo por cada variante de hAIF $_{\Delta 77}$  en 10 mL de 2xYT con kanamicina y se le añadió IPTG 0,5 mM. Como control, se añadieron otros 500  $\mu\text{L}$  de preinóculo a 10 mL de medio sin el inductor IPTG. Las células transformadas se volvieron a incubar en medio 2xYT a 180 r.p.m a 37 °C durante 1 h 30 min aproximadamente. Mientras tanto, se midió la densidad óptica (O.D) a 600 nm a distintos tiempos hasta alcanzar una absorbancia de 0.5, momento en el que se añadió el inductor IPTG, en condiciones de esterilidad, y se dejó 24 horas en incubación a 37 °C.

A continuación, se centrifugó 1 mL de células transformadas durante 4 min a 3300 r.c.f. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 700  $\mu$ L de tampón fosfato (50 mM, pH = 7,4). Se sonicó con 3 pulsos de 30 segundos. Se centrifugó de nuevo a 6700 r.c.f durante 7 min, se recuperó el pellet y se añadieron 700  $\mu$ L de tampón fosfato (50 mM, pH = 7,4). Finalmente, se cargaron las muestras en una electroforesis SDS-PAGE al 12% (explicación técnica apartado 4.6.).

#### **4.4. Producción a media escala de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF $_{\Delta 77}$**

Una vez comprobada la correcta expresión de las distintas proteínas mediante el ensayo anterior, se procede a su producción a mayor escala utilizando una de las seis colonias aisladas tras la transformación (apartado 4.2), que sobrepresaban la proteína de interés. La colonia seleccionada por cada mutante, en condiciones de esterilidad, se cultivó en ½ L de medio 2xYT, kanamicina a 0,05 mM y se incubó a 180 r.p.m a 37 °C overnight. Por cada variante de hAIF $_{\Delta 77}$  (W483Y, W483L y W483G) se prepararon un total de 20 L de medio de cultivo 2xYT con 50 mL preinóculo por cada litro de medio 2xYT, 0,05 mM de kanamicina y 0,02 mM de riboflavina (8 mg/ml). Una vez alcanzada la D.O. de 0,5, como se indica en el apartado anterior. Se añadió el inductor IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Las células competentes se dejaron incubar a 180 r.p.m a 37 °C durante 24 horas.

Tras la incubación, se centrifugaron los 20 litros de células C41 con rotor (GRF-L-1000-6) en centrífuga GYROZEN 2236R a 4 °C a 6000 r.p.m (8000 r.c.f) durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -20 °C.

#### **4.5. Purificación de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF $_{\Delta 77}$**

##### **4.5.1. Purificación por cromatografía de afinidad**

Como se ha comentado anteriormente, las distintas variantes de hAIF se generaron como proteínas de fusión con una cola de seis histidinas en su extremo C-terminal para

---

## Materiales y métodos

favorecer su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad gracias a la unión de las histidinas a metales.

Antes de la purificación se realiza un paso previo para la extracción de proteínas o de preparación del extracto crudo que consiste en los siguientes pasos. Primero, el pellet de 20 L de células cultivadas se resuspenden en 150 mL de Tris-HCl (50 mM, pH= 8), y se mezclan homogéneamente junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). A continuación, las células se lisan en frío por sonicación de 10 a 12 ciclos de 30 segundos, a una amplitud del 70% y pulsos de 0,5 s, con una parada de 30 s entre ciclos. Posteriormente, se centrifugan a 21600 r.c.f (rotor (GRF-L-250-6) centrífuga GYROZEN 2236R) a 4 °C durante 30 min, se retira el sobrenadante y el extracto crudo se centrifuga durante 1 hora más en las mismas condiciones.

Tras el lisado de las células y la extracción de proteínas se purificó la proteína recombinante de interés en columna de afinidad con el mecanismo His6-tag y el método IMAC (Immobilised metal ion affinity chromatography). Para el método IMAC se utilizó un lecho que consiste en una resina de afinidad con metal inmovilizado, gel de agarosa (Sephacrose 6 Fast Flow gel; GE Healthcare) modificada con un ligando quelante (NTA, ácido Nitrilotriacético) diseñado para unirse a la proteína recombinante por His6-tag.

Para la preparación de la columna de afinidad se pasaron 10 V (volúmenes, 1 V = 5 mL) de agua destilada, luego se añadió 5 mL de lecho y activado con 1 V de Ni<sup>2+</sup> (5 mL de NiSO<sub>4</sub> al 0,1 M), otros 10 V de agua destilada y, para finalizar, 10 V de tampón Tris 50 mM a pH=8.

A continuación, se añadió Imidazol 4 mM y KCl 0,4 M a los extractos crudos de cada una de las variantes de la proteína hAIF<sub>Δ77</sub> y se mezcló con la matriz, es decir, con el preparado de la columna de afinidad y se incubó en agitación durante 40 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizó el empaquetado de la columna, que consistió en pasar el incubado (unión de la proteína recombinante a la matriz) por la columna y, a continuación, por el *Akta* FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

Antes de la purificación de la columna con el *Akta*, se realizó una limpieza del sistema pasando 50 mL de agua destilada. Para retirar el agua destilada del *Akta* se pasa Buffer A (tampón fosfato a 50 mM a pH= 7,4, 4 mM de Imidazol y 0,4 M de KCl) a un flujo de 4 mL/min. Todos los tampones y el agua destilada se filtraron al vacío (filtración Büchner) con un filtro orgánico de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Posteriormente, se conecta la columna de afinidad empaquetada al *Akta* y comienza la carrera. Ésta consistió en correr simultáneamente un flujo de 4 mL/min de Buffer A y Buffer B (tampón fosfato a 50 mM a pH = 7,4 y 1 M de Imidazol) al 50% para crear un gradiente de concentración de Imidazol del 4% hasta el 50% durante 150 mL. A un gradiente de Imidazol determinado, éste competirá por la cola de histidinas de la proteína recombinante y se eluirá (Anexo 1. Fig. 2A). Se recogieron fracciones de 5 mL.

Una vez recogida las fracciones, el color de la proteína recombinante permitió seleccionar de forma visual aquellas que contenían la proteína de interés. A modo de comprobación y selección, se hizo un espectro de absorbancia UV-vis (espectrofotómetro SPECORD 200 PLUS) para la medición del ratio 280 nm/450 nm que indica la pureza existente de la muestra la cual se seleccionan con un ratio por encima de 10.

Tras la selección de las fracciones de interés, se concentraron utilizando una diálisis inversa en presencia de azúcar. Transcurridas unas 10 – 12 horas, se realiza un paso previo a las fracciones concentradas para una segunda purificación por exclusión molecular. Este paso consiste en cambiar el medio en el que se encuentra la proteína recombinante concentrada mediante diálisis, con el objetivo de reducir las concentraciones de sales y de Imidazol. Se utilizó una columna PD-10, se pasó 10 mL de agua destilada, se equilibró con 25 mL de tampón de exclusión molecular (tampón fosfato 50 mM a pH= 7,4 y 150 mM NaCl) y un volumen máximo de 2,5 mL de proteína de interés concentrada seguida de 3,5 mL de Buffer de exclusión molecular. En el caso de que se supere el volumen máximo de 2,5 ml de proteína de interés, se vuelve a equilibrar la columna con más buffer.

Una vez acabada este proceso de purificación de una variante de hAIF $\Delta$ 77 con la columna de cromatografía de afinidad utilizada se ha de regenerar la columna y prepararla

---

## Materiales y métodos

de nuevo para la purificación de una distinta variante de hAIF<sub>Δ77</sub>. La matriz del interior de la columna de afinidad se regeneró con 5 V de Imidazol al 1.5 M, 5 V de NaCl al 1M; se limpió al pasar 10 V de agua destilada y se guardó con 10 V de etanol al 20%. Posteriormente, para la preparación de la columna de afinidad, se ha de desactivar el Ni<sup>2+</sup> y luego cambiarlo. Primero, se lavó la columna al pasar 10 V de agua destilada, después se queló el Ni con 1 V de EDTA al 0,05 M. A continuación, se lavó de nuevo con 10 V de agua destilada; y, para equilibrar la columna, se pasó 1 V de NiSO<sub>4</sub> al 0,1 M, 10 V de agua destilada y 10 V de Tris a 50 mM a pH= 8.

### 4.5.2. Purificación por cromatografía de exclusión molecular

Este proceso se realiza con el objetivo de conseguir una mayor purificación por medio de la exclusión molecular. Esta consiste en una restricción de moléculas por tamaño formando una resina con una matriz de partículas esféricas con poros de diámetros seleccionados de forma que las moléculas con el tamaño del poro quedan retenidas y las de mayor tamaño se eluyen antes.

Un paso previo a la purificación por exclusión molecular del concentrado de proteína recombinante, es la separación de posibles residuos mediante centrifugación (14500 r.c.f durante 5 min a 4 °C). A continuación, se toma el sobrenadante y se enrasa a 5 mL con buffer de exclusión. A modo de limpieza, se pasó buffer de exclusión por el *Akta* a un flujo de 20 mL/min. Para la preparación de la purificación se rellena el loop de buffer de exclusión a un flujo de 5 mL/min. A través del *Akta* se pasa tampón de exclusión molecular (flujo de 1 mL/min) por la columna de exclusión y, finalmente, se inyectó los 5 mL de proteína recombinante al *Akta* para su paso por la columna de exclusión por tamaño (Anexo 1. Fig. 2B). Por último, se recogen fracciones de 5 mL hasta la elución de la proteína de interés.

Acabada la purificación, se realizan espectros de absorbancia UV-vis (espectrofotómetro SPECORD 200 PLUS) a las fracciones con la proteína de interés para la medida de sus ratios de concentración. A continuación, se vuelve a concentrar la proteína mediante diálisis inversa.

Para finalizar, se requiere cambiar el medio de la proteína recombinante para su posterior almacenamiento y caracterización. Para ello, se limpia la columna PD-10 con 10 mL de agua destilada, se equilibra la columna con 25 mL de tampón fosfato (50 mM a pH= 7,4); y se dializa con un volumen máximo de 2,5 mL de la proteína de interés a la que se añaden 3,5 mL de tampón fosfato (50 mM a pH= 7,4).

Previo al almacenamiento (-80 °C), se realizaron espectros de absorbancia UV-vis (espectrofotómetro SPECORD 200 PLUS) a las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub> purificadas para medir la concentración a la que se encuentran con la ecuación de Lambert-Beer:

$$Abs = C \cdot \epsilon \cdot l$$

Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 451 nm y como factor de extinción molar se utilizó por defecto el de la proteína hAIF<sub>Δ77</sub> WT (13,6 mM<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>).

#### **4.6. Técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Esta técnica ha sido utilizada para la prueba de expresión a pequeña escala y para caracterizar la estabilidad del dímero de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub> (apartado 4.3. y apartado 4.7.2., respectivamente). Consiste en la separación de las proteínas por peso molecular, desnaturalizando y otorgando a las proteínas carga negativa con dodecilsulfato sódico (SDS), mediante un campo eléctrico.

Para la formación del gel de poliacrilamida, en el cual se separan las proteínas, se ha de polimerizar la acrilamida previamente a través de un agente entrecruzador (bisacrilamida), junto al persulfato de amonio (APS) y un catalizador (TEMED). Dependiendo del porcentaje de acrilamida utilizado, se forma un diámetro distinto de poro por el cual se requiera para separar el peso molecular de la proteína de interés. En este caso se emplearon geles con un porcentaje de acrilamida del 12%. La composición de los geles se muestra en la Tabla 1:

**Tabla 1. Composición de los geles para la electroforesis SDS-PAGE**

	<b>Gel separador 12%</b>	<b>Gel concentrador 4%</b>
<b>Agua</b>	3,34 mL	3,62 mL
<b>Acrilamida 30%</b>	4 mL	666 $\mu$ L
<b>Tris*</b>	2,5 mL	625 $\mu$ L
<b>SDS 20%</b>	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
<b>APS 10%</b>	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L

(\*) Gel separador: Tris 1.5 M y pH = 8.8. Gel concentrador: Tris 1M y pH = 6.8.

El tampón de electroforesis está compuesto por 0,025 M Tris, pH 8,8, 0,2 M glicina y 12,5% SDS. En cada pocillo del gel se añaden 15 $\mu$ L de la muestra junto con 3 $\mu$ L de tampón de carga 5x (5 mM Tris, 12,5% SDS, 25% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 35% glicerol y 0,1% de azul de bromofenol) previo calentamiento de estas. Los geles de poliacrilamida al 12% se prepararon utilizando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN<sup>®</sup> de Bio-Rad y se dejaron corriendo con una corriente de 20 mA. Se controla el tiempo que se deja corriendo para que no haya pérdida de las muestras.

#### **4.7. Caracterización de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF <sub>$\Delta$ 77</sub>**

##### **4.7.1. Determinación de los coeficientes de extinción molar de las variantes de hAIF <sub>$\Delta$ 77</sub>**

Para determinar los coeficientes de extinción molar de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF <sub>$\Delta$ 77</sub>, se ajustó la concentración de proteína a una absorbancia de 0,1 a una longitud de onda de 451 nm (espectrofotómetro SPECORD 200 PLUS). A continuación, de un volumen inicial de 800  $\mu$ L de proteína en tampón fosfato (50 mM a pH = 7,4), se desnaturalizaron 400  $\mu$ L con cloruro de Guanidinio 6 M y se utilizaron los otros 400  $\mu$ L para la medición de la concentración de hAIF <sub>$\Delta$ 77</sub>. Después, se hizo una centrifugación a 9700 r.c.f durante 3 min, y luego un barrido espectral del sobrenadante de ambos duplicados. Las

absorbancias se corrigieron con el Factor de Dilución x 2. Tras la centrifugación del duplicado desnaturalizado, el cofactor FAD queda libre y se midió su absorbancia a 450 nm. Como la concentración de FAD ha de ser la misma que de AIF (estequiometría 1:1) y el coeficiente de extinción molar de FAD libre que absorbe a 450 nm ( $11,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) es conocido, se calculó el coeficiente de extinción para hAIF<sub>Δ77</sub> con la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs \text{ FAD}}{Abs \text{ AIF}} = \frac{\epsilon \text{ FAD}}{\epsilon \text{ AIF}}$$
$$\epsilon \text{ AIF} = \frac{\epsilon \text{ FAD} \cdot Abs \text{ AIF}}{Abs \text{ FAD}}$$

#### 4.7.2. Evaluación de la estabilidad del dímero

La finalidad de este ensayo es caracterizar la estabilidad en la formación del dímero de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub> a una concentración de 3 μM en el medio Kpi (50 mM y pH = 7,4) y si existe una posible influencia por parte del cofactor con la presencia de NADH en el medio. Se utilizó el entrecruzador BS3 (bis(sulfosuccinimidil)suberato) para conferir una mayor estabilidad al fortalecer las uniones estructurales de enlaces amina a amina entre proteínas hAIF<sub>Δ77</sub> y mantener los oligómeros en la electroforesis desnaturalizante. Se realizó una incubación de cada variante de hAIF<sub>Δ77</sub> con BS3 durante 30 min a temperatura ambiente en presencia o ausencia de NADH. Las concentraciones de BS3 y NADH fueron de 100 veces superior al de la concentración de proteína. Para parar las reacciones de entrecruzamiento se añadió bromofenol loading buffer desnaturalizante y, a continuación, se hirvió durante 5 min a 100 °C. Para finalizar el ensayo, se corrieron las muestras en gel SDS-PAGE al 12%. Técnica y composiciones de electroforesis mencionado en el apartado 4.6.

#### 4.7.3. Cinética en estado estacionario

Se caracterizó la actividad oxidorreductasa in vitro del NADH de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub> a través de la actividad diaforasa con 95 μM de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de electrones. Se midió la reducción del aceptor de electrones (DCPIP) por parte de la enzima durante el primer minuto, a una

---

## Materiales y métodos

absorbancia de 620 nm y un coeficiente de extinción molar de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a una concentración final de 95 mM; una concentración final 0,2 mM de hAIF $_{\Delta 77}$ ; y a distintas concentraciones de NADH (diluciones seriadas de NADH a partir de 5 mM hasta 0,06 mM).

A partir de cada concentración de NADH se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se enrasó con tampón fosfato (Kpi a 50 mM y pH= 7,4) hasta un volumen final de 1 mL. Las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible a temperatura ambiente (25 °C).

Los datos extraídos del ensayo se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten pudiéndose hallar los valores  $k_{cat}$  y la  $K_m$ , con la siguiente ecuación:

$$\frac{v}{e} = \frac{k_{cat}[S]}{K_m + [S]}$$

donde “e” representa la concentración de la enzima,  $K_m$  la constante de Michaelis, y la  $k_{cat}$  el número máximo de recambio de la enzima. Los valores mencionados anteriormente se calcularon mediante el programa SigmaPlot.

### 4.7.4. Tiempo de vida media del complejo de transferencia de carga

Para evaluar la estabilidad del complejo de transferencia de carga (CTC) de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF $_{\Delta 77}$  se midió el espectro de absorbancia UV-visible (espectrofotómetro Cary 100 Bio) de hAIF $_{\Delta 77}$  a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  en tampón fosfato (Kpi a 50 mM y pH = 7,4). Tras realizar un espectro de la proteína oxidada en ausencia de NADH, se añadió el NADH a un ratio de 1:1,5 de proteína por concentración de NADH, se redujo totalmente la proteína y comenzó la reoxidación. Se hizo un seguimiento de la reoxidación realizando espectros de absorción medidos de 850 nm a 250 nm a 25 °C hasta la completa reoxidación del cofactor FAD. Las gráficas representativas de los espectros de absorción UV-vis del seguimiento de la evolución de la reoxidación de la proteína se realizaron con el programa SigmaPlot.

A continuación, para la proteína nativa y cada variante de hAIF $_{\Delta 77}$ , se tomaron las absorbancias de las longitudes de onda de 700 nm y de 452 nm para representar en una

gráfica el porcentaje de CTC y el porcentaje de proteína reoxidada, respectivamente, en el tiempo. Las gráficas de porcentaje de CTC y porcentaje de proteína reoxidada respecto al tiempo se representaron mediante la siguiente ecuación exponencial:

$$y = a \cdot e^{-bx}$$

siendo, para ambas ecuaciones, “*a*” es la Amplitud máxima para cada valor de tiempo y “*b*” la constante de la velocidad de decaimiento. Los datos de las gráficas realizadas con la ecuación exponencial se representaron con el programa SigmaPlot.

Para finalizar, se realizó un ajuste a la ecuación exponencial mencionada anteriormente, calculando el tiempo (*x*) necesario para que “*y*” sea igual a la mitad de la absorbancia máxima, para obtener el tiempo de vida media del CTC y el tiempo medio de la reoxidación del cofactor FAD para la proteína nativa y las variantes de hAIF<sub>Δ77</sub> (W483Y, W483L y W483G).



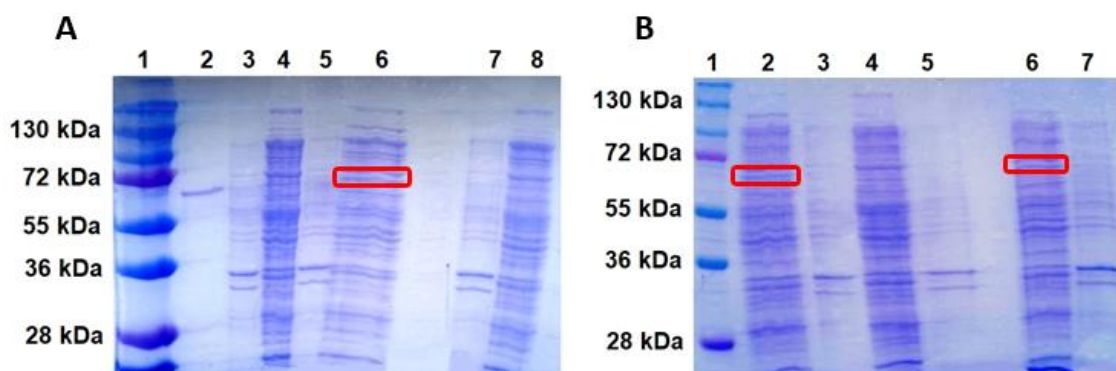
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Expresión y purificación de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub>

#### 5.1.1. Pruebas de expresión a pequeña escala

Para comprobar la correcta expresión de la proteína nativa de hAIF<sub>Δ77</sub> y de las variantes W483Y, W483L y W483G tras la transformación de las células *E.coli* C41 (DE3) con el plásmido de expresión pET28a(+) portando cada una de las variantes, y como paso previo a la expresión a media escala, se realizó una prueba de expresión a pequeña escala mediante inducción de las colonias con IPTG 0,5 mM durante 24 horas a 37 °C y posterior evaluación de la expresión de la proteína por electroforesis SDS-PAGE, como se muestra en la figura 10 para la variante de tirosina (hAIF<sub>Δ77</sub> W483Y).

En el gel de la figura 10A, los carriles 3 a 6 muestran como control positivo una muestra de hAIF<sub>Δ77</sub> WT purificada anteriormente, mientras las hAIF<sub>Δ77</sub> WT, correspondientes a los carriles 7 y 8, son expresiones de la proteína de la colonia transformada en el presente estudio.



**Figura 10. Expresión de hAIF<sub>Δ77</sub> en la cepa de *E.coli* C41 (DE3), tras su inducción con IPTG 0,5 mM en 24 h a 37 °C.** Los carriles 1 en ambos geles contienen el marcador de peso molecular en el que se muestran bandas con sus correspondientes pesos moleculares a la izquierda del gel. A) El carril 2 se corresponde a hAIF<sub>Δ77</sub> WT purificada. Como control positivo se muestran los carriles 3 y 4, parte insoluble y sobrenadante o parte soluble, respectivamente, expresiones de la hAIF<sub>Δ77</sub> WT sin inducir; y en los carriles 5, pellet o parte insoluble, y 6, parte soluble, expresiones de la hAIF<sub>Δ77</sub> WT inducidos con IPTG. Y en los carriles 7 y 8, parte insoluble, y parte soluble, respectivamente, expresiones de la colonia hAIF<sub>Δ77</sub> WT transformada en el presente estudio sin inductor IPTG. B) Las pruebas de expresión de W483Y se observan en el carril 2, parte soluble, y

## Resultados

carril 3, parte insoluble, inducidas con IPTG (0,5 mM 24 horas); y en los carriles 4 y 5, parte soluble y parte insoluble, respectivamente, sin inductor IPTG. Los carriles 6, parte soluble, y 7, parte insoluble, se corresponden a la hAIF $\Delta$ 77 WT, transformada en el presente estudio, e inducida con IPTG (0,5 mM 24 horas a 37°C).

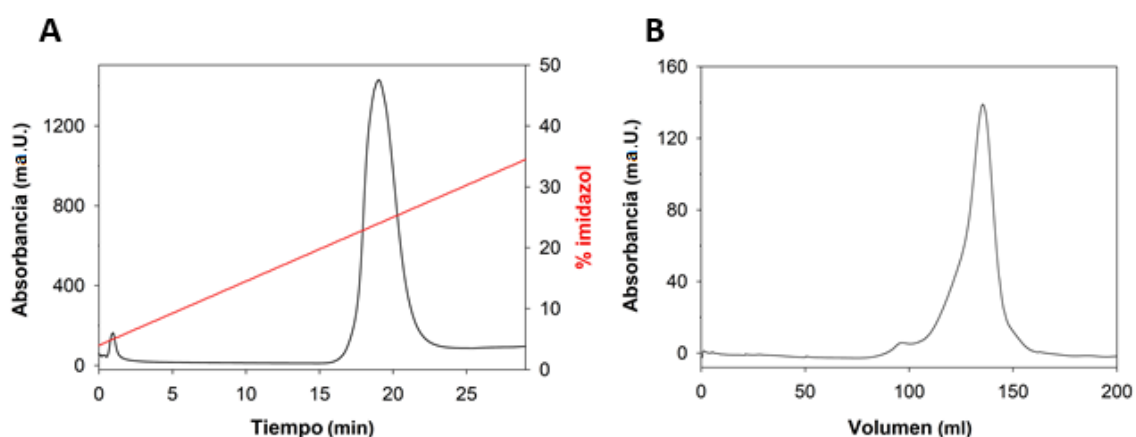
En el carril 6 de la figura 10A (recuadrado en rojo) se observa la banda de expresión de la proteína hAIF $\Delta$ 77 WT que se corresponde con un peso molecular de unos 62 kDa, peso molecular propio del inserto de la proteína nativa.

En la figura 10B, se muestra la expresión de la variante W483Y de hAIF $\Delta$ 77 (carriles 2 a 5). Por último, los carriles 6 y 7 corresponden a la hAIF $\Delta$ 77 WT, producidas en este estudio.

En la figura 10B, solo se observó expresión de la proteína hAIF $\Delta$ 77 en las fracciones solubles de hAIF $\Delta$ 77 W483Y (carril 2) y de la colonia con hAIF $\Delta$ 77 WT (carril 6, señalada en rojo). El análisis de la expresión de las variantes W483L Y W483G dio un resultado similar al mostrado para W483Y.

### 5.1.2. Purificación de las variantes de hAIF $\Delta$ 77

Las purificaciones de la proteína hAIF $\Delta$ 77 para las variantes W483Y, W483L y W483G se realizaron por medio de una cromatografía de afinidad utilizando el gel IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) activado con níquel, seguida de una segunda etapa de purificación mediante una cromatografía de exclusión molecular por tamaño.

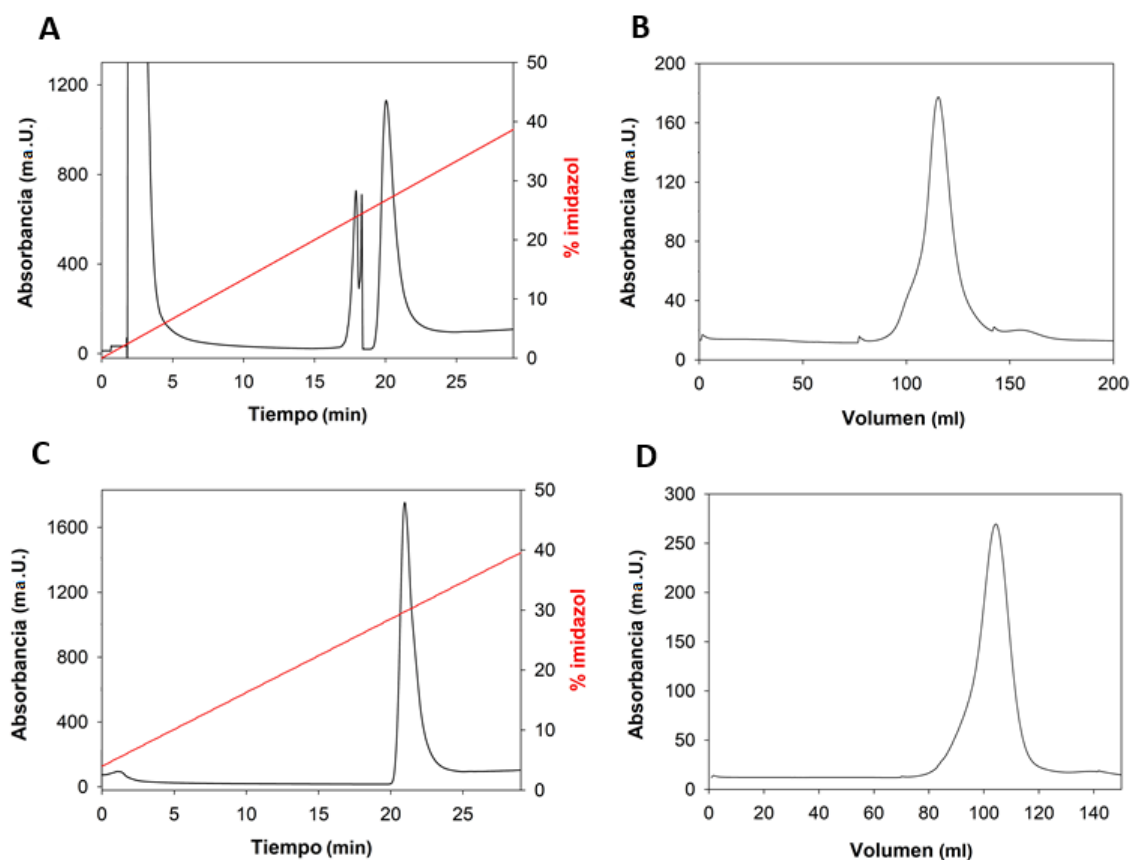


**Figura 11. Perfil de elución de la variante W483Y de hAIF $\Delta$ 77 en su purificación por cromatografía de afinidad (A) y por su cromatografía de exclusión molecular (B).** En la cromatografía de afinidad las proteínas son eluidas en un gradiente de imidazol de entre 40 mM y 500 mM en tampón fosfato 50 mM a pH= 7,4. En

*la cromatografía de exclusión molecular la proteína hAIF<sub>Δ77</sub> W483Y eluida en tampón fosfato potásico 50 mM a pH= 7,4 y 150 mM NaCl a un flujo de 1 mL/min.*

En la figura 11A, al igual que en las figuras 12A y 12C, se muestra de color rojo el gradiente de concentración de imidazol con un intervalo de entre 40 mM y 500 mM, y en negro, el perfil de elución medido en absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. En la figura 11A, se observa una elución de la variante W483Y a una concentración de entre 230 mM y 260 mM de imidazol. Se recogieron fracciones de 5 mL con la proteína de interés eluida y se midieron las absorbancias UV-visible para conocer la pureza de la proteína según su ratio de absorbancia Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>450</sub>. Se seleccionaron las muestras cuyo ratio 280 nm/450 nm de proteína pura es en torno o superior a 10, espectro correspondiente con las flavinas, y se juntaron para proceder a su concentración mediante diálisis inversa con sacarosa. Además, se realizó una posterior cromatografía de exclusión molecular (figuras 11B, 12B y 12D), perfil de elución medido en absorbancia a 280 nm. En la figura 11B, se observa un pico máximo de elución de la variante W483Y a un volumen de 135 mL.

## Resultados



**Figura 12.** Perfil de elución de las variantes W483L y W483G de hAIF $_{\Delta 77}$  en su purificación por cromatografía de afinidad A y C, respectivamente, y por su cromatografía de exclusión molecular B y D, respectivamente. En la cromatografía de afinidad las proteínas son eluidas en un gradiente de imidazol de entre 40 mM y 500 mM en tampón fosfato 50 mM a pH= 7,4. En la cromatografía de exclusión molecular las proteínas hAIF $_{\Delta 77}$  W483L y W483G eluidas en tampón fosfato potásico 50 mM a pH= 7,4 y 150 mM NaCl a un flujo de 1 mL/min.

En la figura 12A se muestra el perfil de elución de la variante W483L. En dicho perfil, se observan dos picos, el primero debido a impurezas, y el segundo corresponde a la variante W483L que se eluye a una concentración de entre 280 y 290 mM de imidazol. Como se observa en la figura 12C, la variante W483G se eluyó a una concentración de imidazol de entre 290 y 300 mM. Se siguió el mismo procedimiento anterior para las variantes W483L y W483G. Para la cromatografía de exclusión en las figuras 12B y 12D, se observa un pico máximo de elución a un volumen de 119 mL y 104 mL, respectivamente.

Como se ha observado con los perfiles de elución correspondientes a la purificación por cromatografía de afinidad, la variante W483Y se eluye a menor concentración de

imidazol respecto a las variantes W483L y W483G. Además, en los perfiles de elución por cromatografía de exclusión molecular se evidencia que la mutación de las variantes W483L y W483G efectúa un mayor radio hidrodinámico y, por lo tanto, su elución ocurre antes.

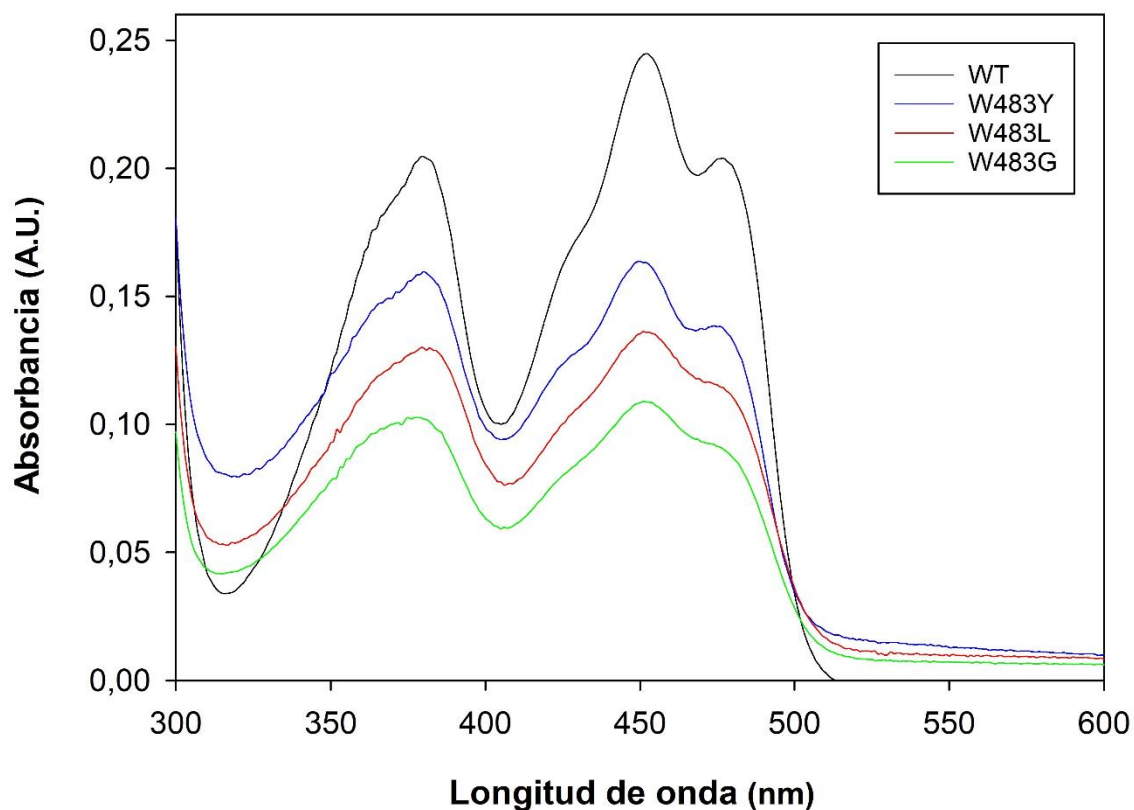
## **5.2. Caracterización de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF $\Delta$ 77**

### **5.2.1. Espectros de absorción UV-visible de AIF WT, y determinación de sus coeficientes de extinción**

Los espectros de absorción de las variantes W483Y, W483L y W483G se asemejaron al de la proteína hAIF $\Delta$ 77 WT que muestra dos máximos en la región del visible, el primero a 380 nm y el segundo, a 452 nm que son propios del cofactor en su forma oxidada (FAD). Como se puede observar en la figura 13, la variante W483Y presenta un hombro muy similar al de la proteína nativa (banda IV, tabla 2); en cambio, el espectro difiere más en las mutaciones con Leucina (W483L) y Glicina (W483G), lo que indicaría que estas mutaciones están modificando el entorno de la flavina.

Debido a la diferencia de tamaño del aminoácido de Glicina frente al del triptófano o al de cualquiera de las otras dos variantes en la posición 483, esta mutación presenta mayores diferencias en su espectro de absorción con respecto a la WT o a las variantes W483Y y W483L.

Resultados



**Figura 13.** Espectros de absorción UV-vis de la proteína hAIF $_{\Delta 77}$  WT y sus variantes en fosfato 50 mM, pH = 7,4. La proteína hAIF $_{\Delta 77}$  WT está a una concentración de 18  $\mu$ M; las mutantes de hAIF $_{\Delta 77}$  de W483Y a 12  $\mu$ M, de W483L a 10  $\mu$ M y de W483G a 8  $\mu$ M.

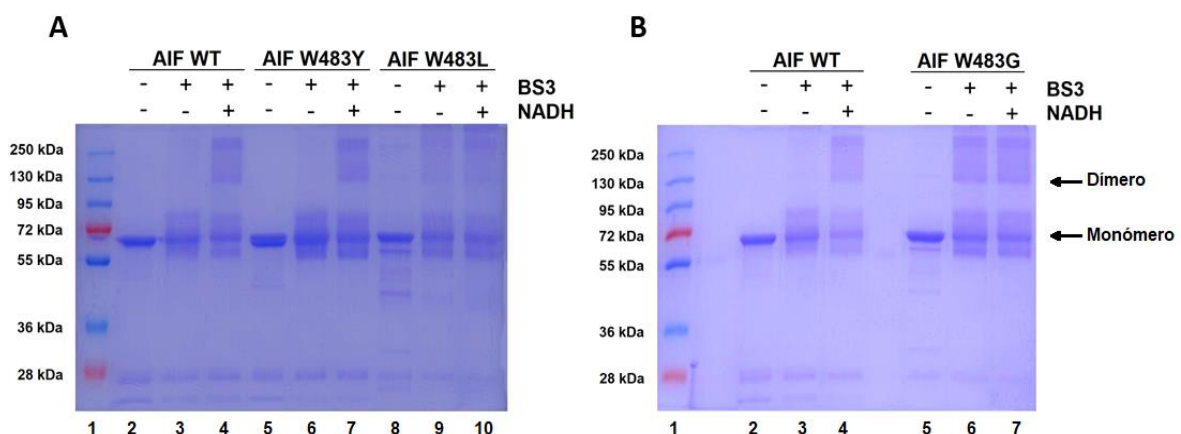
**Tabla 2.** Caracterización del espectro de absorción UV-visible de la proteína hAIF $_{\Delta 77}$  WT y las variantes W483Y, W483L y W483G.

Variantes hAIF $_{\Delta 77}$	Banda I ( $\lambda$ max; *)	Banda II ( $\lambda$ max; *)	Banda III <sub>(hombro)</sub> ( $\lambda$ min; *)	Banda IV <sub>(hombro)</sub> ( $\lambda$ max; *)	$\epsilon^{**}$ a 452 nm ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
WT	380	452	469	477	13,6
W483Y	380	450	471	474	13,4 $\pm$ 0,001
W483L	380	451	471	472	12,2 $\pm$ 0,001
W483G	378	451	470	470	12,1 $\pm$ 0,002
[*] = nm					
[**] = Coeficiente de extinción molar					

Como se recoge en la tabla 2, las variantes W483L y W483G presentan un menor coeficiente de extinción molar que la variante W483Y respecto a la WT. Esto se debe a que el cambio de Triptófano por Tirosina es más conservativo y, por lo tanto, presenta un menor cambio en el entorno del grupo prostético FAD, que en el caso de las mutaciones por Leucina y Glicina. Estas mutaciones medidas a 452 nm impiden una mayor absorción de luz en el cofactor FAD, por lo tanto, presenta un coeficiente de extinción molar menor que el WT.

### 5.2.2. Efecto de las mutaciones W483Y, W483L y W483G en la estabilidad del dímero

Una de las características de la proteína nativa hAIF, es su dimerización cuando se reduce en presencia de NADH (Ferreira, 2014), propiedad que podría verse alterada por las mutaciones a estudio en este trabajo. En este ensayo se ha caracterizado la estabilidad en la formación del dímero de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF $_{\Delta 77}$  y cómo influye la presencia o ausencia de NADH en la dimerización. Este ensayo se realiza mediante electroforesis en presencia de un entrecruzador (BS3) para conferir estabilidad tras la formación del dímero y mantener los oligómeros durante la electroforesis desnaturalizante.



**Figura 14. Ensayos de dimerización de la proteína hAIF $_{\Delta 77}$  WT y las variantes W483Y, W483L y W483G.** Los carriles 1 A y 1 B contienen el marcador de peso molecular en el que se muestran 7 bandas con sus correspondientes pesos a la izquierda del gel. En la imagen A y B, los carriles 2-4 corresponden a hAIF $_{\Delta 1-77}$  silvestre purificada sin tratar, tratada con BS3 y tratada con BS3 + NADH, respectivamente. A) Los carriles 5-7 corresponden a hAIF $_{\Delta 1-77}$  W483Y purificada sin tratar, tratada con BS3 y tratada con BS3 + NADH, respectivamente. Los carriles 8-10 corresponden a hAIF $_{\Delta 1-77}$  W483L purificada sin tratar, tratada con BS3 y

---

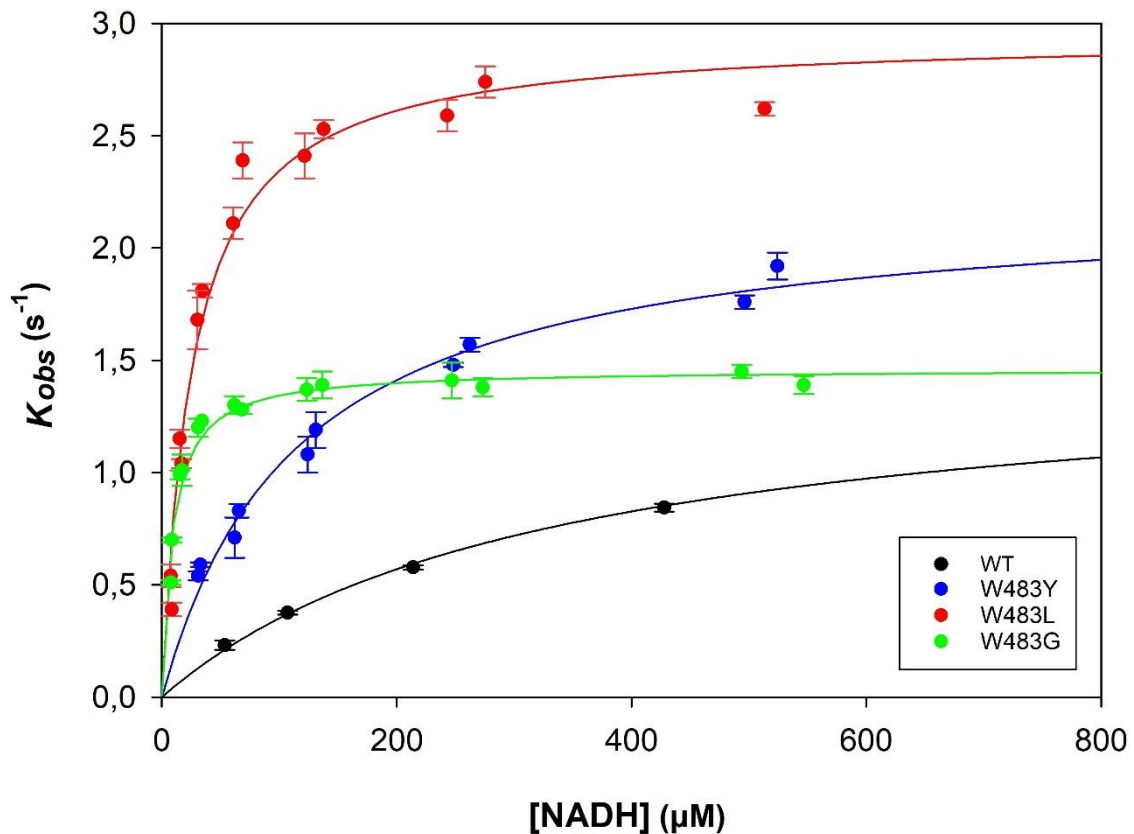
## Resultados

*tratada con BS3 + NADH, respectivamente. B) Los carriles 5-7 corresponden a hAIF $\Delta$ 1-77 W483G purificada sin tratar, tratada con BS3 y tratada con BS3 + NADH, respectivamente. Todos los carriles contienen la misma concentración de proteína: silvestre 3  $\mu$ g, W483Y 3  $\mu$ g, W483L 3  $\mu$ g y W483G 3  $\mu$ g.*

Como resultado se observa que la mutación con Tirosina (W483Y; fig. 14A) en el estado oxidado se encuentra preferentemente como monómero y estabiliza el dímero en presencia de NADH, al igual que la proteína nativa. Por el contrario, para las variantes W483L (fig. 14A) y W483G (fig. 14B) en sus formas oxidadas, también parecen estar estabilizando el dímero sin la necesidad del agente reductor (NADH).

### **5.2.3. Caracterización cinética en estado estacionario de hAIF $\Delta$ 77 WT y de las variantes W483Y, W483L y W483G**

Para comprobar si las mutaciones en la posición del W483 podrían tener efecto sobre la actividad NADH oxidasa de hAIF, se realizaron cinéticas en estado estacionario de la proteína hAIF $\Delta$ 77 WT y de las variantes W483Y, W483L y W483G mediante ensayos de actividad diaforasa (fig. 15). Se emplearon distintas concentraciones de NADH (0.06-5 mM) y hAIF $\Delta$ 77 WT y sus mutantes a una concentración de proteína en torno a 0,2  $\mu$ M, permitiendo calcular las constantes cinéticas usando como aceptor artificial de electrones el DCPIP (Tabla 3).



**Figura 15.** Dependencia de la actividad NADH oxidasa de hAIF $\Delta$ 77 WT y sus variantes W483Y, W483L y W483G a distintas concentraciones de NADH en tampón 50 mM a 25 °C con DCPIP 95 μM como aceptor artificial de electrones.

En la figura 15, se observa una gráfica de saturación hiperbólica y, por lo tanto, obedece la ecuación de Michaelis-Menten (Km), que indica la afinidad o tendencia de la enzima a reaccionar con el NADH. Para la mutación W483G induce un incremento de la afinidad por el coenzima 37 veces mayor que la proteína nativa y, por ello, se alcanza muy pronto la saturación del enzima por el sustrato, a una concentración de NADH relativamente baja de 100 μM aproximadamente. Le sigue la proteína hAIF $\Delta$ 77 con la mutación de Leucina con una constante de afinidad 12 veces superior por el NADH; y la mutación con Tirosina de casi 3 veces superior a la proteína nativa. Respecto al impacto de las mutaciones en la tasa de recambio (kcat), este fue menor, con valores similares para sustitución por Glicina y ligeramente más altos para las variantes W483L y W483Y.

## Resultados

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de hAIF<sub>Δ77</sub> WT y sus variantes W483Y, W483L y W483G.**

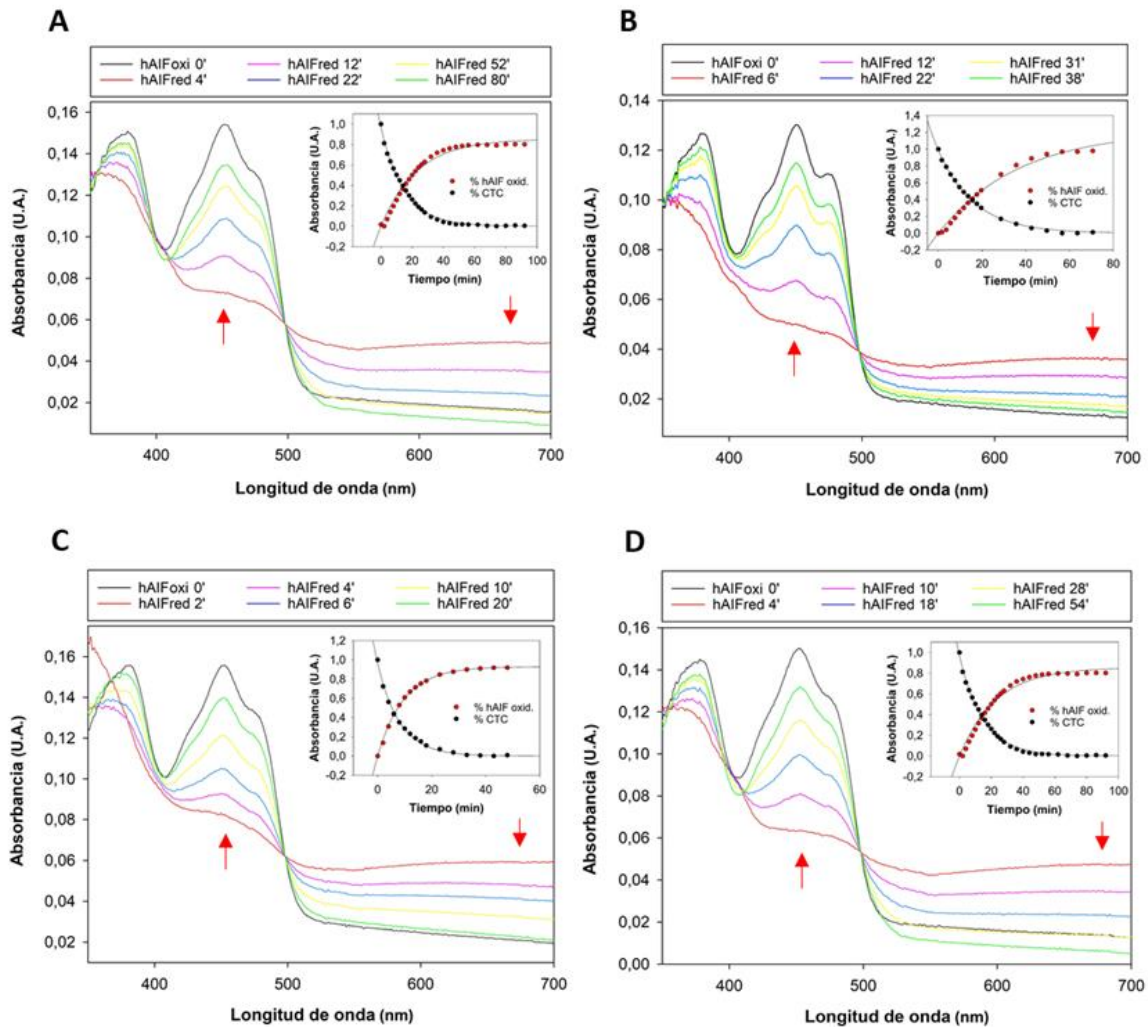
Variantes hAIF <sub>Δ77</sub>	kcat (s <sup>-1</sup> )	Km (μM)	kcat/Km (s <sup>-1</sup> ·μM <sup>-1</sup> )
WT	1.5 ± 0.02	329 ± 14.7	0,005
W483Y	2.2 ± 0.04	115.6 ± 9	0,02
W483L	2.9 ± 0.1	26 ± 3.3	0,11
W483G	1.5 ± 0.02	8.8 ± 0.9	0,17

Así, como se observa en la tabla 3, la proteína nativa muestra la eficiencia catalítica más baja. En concreto, la baja afinidad provoca la baja eficiencia respecto a las variantes de hAIF<sub>Δ77</sub>. La mutación del W483 por Tirosina provoca una actividad redox cuatro veces más eficiente catalíticamente que la proteína nativa con el Triptófano. La mutación con Leucina, presenta eficiencia catalítica alta con respecto al residuo con Triptófano de la proteína nativa, gracias a una elevada afinidad y mayor tasa de recambio. Por último, la mutación con Glicina presenta la eficiencia catalítica más alta debido a la gran afinidad de la enzima por la coenzima NADH.

### **5.2.4. Efecto de las mutaciones en la estabilidad del complejo de transferencia de carga**

En el siguiente ensayo se muestra si la mutación en el residuo 483 de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub> afecta a la formación de complejos de transferencia de carga (CTC) y, por ende, la observación de la estabilidad del complejo de transferencia de carga mediante la reoxidación por oxígeno.

A continuación, se añade un exceso de NADH y, como se muestra en la figura 16, se observa una reducción completa del cofactor FAD mostrando un mínimo de absorbancia en la banda II (452 nm), como indican las flechas rojas ascendentes, y desplazando un aumento de absorbancia en la longitud de onda superior a 600 nm por la formación de CTCs con la captación de electrones en su cofactor (FADH<sup>·</sup>:NAD<sup>+</sup>) tanto en la proteína nativa como en las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ1-77</sub>.



**Figura 16. Evolución espectral absorbida de la reoxidación de hAIF<sub>Δ77</sub> WT (A) y de las variantes hAIF<sub>Δ1-77</sub> W483Y (B), W483L (C) y W483G (D), tras la reducción previa de la proteína con NADH. El primer espectro es de la proteína completamente oxidada (línea negra), el segundo espectro es el de la proteína reducida por NADH (línea naranja) y después se observan los espectros de absorción de la reoxidación de la proteína en presencia de oxígeno y desaparición del CTC a distintos tiempos. La gráfica del interior (parte superior derecha) de los espectros de absorbancia en el UV-visible de cada variante representa el porcentaje de proteína reoxidada (puntos rojos, absorbancias a longitud de onda de 452 nm) así como el porcentaje de formación del complejo de traspaso de carga (CTC) (puntos negros, absorbancias a longitud de onda de 700 nm) respecto al tiempo.**

Seguidamente, se muestra una evolución espectral con la reoxidación de la proteína hAIF<sub>Δ77</sub> por el oxígeno molecular que va pareja a la desaparición del complejo de transferencia de carga (CTC) respecto al tiempo. Estos ensayos permitieron calcular la vida media del CTC para la proteína nativa y sus variantes (Tabla 4). Destaca la rapidez de la reoxidación completa a los 20 minutos de la mutación con Leucina (W483L; fig. 16C) respecto a las variantes W483Y, W483G y la proteína nativa, provocado por una mayor

## Resultados

inestabilidad del CTC. En los recuadros superiores de cada gráfica de la figura 16, se muestran que la reoxidación del cofactor de hAIF $_{\Delta 1-77}$  coincide temporalmente con la disminución de los CTCs.

**Tabla 4. Tiempo de vida media de los CTC y tiempo medio de la reoxidación de FAD.**

Variantes hAIF $_{\Delta 77}$	CTC ( $t_{1/2}^*$ )	FADreox ( $t_{1/2}^*$ )
WT	20	76
W483Y	11,6	18,2
W483L	5,9	7,4
W483G	10,6	19,5
[*] = minutos		

En la tabla 4, se observa que las mutaciones en el residuo 483 inducen a la formación de un CTC más inestable y, con ello, una reducción del tiempo de vida media del complejo de transferencia de carga de 8.4, 14.1 y 9.4 minutos para las mutaciones W483Y, W483L y W483G, respectivamente frente a la proteína nativa. Se intuye que la inestabilidad del complejo de transferencia de carga formado se debe a la distinta conformación de la proteína, provocado por el tamaño del aminoácido en el residuo mutado.

## 6. DISCUSIÓN

Actualmente, hay una mayor evidencia de la relación entre las dos funciones que presenta hAIF y cómo estas varían como respuesta a cambios en los niveles fisiológicos de NADH presentes en el medio. En este trabajo, se ha centrado el foco en la función oxidoreductasa de hAIF en la mitocondria, función otorgada por el cofactor FAD. Desde el descubrimiento de que la proteína alberga dos sitios de unión a la coenzima han surgido nuevas dudas sobre la implicación que presentan algunos residuos en dicha función como es el caso de W483.

Por otra parte, otros residuos implicados en la función óxido-reducción de hAIF, junto con W483, son de vital importancia para su correcto funcionamiento. Por ello, se ha estudiado el papel de otros aminoácidos que presentan mutaciones patogénicas como G308E,  $\Delta$ R201 y E493V que modulan la estabilidad de hAIF; en particular,  $\Delta$ R201 provoca un cambio en la proteína a una conformación menos estable que remodela la estructura y la dinámica del sitio activo (Villanueva, 2019). Las distintas mutaciones generadas en W196 han permitido concluir que la conformación de horquilla  $\beta$  modula la baja eficiencia de hAIF como NADH oxidoreductasa, lo que contribuye a configurar su sitio activo en una geometría no competente para la transferencia de hidruros y a estabilizar el estado de CTC al aumentar la afinidad por  $\text{NAD}^+$ . Finalmente, el motivo de horquilla  $\beta$  contribuye a definir la conformación de las superficies de interacción de AIF con sus proteínas de interacción fisiológicas (Romero 2020). Las mutaciones en H454 y F310, han revelado la importancia de la implicación de estos residuos en la formación del complejo de transferencia de carga, importante para la unión de  $\text{NAD}^+$  a la proteína (H454), o en la etapa de transferencia de hidruro (F310) (Usón, 2012).

Se ha visto que el residuo W483 se encuentra en la zona de unión a  $\text{NADH}_A$  apilado contra la pirimidina de FAD formando el centro catalítico junto con las cadenas laterales de los aminoácidos K177, F310 y H454 y P173 y, en la zona  $\text{NADH}_B$  junto con otros residuos

---

## Discusión

como W196 o R201, que afectan directamente a la conformación de la proteína promoviendo la exposición de la horquilla  $\beta$  al solvente (Ferreira 2014).

En este trabajo se ha profundizado en el estudio de la influencia del W483 sobre la actividad oxido-reductasa *in vitro* mediante la generación de mutaciones en dicha posición. Con este objetivo, se han escogido selectivamente tres sustituciones distintas del W483, con distinto grado de conservación (Y, L y G) para una mayor comprensión de su comportamiento. Se ha trabajado con las formas mitocondriales de estas variantes (hAIF $\Delta_{77}$ ), ya que los residuos 77-101 confieren estabilidad al pH del IMS (Villanueva, 2019) y se han caracterizado el estado y comportamiento en FAD mediante ensayos de espectroscopía en el rango de UV-vis demostrándose que la sustitución W483G, la menos conservativa de las analizadas, presenta mayores cambios en el entorno FAD debido, probablemente a la diferencia de tamaño entre las cadenas laterales de W y G.

En los ensayos cinéticos en hAIF $\Delta_{77}$ , en el residuo 483, el triptófano le confiere menor afinidad por el NADH y, por lo tanto, menor eficiencia catalítica, probablemente para mantener la homeostasis mitocondrial. Estas diferencias podrían explicarse porque el menor tamaño de la glicina frente al triptófano aumentaría el tamaño de la cavidad de exposición al solvente facilitando así la entrada de NADH.

En cuanto a la dimerización, se ha visto que el equilibrio monómero-dímero que presenta hAIF en la mitocondria, está desplazado hacia el monómero mientras en presencia de altos niveles fisiológicos de NADH, el FAD se reduce y el equilibrio se desplaza hacia el dímero; *in vitro* se comporta de la misma forma para la proteína nativa de hAIF $\Delta_{77}$ . Cuando el triptófano se sustituye por Tirosina (W483Y), un cambio conservativo, se comporta de la misma forma que la proteína nativa pero las sustituciones por Leucina y Glicina presentan un equilibrio desplazado hacia el dímero independientemente de la presencia de NADH. Se evidencia que el anillo aromático presente tanto en la tirosina como en el triptófano parece impedir la reorganización conformacional para que dimerice en ausencia de NADH. Mediante la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño, se observa que, en el caso de las mutaciones de Leucina y Glicina, la proteína se eluye en menor tiempo lo que

indicaría que presentan un mayor radio hidrodinámico, lo que apoya la posibilidad de una reorganización estructural de la proteína que favorece que presente la forma dimérica independientemente de la unión a NADH.

Por último, la proteína nativa presenta la formación de CTC altamente estables a la reoxidación del oxígeno molecular. Los CTCs formados por las variantes de hAIF $_{\Delta 77}$  son más inestables, por lo que se reoxidan antes si los comparamos con los CTCs de la proteína nativa.

Para próximas investigaciones se podría estudiar el rol de los residuos estudiados en W483 en la actividad apoptótica de hAIF, para poder comprobar si las dos funciones se encuentran relacionadas. Además, se puede investigar más a fondo sobre el mecanismo de dimerización, así como sus resultados en las actividades apoptótica y óxido-reductasa.



## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado una revisión del centro activo de hAIF y sus cambios conformacionales provocados por la unión de NADH, y a través de varios ensayos se ha tratado de estudiar el papel de W483 en la actividad NADH oxidasa de hAIF $_{\Delta 77}$  mediante la producción y caracterización de distintas mutaciones en dicho residuo. Se concluye que:

- Se ha logrado producir las variantes de hAIF $_{\Delta 77}$  (W483Y, W483L y W483G) de forma óptima.
- Las mutaciones en W483 provocan cambios en el entorno del cofactor flavínico en el centro redox, sobre todo para las mutaciones W483L y W483G, y, junto con W483Y, muestran una mayor afinidad por NADH.
- La mutación W483Y presenta un comportamiento similar a W483 en la estabilidad del dímero, debido a que es una mutación más conservativa, mientras que para las mutaciones W483L y W483G, la estabilización del dímero es independiente de NADH.
- La proteína hAIF nativa, junto con sus variantes, se reducen completamente con NADH. Las variantes forman un CTC más inestable y, por lo tanto, disminuye de forma significativa el tiempo de vida media del CTC.

---

Conclusiones

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Andrabi, S. A., Kim, N. S., Yu, S.-W., Wang, H., Koh, D. W., Sasaki, M., Dawson, T. M. (2011). Poly (ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18308–18313.
- Arena, G.; Reinhardt, C.; Nedara, K.; Edwards, R.; Brenner, C.; Tokatlidis, K.; Modjtahedi, N. (2020). AIF meets the CHCHD4/Mia40-dependent mitochondrial import pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1; 1866(6):165746. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165746.
- Artus, C., (2010). AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J*, 29 (9): 1585-1599.
- Bano, D., & Prehn, J. H. M. (2018). Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*, 30, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
- Choi, S. (2018). *Encyclopedia of Signaling Molecules AIF*. Department of Molecular Science and Technology Ajou University. Second Edition. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
- Churbanova, I., et al. (2008). Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chemistry*, 283 (9): 5622-5631.
- Grumbt, B., Stroobant, V., Terziyska, N., Israel, L., & Hell, K. (2007). Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37461–37470.
- Delettre, C., (2006). AIFsh, a Novel Apoptosis-inducing Factor (AIF) Pro- apoptotic Isoform with Potential Pathological Relevance in Human Cancer. *J Biol Chemistry*, 281 (10): 6413-6427.
- Delettre, C., (2006). Identification and Characterization of AIFsh2, a Mitochondrial Apoptosis-inducing Factor (AIF) Isoform with NADH Oxidase Activity. *J Biol Chemistry*, 281 (27): 18507-18518.
- Fatokun, A., Dawson, V., Dawson, T. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol*, 171(8):2000-16. Doi: 10.1111/bph.12416. PMID: 24684389; PMCID: PMC3976618.
- Ferreira, P. (2011) Unraveling the role of the reductase activity of the human apoptosis inducing factor. *Proceedings of Flavins and Flavoproteins (Congress)*. En prensa.

---

Bibliografía

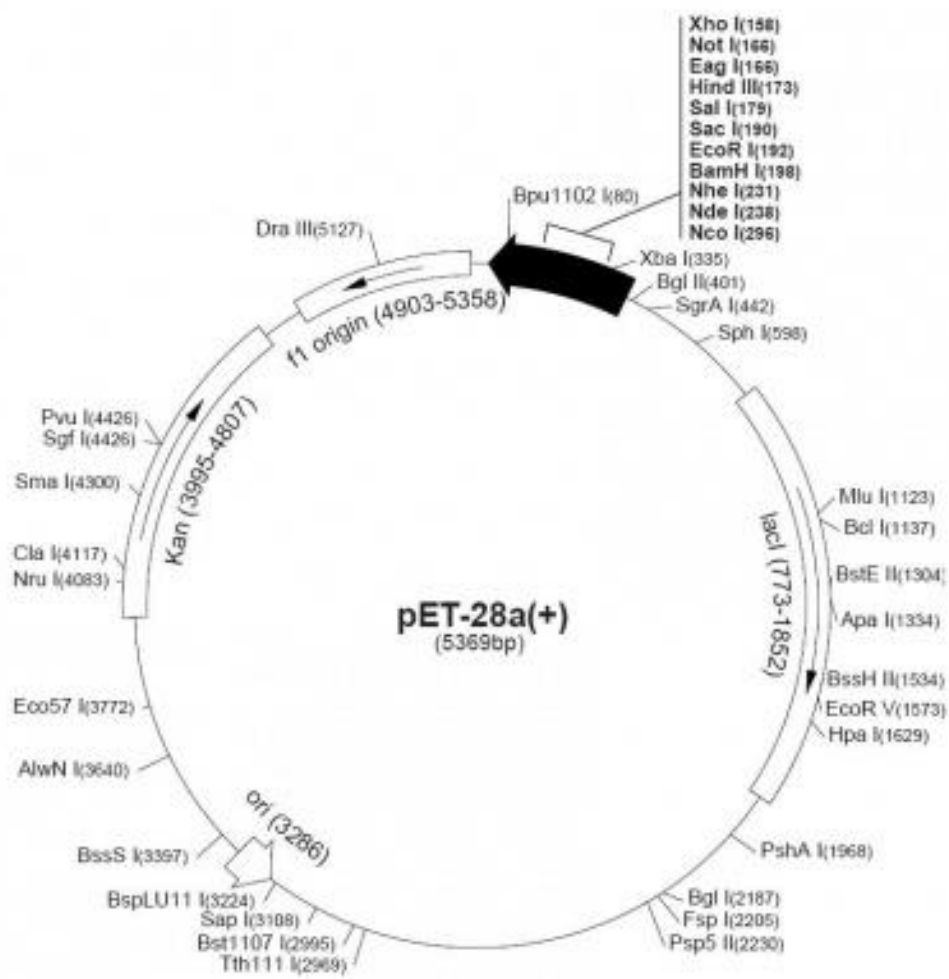
- Ferreira, P. (2013) The Oxido-reductase Activity of the Apoptosis Inducing Factor: A Promising Pharmacological Tool? *Current Pharmaceutical Desing*, 2013, 19, 2628-2636 (Article).
- Ferreira, P. (2014) Structural Insights into the Coenzyme Mediated Monomer-Dimer Transition of the Pro-Apoptotic Apoptosis Inducing Factor. *Biochemistry* (Article).
- Ferreira, P. (2018) *Encyclopedia of Signaling Molecules. Apoptosis-Inducing Factor 1, Mitochondrial*.
- Hangen, E., Féraud, O., Lachkar, S., Mou, H., Doti, N., Fimia, G. M., Modjtahedi, N. (2015). Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Molecular Cell*, 58(6), 1001–1014.
- Harrison, D., Gravells, P., Thompson, R., Bryant, H. (2020). Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vs. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) - Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer Therapy. *Front Mol Biosci*, 7:191. Doi: 10.3389/fmolb.2020.00191.
- Hernández, S. (2017). Bases moleculares de la interacción del factor de inducción de apoptosis humano (hAIF) y la proteína mitocondrial CHCHD4. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. P.p. 10-16.
- Ishihara, N.; Otera, H.; Ohsakaya, S.; Nagaura, Z.; Mihara, K. (2005). Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 24(7):1375-86. doi: 10.1038/sj.emboj.7600614.
- Klein, J.A., (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419 (6905): 367-374.
- Mate M., Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol.* ;9:442–6. doi:10.1038/nsb793
- Meyer, K., Buettner, S., Ghezzi, D., Zeviani, M., Bano, D., & Nicotera, P. (2015). Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death and Disease*, 6(7), e1814.
- Miramar, M., (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, 276 (19): 16391-16398.
- Robinson, G., (2019). Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol.* Sep;26:101239. doi: 10.1016/j.redox.2019.101239.
- Romero, S. (2020) W196 and the  $\beta$ -Hairpin Motif Modulate the Redox Switch of Conformation and the Biomolecular Interaction Network of the Apoptosis-Inducing Factor. *Research Article*.

- Sevrioukova, I. (2009). Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor. *J Mol Biol.* 390 (5): 924-938.
- Sevrioukova, I. (2011). Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* 14(12):2545-79. doi: 10.1089/ars.2010.3445.
- Susin, S.A., (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397 (6718): 441-446.
- Usón, A. (2012). Caracterización de la función redox del factor de inducción de apoptosis humano (hAIF). Máster en Biología Molecular y Celular.
- Vahsen, N., (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*, 23 (23): 4679-4689.
- Victor J Yuste ; Hans K Lorenzo ; Santos A Susin. AIFM1 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2007-10-01.
- Villanueva, R., (2010). Caracterización redox del Factor de Inducción de Apoptosis humano (hAIF). Proyecto Máster en Biología Molecular y Celular, 2010. Universidad de Zaragoza.
- Villanueva, R. (2015). The reductase activity of the human Apoptosis Inducing Factor: molecular bases and implications in the enzyme apoptotic function. [Tesis doctoral: Universidad de Zaragoza]. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.
- Villanueva R, Ferreira P, Marcuello C, Usón A, Miramar MD, Peleato ML, (2015). Key residues regulating the reductase activity of the human mitochondrial apoptosis inducing factor. *Biochemistry.* 54:5175–84. doi:10.1021/acs.biochem.5b00696.
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 9:680–4. doi:10.1038/nsb836.
- Yu, S., Wang, Y., Frydenlund, D., Ottersen, O., Dawson, V., Dawson, T. (2009). Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro*, 18;1(5):e00021. Doi: 10.1042/AN20090046.
- Wang, Y., Kim, N., Haince, J., Kang, H., David, K., Andrabi, S., Poirier, G., Dawson, V., Dawson, T. (2011). Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal*, 5;4(167):ra20. doi: 10.1126/scisignal.2000902.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1. Información adicional del desarrollo experimental

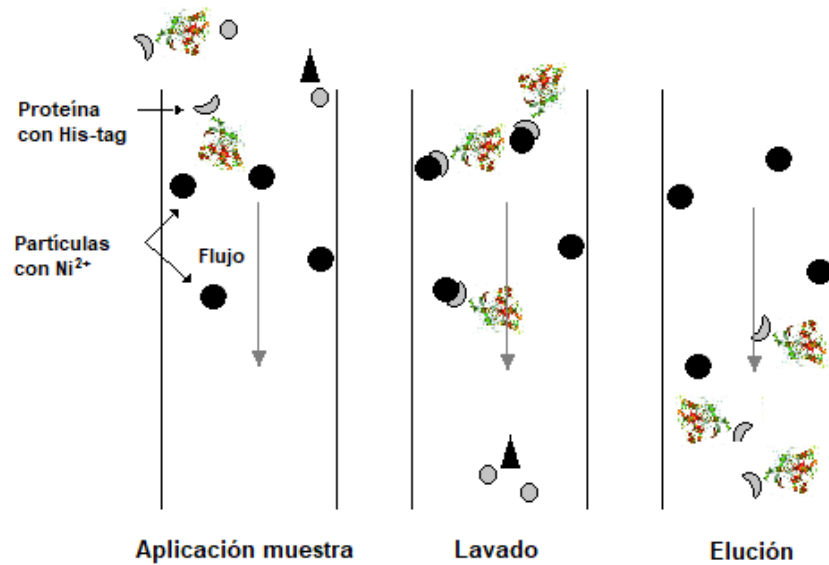
Figura 1. Mapa del vector de expresión pET-28a(+) portador de los cDNAs de las distintas variantes de hAIF $_{\Delta 1-77}$ .



Anexos - Figura 1

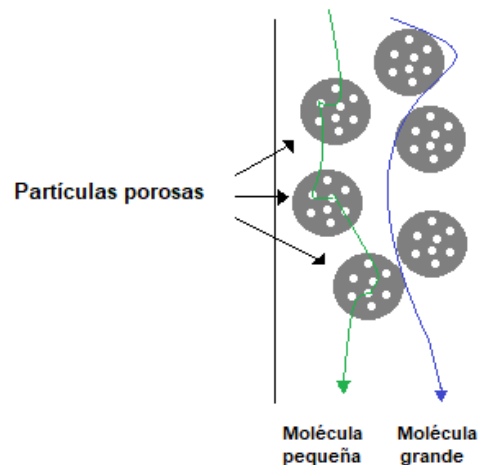
**Figura 2.** Esquema de las columnas de cromatografía para la purificación de las variantes W483Y, W483L y W483G de hAIF<sub>Δ77</sub>. A) Columna cromatográfica de afinidad. B) Columna cromatográfica de exclusión molecular.

A) Columna cromatográfica de afinidad



Anexos - Figura 2A

B) Columna cromatográfica de exclusión molecular.



Anexos - Figura 2B



