

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y CELULAR

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACION REDOX DE APOPTOSIS-  
INDUCING FACTOR Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
MOLECULARES IMPLICADOS EN SU  
TRANSFERENCIA ELECTRONICA**

Memoria presentada por  
M<sup>a</sup> DOLORES MIRAMAR GALLART  
Licenciada en Ciencias Químicas, Especialidad Bioquímica  
Para optar al grado de  
Doctora en Ciencias Químicas

Septiembre 2008



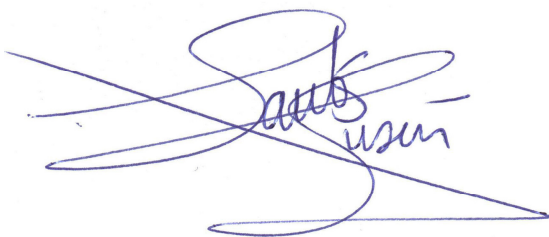
SANTOS A. SUSIN LOPEZ, Directeur de Recherche CNRS (Institut Pasteur, Paris, Francia)  
y MARÍA LUISA PELEATO SÁNCHEZ, Catedrático del Departameto de Bioquímica y  
Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral "**Estudio de los mecanismos redox de AIF (Apoptosis Inducing Factor)**" ha sido realizada por la licenciada MARÍA DOLORES MIRAMAR GALLART en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección, y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor.

**Título de la memoria: Caracterización redox de Apoptosis Inducing Factor y estudio de los mecanismos moleculares implicados en su transferencia electrónica.**

Zaragoza, septiembre 2008



Firmado: Santos A. Susin



Firmado: María Luisa Peleato





## AGRADECIMIENTOS.

*Deseo expresar mi agradecimiento a los directores de esta tesis, la Dra. M<sup>ra</sup> Luisa Peleato y el Dr. Santos A. Susin, por darme la posibilidad de trabajar con AIF y de aprender en el campo de la bioquímica y la biología molecular.*

*Gracias a todos los profesores, compañeros y personal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, donde se ha realizado la mayor parte del trabajo de esta tesis, con los que he compartido esta experiencia durante todos estos años y que han sido de inestimable ayuda para su desarrollo. Especialmente a la Dra. Milagros Medina por su ayuda en la utilización del stopped-flow y en el estudio de las cinéticas rápidas y a José Angel Hernández por el apoyo prestado en todo momento en el desarrollo de innumerables técnicas, entre ellas la purificación de proteínas recombinantes.*

*Una parte esencial de esta tesis se llevó a cabo en el Instituto Pasteur en la Unité Apoptose et Système Immunitaire dirigida por el Dr Susin y también en el Institut de Recherches sur le Cancer de Villejuif, perteneciente al Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), en París. Quiero dar las gracias a todos los miembros de estos laboratorios de investigación. A Victor Juste por enseñarme a navegar en la biología molecular y acompañar mi estancia en París. Gracias por todo el tiempo dedicado, tan preciado para un investigador apasionado por la ciencia y a Patricia, Gaël, Fred y Nadine por todo lo que compartimos, dentro y fuera del laboratorio, siempre con simpatía y desde la perspectiva del buen humor. También a Luigi Ravagnan y Paola Constantini por su amable colaboración durante mi estancia en el Institut de Recherches sur le Cancer de Villejuif y a la Dra. Lúcia Teixeira del Instituto de Tecnología Química e Biológica (Oeiras, Portugal) por el cálculo de los potenciales redox de AIF.*

*Gracias a los miembros del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet, especialmente al Dr. Angel García de Jalón, jefe de Servicio, y a la Dra. M<sup>ra</sup> Teresa Calvo, jefe de Sección de la Unidad de Genética, por su apoyo e interés. Y a mis compañeras Eva, Fabiola y Ana, por su amistad y por no dejarme ceder al desaliento.*

*Gracias a mi familia, por su paciencia y su apoyo incondicional. A mis padres, que tras todos los años de desvelo por fin podrán dormir tranquilos. A Alberto, por su gran sentido común que es, sin duda, el menos común de todos. Y a mis hijos, Darío y Adrián, que son el centro de mi pequeño universo y el motor que lo impulsa.*



*A mis padres.*



*“La muerte pertenece a la vida como al nacer.  
Así el caminar está tanto en levantar el pie  
como en volverlo a poner en el suelo.”*

Rabindranath Tagore



# *INDICE*





<b>1. INTRODUCCION.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LAS MITOCONDRIAS: UNA DOBLE FUNCION.</b>	<b>3</b>
1.1.1. La cadena de transporte electrónico mitocondrial: La obtención de energía.	4
1.1.2. La apoptosis.	9
1.1.2.1. Caspasas.	13
1.1.2.2. Proteínas de la superfamilia Bcl-2.	16
1.1.3. Mitocondrias y apoptosis.	18
1.1.3.1. Caspasas del espacio intermembrana mitocondrial.	21
1.1.3.2. Citocromo <i>c</i> .	21
1.1.3.3. Smac/DIABLO.	22
1.1.3.4. HtrA2/Omi.	23
1.1.3.5. Endonucleasa G.	23
1.1.4. Mecanismos de apoptosis.	24
1.1.4.1. Ruta apoptótica mitocondrial (vía intrínseca).	25
1.1.4.2. Ruta apoptótica mediada por receptores mortales (vía extrínseca).	27
granulisina.	30
<b>1.2. PROTEINAS REDOX Y APOPTOSIS.</b>	<b>33</b>
<b>1.3. AIF (APOPTOSIS-INDUCING FACTOR).</b>	<b>35</b>
1.3.1. Descubrimiento y función.	35
1.3.2. Estructura primaria y relaciones evolutivas.	43
1.3.3. Estructura terciaria de AIF.	44
1.3.3.1. Resolución de la estructura cristalina de AIF y análogos estructurales.	44
1.3.3.2. Relación de la estructura de AIF con su mecanismo apoptogénico.	47
1.3.4. Unión de AIF al grupo prostético FAD.	48
1.3.4.1. El flavín-adenín dinucleótido (FAD) como centro redox.	48
1.3.4.2. Interacción de residuos de AIF con FAD.	51

1.3.5.	Estudio del sitio de unión de AIF al NADH.	52
1.3.5.1.	Los coenzimas NADH y NADPH.	52
1.3.5.2.	Interacción de residuos de AIF con NADH.	54
1.3.6.	Implicación de los residuos del sitio activo en la transferencia electrónica.	55
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>57</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL BIOLÓGICO.</b>	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>CULTIVOS.</b>	<b>63</b>
3.2.1.	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .	63
3.2.1.1	Cultivo en medio sólido.	63
3.2.1.2	Cultivo en medio líquido.	64
3.2.1.3	Conservación de cepas.	65
3.2.2.	Cultivo de células HeLa y de fibroblastos Rat-1.	65
<b>3.3.</b>	<b>TECNICAS DE BIOLOGIA CELULAR.</b>	<b>66</b>
3.3.1.	Preparación de mitocondrias.	66
3.3.2.	Hinchamiento o “Swelling” de mitocondrias aisladas.	66
3.3.3.	Preparación de extracto correspondiente al espacio intermembrana.	67
3.3.4.	Preparación de extracto mitocondrial total.	68
3.3.5.	Preparación de núcleos.	68
3.3.6.	Análisis por citometría de flujo.	68
3.3.7.	Determinación en microscopía de las alteraciones nucleares ligadas a la apoptosis.	69

<b>3.4. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.</b>	<b>70</b>
3.4.1. Técnicas básicas.	70
3.4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico.	70
3.4.1.2. Obtención de células competentes.	71
3.4.1.3. Transformación de células competentes.	72
3.4.1.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	72
3.4.2. Clonaje de hAIF en pBSK.	73
3.4.3. Mutagénesis dirigida.	78
3.4.3.1. Diseño de oligonucleotidos.	78
3.4.3.2. Reacciones de mutagénesis dirigida.	79
3.4.3.3. Comprobación de la mutagénesis.	81
3.4.4. Mutante doble K177W/E314S.	82
3.4.5. Clonaje en pET de hAIF salvaje y sus mutantes.	84
3.4.5.1. Preparación de plásmido pET28a.	85
3.4.5.2. PCR para crear sitio de restricción NdeI.	85
3.4.6. Secuenciación de DNA.	88
<b>3.5. TECNICAS ANALITICAS.</b>	<b>88</b>
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	88
3.5.1.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.	88
3.5.1.1. Isoelectroenfoque.	88
3.5.2. Detección de proteínas en filtros de nitrocelulosa. utilizando anticuerpos específicos (Western Blot).	92
3.5.3. Expresión de AIF en <i>E. Coli</i> .	93
3.5.3.1. Sistema de expresión de AIF en <i>E. coli</i> .	97
3.5.3.2. Prueba de expresión.	97
3.5.3.3. Inducción de la expresión a media escala.	98
3.5.4. Purificación de proteínas. Purificación de mAIF $\Delta$ 1-120, mAIF $\Delta$ 1-351, mAIF $\Delta$ 1-101, hAIF $\Delta$ 1-102 y sus mutantes.	98
3.5.4.1. Purificación de mAIF $\Delta$ 1-120 y mAIF $\Delta$ 1-351.	98
3.5.4.2. Purificación de mAIF $\Delta$ 1-101, hAIF $\Delta$ 1-102 y los mutantes hAIF $\Delta$ 1-102 F310G, hAIF $\Delta$ 1-102 W483G, hAIF $\Delta$ 1-102 K177W, hAIF $\Delta$ 1-102 E314S,	

hAIF $\Delta$ 1-102 K177W/E314S y hAIF $\Delta$ 1-102 P173G.	99
3.5.5. Eliminación de la cola de histidinas de mAIF $\Delta$ 1-101.	101
3.5.6. Análisis del grupo prostético de AIF por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	102
3.5.7. Preparación de apoproteínas y reconstitución de las holoproteínas.	102
3.5.7.1. Método de diálisis con CaCl <sub>2</sub> .	103
3.5.7.2. Método de cromatografía líquida FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con columna de filtración en gel Superosa 12.	103
3.5.8. Estudio de las interacciones proteína-proteína de AIF y polipéptidos mitocondriales.	104
3.5.9. Espectrofotometría molecular UV-Visible.	105
3.5.11.1. Determinación de tioles libres (L-cisteína) y contenido total de grupos tiol.	105
3.5.11.2. Determinación del coeficiente de extinción de flavoproteínas.	106
3.5.10. Espectros de emisión de fluorescencia.	106
3.5.11. Espectros de dicroísmo circular.	107
3.5.12. Espectroscopía de masas.	107
3.5.13. Análisis de elementos por ICP-MS.	107
3.5.14. Determinación de los potenciales de oxidación-reducción.	108
<b>3.6. MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.</b>	<b>108</b>
3.6.1. Medida de cinéticas en estado estacionario.	108
3.6.1.1. Actividad diaforasa.	110
3.6.1.1.1. Medida con DCPIP.	110
3.6.1.1.2. Medida con NBT.	111
3.6.1.2. Actividad monodehidroascorbato reductasa.	112
3.6.1.3. Actividad oxidasa.	113
3.6.1.4. Actividad adrenodoxina reductasa.	114
3.6.1.5. Actividad citocromo <i>c</i> reductasa.	114
3.6.1.6. Actividad de producción de superóxido.	115
3.6.1.7. Actividad DTNB reductasa.	116
3.6.1.8. Estudio de la actividad redox de AIF en presencia de Hsp70.	116

3.6.2. Medida de cinéticas rápidas.	117
3.6.2.1. Cinéticas de mezcla rápida con flujo detenido (Stopped-Flow).	117
3.6.3. Fotorreducción mediante deazariboflavina.	119
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>121</b>
<b>4.1. CARACTERIZACION REDOX DE AIF (APOPTOSIS INDUCING FACTOR).</b>	<b>123</b>
4.1.1. Masa molecular de AIF $\Delta$ 1-120.	124
4.1.2. Análisis del contenido de metales.	124
4.1.3. Unión a grupo prostético.	125
4.1.4. Contenido de grupos tiol accesibles.	125
4.1.5. Propiedades espectroscópicas.	125
4.1.6. Reacciones de transferencia electrónica entre NAD(P)H y AIF $\Delta$ 1-120.	126
4.1.7. Potencial redox de AIF $\Delta$ 1-120.	129
4.1.8. Actividades redox de AIF $\Delta$ 1-120 <i>in vitro</i> .	131
4.1.9. Actividad redox de AIF <i>in vivo</i> .	140
4.1.10. Estudio de las interacciones proteína-proteína de AIF y polipéptidos mitocondriales.	142
<b>4.2. ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF (APOPTOSIS INDUCING FACTOR) Y SU ACTIVIDAD APOPTOGENICA).</b>	<b>145</b>
4.2.1. Estudio de la actividad apoptótica con mAIF $\Delta$ 1-120.	146
4.2.1.1. Actividad apoptótica de apoAIF $\Delta$ 1-120.	146
4.2.1.2. Actividad apoptótica de mAIF $\Delta$ 1-120 en relación con NAD(P)H.	149
4.2.2. Estudio de la actividad apoptótica con mAIF $\Delta$ 1-101.	151
4.2.2.1. Controles negativo y positivo del estudio.	151
4.2.2.2. Actividad de la holoproteína.	155
4.2.2.3. Actividad de la apoproteína mAIF $\Delta$ 1-101.	157

4.2.3. Estudio de la actividad redox de AIF en presencia de Hsp70.	160
<b>4.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF.</b>	<b>163</b>
4.3.1. Identificación de residuos implicados en la actividad redox de AIF.	164
4.3.2. Clonación de hAIF $\Delta$ 1-102 y mutagénesis dirigida.	168
4.3.2.1. Clonación de hAIF $\Delta$ 1-102 en el vector pBSK.	168
4.3.2.2. Reacciones de mutagénesis dirigida.	169
4.3.2.3. Análisis de la mutagénesis.	170
4.3.2.4. Mutantes dobles.	173
4.3.2.5. Clonación en pET de de hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y sus mutantes.	174
4.3.3. Obtención y purificación de hAIF $\Delta$ 1-102.	176
4.3.3.1. Expresión de hAIF $\Delta$ 1-102.	176
4.3.3.2. Purificación de hAIF $\Delta$ 1-102.	177
4.3.3.3. Propiedades de hAIF $\Delta$ 1-102.	177
4.3.4. Formas mutadas de hAIF $\Delta$ 1-102.	179
4.3.4.1. Análisis de la expresión de las formas mutadas de hAIF $\Delta$ 1-102.	179
4.3.4.2. Purificación de las formas mutadas de hAIF $\Delta$ 1-102.	179
4.3.5. Propiedades del mutante hAIF $\Delta$ 1-102 F310G.	181
4.3.5.1. Conservación del residuo F310 en otras proteínas.	181
4.3.5.2. Propiedades espectrales.	182
4.3.5.3. Determinación del punto isoeléctrico de hAIF $\Delta$ 1-102 F310G.	182
4.3.5.4. Determinación del potencial redox.	183
4.3.6. Propiedades de los mutantes hAIF $\Delta$ 1-102 K177W, hAIF $\Delta$ 1-102 E314S, y hAIF $\Delta$ 1-102 K177W/E314S.	183
4.3.6.1. Conservación de los residuos K177 y E314 en otras proteínas.	184
4.3.6.2. Propiedades espectrales.	186
4.3.6.3. Determinación del punto isoeléctrico de hAIF $\Delta$ 1-102 K177W, hAIF $\Delta$ 1-102 E314S	

y hAIF $\Delta$ 1-102 K177W/E314S.	186
4.3.7. Propiedades del mutante hAIF $\Delta$ 1-102 W483G.	187
4.3.7.1. Conservación del residuo W483G en otras proteínas.	187
4.3.7.2. Propiedades espectrales.	188
4.3.7.3. Determinación del punto isoeléctrico de hAIF $\Delta$ 1-102 W483G.	188
4.3.7.4. Determinación del potencial redox.	189
4.3.8. Propiedades del mutante hAIF $\Delta$ 1-102 P173G.	190
4.3.8.1. Conservación del residuo P173 en otras proteínas.	190
4.3.8.2. Propiedades espectrales.	190
4.3.8.3. Determinación del punto isoeléctrico.	191
4.3.9. Espectros de fluorescencia de hAIF $\Delta$ 1-102 y sus mutantes.	191
4.3.10. Papel de los residuos F310, K177, E314, W483G y P173G en la actividad redox de AIF. Medida del proceso de reducción de AIF por NADH mediante cinéticas rápidas por mezcla con flujo detenido.	193
4.3.11. Modelado computacional de la interacción de AIF con NAD <sup>+</sup>	197
<b>5. DISCUSION.</b>	<b>201</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>213</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>217</b>
<b>8. APENDICES.</b>	<b>257</b>





# *1. INTRODUCCION*



A pesar de que, para la concepción humana, la muerte es lo opuesto a la vida en la naturaleza ambos procesos aparecen como elementos indisolubles formando parte de un conjunto. Esto se puede observar a diferentes niveles, desde el mantenimiento de un ecosistema hasta el nivel celular, donde las células llevan a cabo una muerte programada, llamada apoptosis, para el beneficio del organismo individual. Un organismo multicelular debe dar prioridad constantemente al buen funcionamiento del conjunto en detrimento de toda consideración individual. Esta asociación también puede observarse a nivel molecular, donde existen proteínas que desarrollan funciones divergentes y tan dispares como intervenir en la vida y la muerte celular. Este es el caso de Apoptosis-Inducing Factor (AIF), una flavoproteína mitocondrial que interviene en la muerte celular por apoptosis independiente de caspasas (Susin *et al.*, 1999) y que además, es esencial para la vida de las células por su función en la fosforilación oxidativa (Vahsen *et al.*, 2004).

## **1.1. LAS MITOCONDRIAS: UNA DOBLE FUNCION.**

Las mitocondrias desempeñan una importante función para la vida de las células eucariotas, ya que en ellas se genera la energía que utilizan. En la matriz mitocondrial se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial, la cual a través de sucesivas reacciones acopladas que incluyen bombeo de protones al espacio intermembrana, transfiere los electrones al oxígeno. El gradiente de protones generado permite la síntesis de ATP a través de la enzima ATP sintasa. Sin embargo, se ha demostrado a lo largo de los últimos años que las mitocondrias también tienen una función importante en la inducción de la muerte celular por apoptosis a través del paso de sus proteínas al citosol (Van Loo *et al.*, 2002; van Gurp *et al.*, 2003). De este modo, un mismo orgánulo, la mitocondria, es responsable tanto del mantenimiento de la vida celular como el desencadenamiento de su muerte (Bras *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 1995; Kroemer, 1997; Green y Kroemer, 1998; Green y Reed, 1998; Kroemer y Reed, 2000; Boya *et al.*, 2001; Ferri y Kroemer, 2001).

### 1.1.1. LA CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO MITOCONDRIAL: LA OBTENCION DE ENERGIA.

La cadena de transporte electrónico consiste en un sistema de transportadores de electrones (Figura 1.1) situado en la membrana interna mitocondrial. En presencia de oxígeno, convierte equivalentes de reducción en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>, provenientes del catabolismo celular, mediante reacciones de oxidación y reducción, en energía, en forma de ATP, mediante el proceso de la fosforilación oxidativa (Figura 1.2).

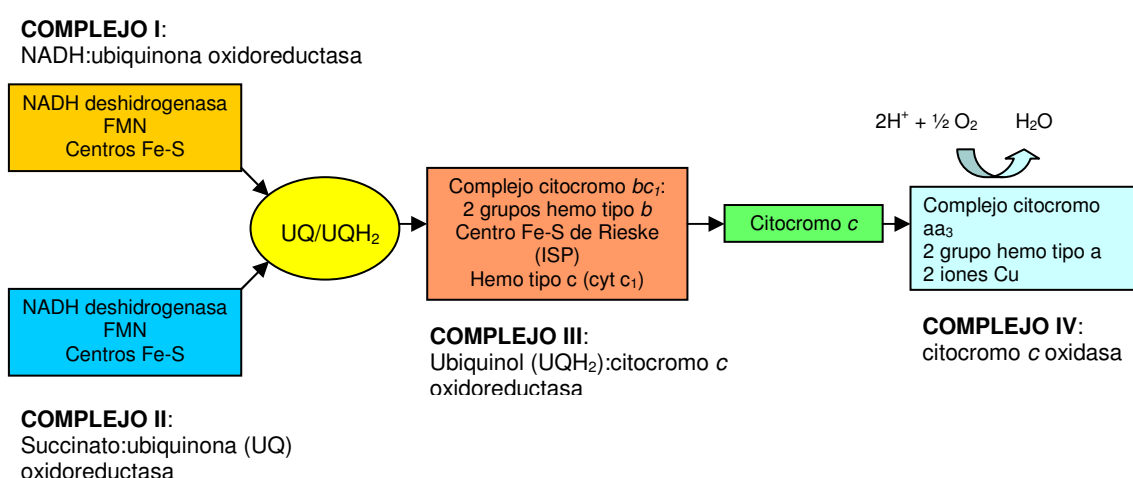


Figura 1.1. Esquema general de los complejos y rutas de transferencia electrónica de la cadena de transporte mitocondrial. Se muestran cuatro complejos de la cadena de transporte electrónico: complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (Succinato:ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (Ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa) y complejo IV: citocromo *c* oxidasa. Esquema adaptado de Devlin, 2004.

Cada uno de los cuatro complejos es independiente dentro de la membrana interna y se puede mover libremente. Los complejos I y II, junto con otras flavoproteínas deshidrogenasas transfieren electrones a la ubiquinona. El ubiquinol reducido es oxidado por el complejo III. Los electrones se transfieren desde el complejo III al citocromo *c*, que funciona como un transportador móvil el cual se desplaza hasta el complejo IV donde se oxida y los electrones se transfieren, en último término, al oxígeno.

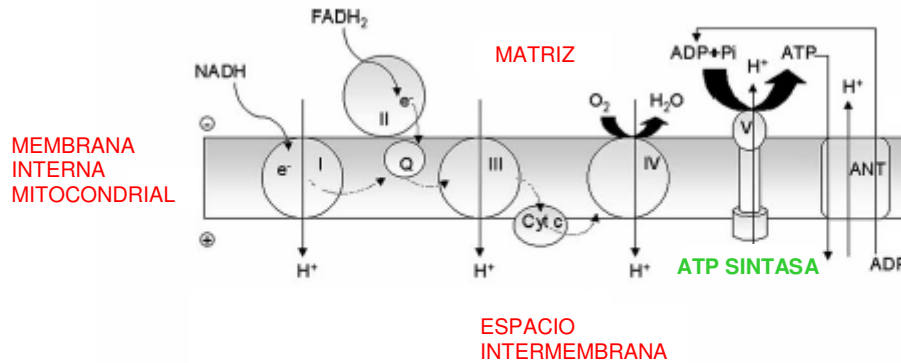


Figura 1.2. Esquema de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La ATP sintasa, también llamada complejo V, usa energía del gradiente electroquímico ( $\Delta\Psi_m$ ) producido durante la transferencia de electrones para la síntesis de ATP. Modificado de Van Gorp *et al.*, 2003.

Los diversos transportadores electrónicos implicados en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el oxígeno tienen potenciales estándar de reducción que abarcan los valores desde el potencial de reducción estándar ( $E^{0'}$ ) del NADH,  $-0.32$  V, hasta el del oxígeno,  $E^{0'}=+0.82$  V (Figura 1.3). Durante la eliminación de electrones de los coenzimas también se eliminan protones que son bombeados, gracias a la energía liberada en las reacciones de oxidación-reducción, desde la matriz, a través de la membrana interna, para formar un gradiente electroquímico que proporciona energía para la síntesis de ATP por el enzima multiproteico ATP sintasa, también llamado complejo V (Figura 1.2). La oxidación completa de NADH y  $FADH_2$  por la cadena de transporte electrónico produce un bombeo de diez protones a través de la membrana mitocondrial interna y da lugar a la producción por la enzima ATP sintasa de, aproximadamente, 2.5 y 1.5 moles de ATP por mol de equivalente de reducción transferido al oxígeno, respectivamente.

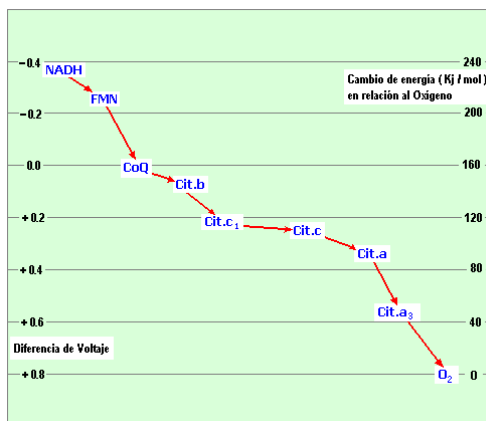


Figura 1.3. Potenciales de oxidación-reducción de los transportadores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) (Figura 1.4A), a menudo llamado NADH deshidrogenasa, oxida NADH y transfiere electrones a la ubiquinona (coenzima Q). Está formado por, aproximadamente, 40 polipéptidos diferentes, con una masa molecular de 1000 KDa y presenta el grupo prostético FMN, Flavin-adenín mononucleótido (ver apartado 1.3.4.1) como cofactor fuertemente unido a una de sus subunidades. La oxidación del NADH implica la transferencia de dos electrones y dos protones desde el NADH al FMN. Los electrones se transfieren a continuación desde el FMN a través de una serie de centros FeS a la ubiquinona. En este proceso se bombean cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial desde la matriz al espacio intermembrana.

El complejo II (Succinato-ubiquinona oxidoreductasa) (Figura 1.4B) cataliza la oxidación del succinato de la matriz mitocondrial. Está formado por cuatro subunidades: una subunidad de masa molecular 70 KDa con el grupo prostético FAD (Flavín-adenín dinucleótido, ver apartado 1.3.4.1) unido covalentemente, una subunidad de 30 KDa que contiene tres centros FeS y dos proteínas hidrofóbicas pequeñas. Durante la oxidación del succinato a fumarato se reduce el grupo FAD a FADH<sub>2</sub> mediante la transferencia de dos electrones y dos protones, el cual transfiere electrones a los grupos FeS, que reducen a la ubiquinona. La energía libre generada en estas reacciones es insuficiente para generar un bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

El complejo III (Ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa) (Figura 1.4C), también llamado complejo citocromo *bc<sub>1</sub>*, cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) al citocromo *c*. En los mamíferos este complejo consta de 11 subunidades, de las cuales tres tienen grupos prostéticos que actúan como centros redox: el citocromo *b*, el citocromo *c<sub>1</sub>* y la proteína ISP (del inglés Iron Sulphur Protein), que contiene un centro 2Fe-2S de Rieske. Los citocromos son una clase de proteínas que contienen un grupo hemo fuertemente unido a la proteína, con hierro coordinado. Los citocromos de las mitocondrias de mamífero se designan *a*, *b* o *c* en función de la banda  $\alpha$  de su espectro de absorción y del tipo de grupo hemo unido. El citocromo *b* del complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* tiene dos grupos hemo *b* con potenciales redox diferentes, un hemo de alto potencial, +0.50 V y un hemo de bajo potencial, -0.100 V. Se ha resuelto la estructura cristalina de este complejo y aparece como un dímero, con una masa molecular de 250 KDa para cada monómero. Presenta un gran dominio que sobresale hacia la matriz mitocondrial y un dominio más pequeño que contiene la proteína ISP y el citocromo *c<sub>1</sub>* sobresaliendo hacia el espacio intermembrana. Durante el proceso de

transferencia electrónica de dos electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo *c* se bombean cuatro protones a través de la membrana interna mitocondrial. El mecanismo que se ha propuesto para explicar la transferencia de electrones a través del complejo citocromo *bc1* se llama ciclo Q. Según este modelo existen dos sitios de unión al ubiquinol o ubiquinona, el sitio  $Q_o$  en el lado positivo de la membrana y el sitio  $Q_i$  en el lado negativo de la membrana, los cuales están asociados a los grupos hemo *b* de bajo potencial (hemo  $b_L$ ) y de alto potencial (hemo  $b_H$ ), respectivamente. El ubiquinol se oxida en el sitio  $Q_o$  y se transfiere un electrón al citocromo  $c_1$  a través del centro redox 2Fe-2S de ISP. De este modo se forma anión ubisemiquinona en el sitio  $Q_o$  que reduce el hemo  $b_L$ , el cual transfiere un electrón al hemo  $b_H$  del sitio  $Q_i$ , el cual cataliza la reducción de la ubiquinona para formar ubisemiquinona estable que, en un segundo ciclo anteriormente referido, se reduce a ubiquinol. Para reducir a la ubiquinona en el sitio  $Q_i$  se captan dos protones en el lado de la membrana interna y se liberan cuatro en el espacio intermembrana durante la transferencia de dos electrones al citocromo  $c_1$ .

El aceptor de electrones del citocromo  $c_1$  del complejo III es el citocromo *c*, una pequeña proteína globular con masa molecular 13 KDa que actúa como un transportador móvil de electrones a la subunidad II del complejo IV.

El complejo IV (citocromo oxidasa) (Figura 1.4D) cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo *c* al oxígeno para formar agua en un mecanismo acoplado a la translocación de protones a través de la membrana. En los mamíferos este complejo tiene una masa molecular de 200 KDa, contiene 13 subunidades. Presenta como grupos redox dos citocromos, *a* y  $a_3$ , y un centro de cobre ( $Cu_A$ ) que forma un centro binuclear con el hemo  $a_3$  en la subunidad I y dos centros de cobre ( $Cu_B$ ) en la subunidad II. Los electrones se transfieren desde el citocromo *c* reducido al  $Cu_A$  de la subunidad II, posteriormente al hemo *a* de la subunidad I y finalmente al centro binuclear  $Cu_B$ -hemo  $a_3$ , donde se produce la transferencia final de electrones al oxígeno. Se bombean dos protones durante la transferencia de dos electrones. Como la reducción del  $O_2$  al agua requiere cuatro electrones, durante el proceso global de formación de agua se produce la traslocación de cuatro protones al espacio intermembrana.

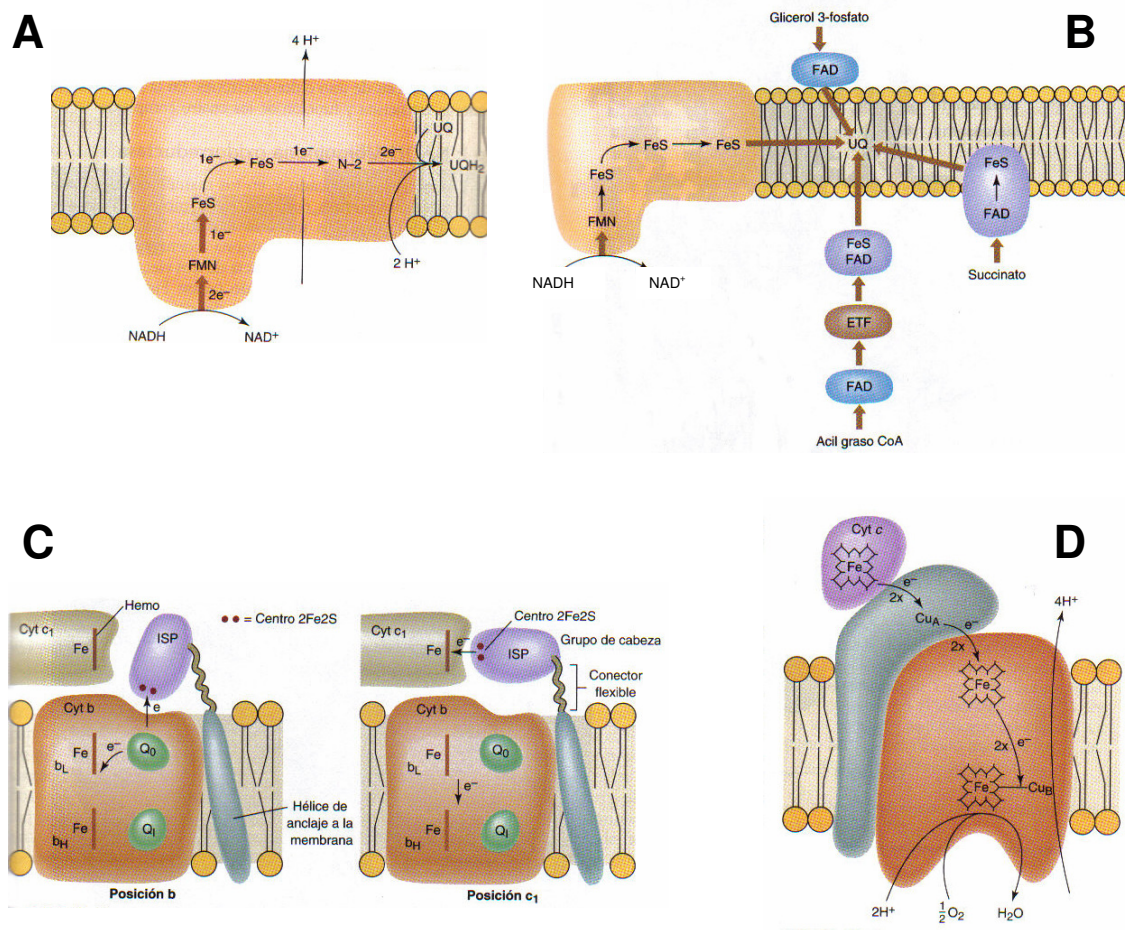


Figura 1.4. Modelos de complejos de la cadena de transporte mitocondrial. A: Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa); B: Complejo II (Succinato-ubiquinona oxidoreductasa y esquema de la reducción de la ubiquinona (UQ) por las flavoproteínas NADH, succinato, glicerol 3-fosfato y acil graso-CoA deshidrogenasas; C: Complejo III (Ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductasa) y movimiento propuesto de la proteína ISP (posición *b* y posición *c*<sub>1</sub>) durante el transporte electrónico; D: Complejo IV (Citocromo *c* oxidasa). Devlin TM (2004).

Por otra parte existe evidencia científica de la existencia de asociación estructural y funcional entre los complejos respiratorios de mitocondrias de mamíferos (Shägger y Pfeiffer, 2000; Schäfer et al., 2007; Vonck y Schäfer, 2008). Schägger y Pfeiffer propusieron el modelo llamado “respirasoma” (Shägger y Pfeiffer, 2000; Schägger y Pfeiffer, 2001; Schägger, 2002). Este modelo justifica la estequiometría general 1:3:6 de los complejos I:III:IV determinada por Hatefi y cols en 1985 mediante la existencia de dos copias del supercomplejo I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>4</sub> y una copia del supercomplejo III<sub>2</sub>IV<sub>4</sub>. En estos estudios los complejos respiratorios de mitocondrias de células cardiacas bovinas se solubilizaron cuantitativamente mediante varios detergentes, a distintas concentraciones (dodecil maltósido (DDM), Tritón X-100 y digitoxina) y se separaron mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida. Usando una elevada



razón digitoxina/proteína las cantidades de complejo I en forma monomérica y complejo III dimérico se redujeron significativamente en comparación con la solubilización con DDM. Sin embargo esta reducción se corresponde con el ensamblaje en los supercomplejos principales llamados *a* (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>) y *b* (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>). Mediante el detergente DDM se solubilizan los complejos respiratorios en forma monomérica, salvo el complejo V, el cual se detecta también como dímero y mediante los detergentes digitoxina y Tritón X-100 se solubilizan los complejos respiratorios en forma de supercomplejos *a*, *b*, *c*, *d* y *e*, que se corresponden con las asociaciones I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>, I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>3</sub> y I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>4</sub>, respectivamente (Shägger y Pfeiffer, 2000; Shägger, 2002). El modelo “respirasoma” sugiere la existencia de dos supercomplejos en la membrana mitocondrial con y sin complejo I (I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub>) y (III<sub>2</sub>IV<sub>4</sub>), con una proporción 2:1, y la presencia complejo II libre y complejo V dimérico (Shägger y Pfeiffer, 2001; Shägger, 2002). Este modelo proporciona así una estequiometría general 1:1:3:3:6.7:3.5 para los complejos I/II/III/IV y V, respectivamente (Shägger y Pfeiffer, 2001; Shägger, 2002). La asociación de los complejos respiratorios en este tipo de complejos multienzimáticos puede proporcionar ventajas funcionales (Shägger y Pfeiffer, 2000; Shägger, 2002; Boekema y Braun, 2007) como la canalización de sustratos, la mejora catalítica (mediante la reducción del tiempo de difusión de los sustratos intermediarios, como el quinol y el citocromo *c*) (Kröger y Klingenberg, 1973, Schäfer *et al.*, 2007), el secuestro de intermediarios reactivos, como la ubisemiquinona (la cual puede generar especies radicalarias de oxígeno, Kotlyar *et al.*, 1990), y una mayor rapidez en las reacciones de transferencia electrónica (Fersht, 1999). Sin embargo la organización real de los complejos respiratorios es más compleja de lo que inicialmente se pensaba y todavía continúa en estudio. Los análisis por microscopía electrónica y la solubilización diferencial de los complejos respiratorios sugirieron la asociación de estructuras más complejas, lo cual ha llevado a establecer un modelo en el cual los supercomplejos se organizarían en una estructura superior (Wittig *et al.*, 2006).

### 1.1.2. LA APOPTOSIS.

La apoptosis o muerte celular programada (PCD, del Inglés Programmed Cell Death) es un mecanismo fisiológico de muerte celular esencial que se caracteriza por un conjunto de alteraciones morfológicas y bioquímicas. Entre las modificaciones morfológicas podemos destacar la reducción del volumen celular, la condensación del núcleo y la formación de vesículas a partir de la membrana plasmática (cuerpos apoptóticos). Estas alteraciones morfológicas están acompañadas de modificaciones

bioquímicas, de las cuales la más característica es la fragmentación del DNA, primero en fragmentos de 50 Kb y después en múltiplos de 150-200 pb.

La apoptosis es un proceso vital tanto para el desarrollo de un organismo como para el control de la homeostasis a lo largo de la vida. Representa un mecanismo de control estricto sobre la existencia de células dañadas, superfluas, mutadas o ectópicas. Durante el desarrollo la muerte celular por apoptosis es esencial para la formación de distintas partes del organismo (Ellis y Horvitz, 1986). Así, la apoptosis es especialmente importante en el desarrollo del sistema nervioso y del sistema inmune, donde existe una sobreproducción inicial de células seguida de muerte celular para establecer las conexiones sinápticas funcionales o las especificidades de antígeno productivas, respectivamente (Nijhawan *et al.*, 2000; Opferman y Korsmeyer, 2003, Elmore, 2007). Por otra parte la apoptosis se encuentra implicada en una amplia variedad de patologías. La falta de regulación por defecto de este mecanismo se encuentra implicada en los procesos cancerígenos (Kerr *et al.*, 1994), el establecimiento de procesos neoplásicos con metástasis, síndrome autoinmune linfoproliferativo (ALPS, Worth *et al.*, 2006) y la resistencia de los tumores a la quimio- o radioterapia. Por el contrario, un exceso de apoptosis parece estar implicado en pérdida severa celular (isquemia/reperfusión, shock séptico, intoxicaciones), así como en enfermedades crónicas degenerativas (Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington o Esclerosis Lateral Amiotrófica), cardiovasculares, autoinmunes (lupus eritematoso, artritis reumatoide, diabetes tipo I) o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El término *apoptosis* se utilizó por primera vez en 1972 (Kerr *et al.*, 1972) para describir las características morfológicas de ciertas células que morían espontáneamente durante el desarrollo. Posteriormente se demostró la existencia de un programa de muerte celular intrínseco que se activa en determinadas circunstancias. Los macrófagos actúan en último lugar eliminando las células apoptóticas antes de que dañen células sanas o inicien una reacción inflamatoria.

Se puede definir igualmente la apoptosis o muerte celular programada comparándola con otro mecanismo de muerte celular: la necrosis. La apoptosis es un fenómeno activo que necesita la participación de la maquinaria enzimática intracelular que conduce a la muerte celular, antes de la pérdida de la integridad de la membrana y de la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos. Las alteraciones morfológicas que caracterizan la apoptosis son la disminución del tamaño celular, pérdida de la capacidad de adhesión (en células adherentes, formación de burbujas en la membrana plasmática

(zeiosis), condensación del núcleo (picnosis) en formas simples y geométricas, fragmentación internucleosomal de la cromatina en fragmentos regulares de aproximadamente 180 pares de bases, translocación de la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa (señal de reconocimiento por los macrófagos) y ruptura proteolítica de sustratos intracelulares. Pueden observarse modificaciones apoptóticas en células en las cuales en núcleo ha sido eliminado experimentalmente (citoplastos) (Jacobson *et al.* 1994, Schulze-Osthoff *et al.* 1994)

En contraposición, la necrosis es una muerte celular provocada por estímulos extracelulares (toxinas, traumatismos físicos y químicos, como exposición a altas concentraciones de detergentes, oxidantes, ionóforos o determinados fármacos) responsables del fraccionamiento de la membrana plasmática. La ruptura de la membrana celular produce la liberación de los constituyentes celulares al espacio intercelular lo que a su vez produce una respuesta inflamatoria destructiva para el tejido en el que se encuentre la célula. Inicialmente la necrosis era considerada como un fenómeno pasivo, que no implicaba la participación de un mecanismo intracelular. Sin embargo este concepto se ha abandonado en los últimos años y se ha puesto de manifiesto que la necrosis, con diferentes características a la ya conocida apoptosis, puede implicar también mecanismos de muerte celular programada (Boujrad *et al.*, 2007; Niquet *et al.*, 2006). De modo que es posible introducir al menos dos tipos más de muerte celular que supondrían situaciones intermedias a las anteriormente descritas:

- PCD “apoptosis-like”, que incluye una condensación de la cromatina menos compacta y geometrías más complejas que la apoptosis clásica. Podría incluirse en esta descripción a las apoptosis descritas como “independientes de caspasas” (Leist y Jäätelä, 2001).

- PCD “necrosis-like”, que no presenta condensación de la cromatina o, en cualquier caso, se trata únicamente de agrupaciones de partículas de la misma (Leist y Jäätelä, 2001). Este tipo de muerte celular suele producirse por inhibición de la apoptosis clásica a nivel de activación de caspasas. Este fenotipo requiere la activación y síntesis proteica (Proskuryakov *et al.*, 2003). Estas formas de muerte celular presentan ciertas características morfológicas y moleculares tanto de la apoptosis como de la necrosis y por ello, también han recibido la denominación de “aponecrosis” (Formigli *et al.*, 2000; Elmore, 2007).

La muerte celular programada se caracteriza por una serie de alteraciones intracelulares organizadas en diferentes fases: (1) una fase heterogénea de iniciación que depende del estímulo inicial; (2) una fase de decisión, común a todos los procesos apoptóticos y que marca el punto sin retorno del suicidio celular; y (3) una fase de degradación, durante la cual se activan hidrolasas catabólicas (caspasas y nucleasas) responsables de las alteraciones morfológicas bioquímicas que caracterizan la apoptosis.

Estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) pusieron de manifiesto la función de una clase específica de proteasas, las “caspasas” (cysteine aspartate-specific proteases) en la apoptosis. Se puso de manifiesto que durante el desarrollo del nemátodo un 12% aproximadamente de las células morían por apoptosis y en este mecanismo estaban implicados una serie de genes: *ced-3*, *ced-4*, *egl-1* como inductores de apoptosis y *ced-9* como inhibidor de la misma (Horvitz, 1999). Los productos de estos genes tienen sus homólogos en mamíferos. Así, *ced-3* es homólogo a las caspasas. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos y llevan a cabo una maduración proteolítica con inducción de apoptosis. *Ced-4* es una proteína adaptadora necesaria para la activación de *ced-3*. El homólogo de *ced-4* en mamíferos es Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), el cual, junto con citocromo *c* y dATP une pro-caspasa-9 para formar el complejo de activación de la pro-caspasa-9 llamado “apoptosoma”. *Ced-9* es una proteína anti-apoptótica homóloga a la oncoproteína humana Bcl-2. En mamíferos se han descubierto diversas proteínas similares a Bcl-2, todas con al menos un dominio BH (Bcl-2 Homology). Los miembros de la familia Bcl-2 pueden ser tanto anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w) como pro-apoptóticos. Algunas de estas proteínas pro-apoptóticas tienen tres dominios BH en su secuencia (Bax, Bak), mientras que otros como Bim y Bid tienen un solo dominio. Los homólogos de la proteína pro-apoptótica de *C. elegans* Egl-1 pertenecen a esta última categoría. En *C. elegans*, Egl-1 interacciona con *ced-9* disociando la interacción entre *ced-9* y *ced-4*. *Ced-9* es una proteína mitocondrial la cual, normalmente, une *ced-4* a las membranas mitocondriales. Tras la expresión de Egl-1, *ced-4* se disocia de la mitocondria y se asocia con la membrana nuclear. Además, una vez disociada, *Ced-4* interacciona con *ced-3* y la activa. En mamíferos, los homólogos de *ced-4* y *ced-9*, Apaf-1 y proteínas tipo Bcl-2, respectivamente, no interaccionan físicamente, y Apaf-1 es una proteína citosólica (Haraguchi *et al.*, 2001). Además, Apaf-1 tiene dominios ausentes en *Ced-4* que interaccionan con citocromo *c* de forma que Apaf-1 puede eliminar la activación de las caspasas.

### 1.1.2.1. Caspasas.

La caracterización de la enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE, del inglés Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme; caspasa 1) en vertebrados, que parecía estar implicada en procesos apoptóticos (Thornberry *et al.*, 1992) reveló que ICE era una cisteín-proteasa de una nueva familia con especificidad de corte en aspártico. Poco después se demostró que el gen *ced-3* codificaba una proteína con similitud a ICE (Yuan *et al.*, 1993). La caracterización de CPP32 (Yama/Apopainá; caspasa 3), otra cisteín-proteasa con homología a ICE, como el ejecutor apoptótico por excelencia en vertebrados superiores, así como su homología todavía mayor con *ced-3*, acabó por asegurar la relevancia de estos mediadores en el proceso apoptótico (Fernández-Alnemri *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995). Así, el término *caspasa*, procedente de cisteín proteasa con especificidad de corte en aspártico, fue adoptado por convenio en 1996 (Alnemri *et al.*, 1996).

Hasta el momento se han identificado 14 caspasas en mamíferos (Kumar, 1995; Alnemri *et al.*, 1996; Nicholson y Thornberry, 1997), de las cuales se ha demostrado la implicación de 8 en la apoptosis (Salvesen y Dixit, 1997; Thornberry y Lazebnik, 1998). La caspasa 1 o ICE fue identificada como un regulador de la respuesta inflamatoria. Todas las caspasas poseen unas características comunes. Comparten similitudes en su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Los aminoácidos del enzima implicados en la unión al sustrato (S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>-S<sub>3</sub>-S<sub>4</sub>) reconocen secuencias de cuatro aminoácidos, denominadas P<sub>4</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>, rompiendo sus sustratos, en el caso de los mamíferos, por el extremo carboxilo del residuo P<sub>1</sub>, que en mamíferos es generalmente un residuo de aspártico, aunque en algunos casos puede ser un residuo de glutámico (Hawkins *et al.*, 2000).

La secuencia de especificidad de corte para las caspasas es, generalmente, X-Glu-X-Asp. Los aminoácidos de los sitios S<sub>1</sub> y S<sub>3</sub> son prácticamente idénticos en las distintas caspasas, mientras que los aminoácidos del enzima que participan en la unión del sustrato (S<sub>2</sub> y S<sub>4</sub>) varían significativamente entre las diferentes caspasas originando distintas especificidades por el sustrato en las posiciones P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>.

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas que contienen tres dominios: el dominio del extremo amino-terminal, que se elimina durante la activación de la caspasa y recibe el nombre de predominio, la subunidad grande, que contiene el sitio activo del

enzima, y la subunidad pequeña C-terminal. Para ser activas las caspasas deben proteolizarse en dos fases. La primera genera las subunidades grande (~20 kDa) y pequeña (~10 kDa), y en el segundo corte se elimina el predominio N-terminal. La caspasa activa consiste en un heterotetrámero formado por el ensamblaje de dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo por tanto dos sitios activos de catálisis (Wolf y Green, 1999).

Las caspasas que poseen un predominio grande pueden estar implicadas o bien en la iniciación de la apoptosis, denominadas caspasas iniciadoras (caspasas -2, -8, -9 y -10) o bien en la maduración de citoquinas, denominadas caspasas proinflamatorias (caspasas -1, -4, -5, -11, -12 y -13). Las caspasas -2, -9 y todas las proinflamatorias poseen predominio CARD (Caspase Recruitment Domain) y las caspasas -8 y -10 contienen predominio DED (Death Efector Domain), que les permite interactuar con proteínas con un dominio homólogo. Las caspasas ejecutoras (caspasas -3, -6 y -7) poseen un predominio pequeño y no poseen dominios CARD ni DED. Las caspasas iniciadoras implicadas en apoptosis actúan por encima de las caspasas ejecutoras y desencadenan la activación en cascada de las mismas (Nicholson *et al.*, 1997).

La mayoría de las caspasas se localizan en el citoplasma, pero existen algunas excepciones como la caspasa-2 (Colussi *et al.*, 1998) que se encuentra en el núcleo y en el aparato de Golgi y la caspasa-12 (Nakagawa *et al.*, 2000) que está presente en la membrana externa del retículo endoplasmático. Se han descrito pequeñas cantidades de caspasa-9, -3 y -2 en la mitocondria (Manzini *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999a).

La caspasa-3 se considera la más importante de todas las caspasas ejecutoras y es activada por las caspasas iniciadoras -8, -9 o -10. La caspasa-3 activa específicamente la endonucleasa CAD (Caspase Activated DNAse), la cual se encuentra normalmente inactiva formando un complejo con su inhibidor, ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNAse, también llamado Factor de Fragmentación de DNA (DFF) (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998). En células apoptóticas la caspasa-3 activada proteoliza ICAD, liberando CAD (Sakahira *et al.*, 1998). CAD degrada el DNA cromosómico en el núcleo y produce la condensación de la cromatina. La caspasa-3 también induce reorganización del citoesqueleto y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. Se ha identificado la gelsolina, una proteína de unión a actina, como uno de los sustratos principales de la caspasa-3 activada (Kothakota *et al.*, 1997). Las caspasas ejecutoras también proteolizan e inactivan proteínas implicadas en la reparación del DNA como PARP (Tewari *et al.*, 1995). La caspasa-8, caspasa-3 y Fas

están implicados en la externalización de la fosfatidilserina. Sin embargo, se ha demostrado que en algunos tipos celulares, como los linfocitos T, parece ser independiente (Vanags *et al.*, 1996; Ferraro-Peyret *et al.*, 2002; Mandal *et al.*, 2005).

En general, la expresión de caspasas es constitutiva, aunque está regulada transcripcionalmente y también a nivel post-traducciona (Earnshaw *et al.*, 1999). También existen mecanismos que regulan la degradación de las caspasas activadas en el proteasoma (Huang *et al.*, 2000). La actividad enzimática de las caspasas está regulada por dos familias de proteínas: IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) y FLIPs (FLICE/caspase 8 Inhibitory Protein).

Las proteínas de la familia IAPs (Deveraux y Reed, 1999) fueron identificadas en primer lugar en baculovirus, por su habilidad para impedir la apoptosis de la célula hospedadora mediante la inhibición de la actividad enzimática de las caspasas. Se han identificado 8 IAPs en mamíferos, entre los que se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y survivina. La capacidad de unión e inhibición de las caspasas reside en los dominios BIR (Baculoviral IAP Repeat), de aproximadamente 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc. Dentro de los IAPs existen dominios RING, que actúan como una ubiquitin-ligasa induciendo su autodegradación (Yang y Li, 2000; Huang *et al.*, 2000), y posiblemente la degradación de la caspasa unida. También presentan dominios CARD que permiten la regulación de la degradación de las caspasas por interacción entre este tipo de dominios.

Las proteínas de la familia FLIPs se identificaron inicialmente en  $\gamma$ -herpes virus y baculovirus (v-FLIPs) y poseen dos regiones homólogas de dominios DED en su extremo amino-terminal. El homólogo celular de v-FLIPs es c-FLIP (también llamado Casper/CASH/CLARP/FLAME/I\_FLICE/MRIT o usurpina) (Irmeler *et al.*, 1997; Shu *et al.*, 1997) el cual presenta dos variantes: c-FLIP<sub>S</sub> y c-FLIP<sub>L</sub>. Debido a su similitud estructural con la caspasa-8 interfieren en su actuación a nivel de formación del DISC. Se unen al adaptador FADD y a la caspasa-8 a través de sus dominios DED bloqueando la unión de la caspasa-8 a su receptor y posterior activación (Irmeler *et al.*, 1997).

Además de IAPs y FLIPs existen otros dos inhibidores importantes de caspasas: p35 y CrmA (Citokine Response Modifier A).

Para estudiar la implicación de las caspasas en la muerte celular programada se diseñaron inhibidores peptídicos sintéticos de diversa especificidad. El inhibidor de caspasas más utilizado es Z-VAD-fmk (García-Calvo *et al.*, 1998).

La inhibición de las caspasas inhibe de forma significativa la adquisición de algunos fenotipos apoptóticos, tales como la formación de cuerpos nucleares apoptóticos. Sin embargo, se observó que, en muchos modelos de inducción de apoptosis, la inhibición farmacológica de las caspasas no evitaba la muerte celular (Hirsch *et al.*, 1997; Green y Kroemer, 1998; Kroemer *et al.*, 1998). Este hecho llevó a diferenciar la apoptosis en dos grupos: la muerte celular dependiente de caspasas y la muerte celular independiente de caspasas.

### 1.1.2.2 Proteínas de la superfamilia Bcl-2.

El gen *bcl-2* (B-Cell Lymphoma 2 gene) fue descrito como un protooncogen que se activaba como resultado de la translocación cromosómica t(14;18)(q32;q21), que aparece en el linfoma folicular de células B (Tsujiimoto *et al.*, 1984). La superfamilia de proteínas de Bcl-2 está constituida por miembros diversos (20 identificados en mamíferos por el momento). Todas ellas poseen al menos uno de los cuatro dominios conservados denominados BH1-BH4 (Bcl-2 Homology), que corresponden a segmentos de hélices  $\alpha$ . Los miembros de esta familia se pueden subdividir en tres grupos de acuerdo con su estructura y función:

#### 1. *Proteínas antiapoptóticas.*

Bcl2 y sus homólogos Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-w inhiben la apoptosis inducida por muchos estímulos citotóxicos. Bcl-2 es una proteína integral de membrana (Lithgow *et al.*, 1994). Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-w sólo se insertan en las membranas después de una señal citotóxica (Krajewski *et al.*, 1994). El núcleo de la estructura tridimensional consiste en una estructura globular formada por cinco hélices  $\alpha$  anfipáticas que rodean dos hélices  $\alpha$  hidrofóbicas. Está bien conservado entre Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-w (Petros *et al.*, 2001; Muchmore *et al.*, 1996). Su dominio hidrofóbico C-terminal facilita su interacción con la región citosólica de tres membranas intracelulares: el retículo endoplásmico, la envoltura nuclear y la membrana externa mitocondrial. La cavidad hidrofóbica formada por residuos de los dominios BH1, BH2 y BH3 puede interaccionar con la hélice  $\alpha$  del dominio BH3 de una proteína “sólo BH3” (Sattler *et al.*, 1997). Otro miembros de esta subfamilia son Mcl-1 (Myeloid Cell Leucemia 1) (Fujise *et al.*, 2000) y Bag-1



(Takayama *et al.*, 1997), y con menor homología respecto a Bcl-2 A1 y Boo/Diva. No está totalmente determinado cómo los miembros de esta subfamilia ejercen su acción. Actualmente se acepta que la función principal de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> es preservar la integridad mitocondrial actuando como antagonistas de proteínas tipo Bax (modelo de integridad mitocondrial), aunque también se ha propuesto su acción sobre el control de las caspasas iniciadoras, mediante el secuestro de sus activadores (modelo de inhibición de caspasas).

## 2. Proteínas proapoptóticas tipo Bax.

Los miembros de esta subfamilia son Bax, Bak y Mtd/Bok, los cuales comparten homología con Bcl-2 en los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no en BH4 donde parece residir la actividad antiapoptótica de la subfamilia de Bcl-2 y sus homólogos. La inactivación simultánea de los genes de Bax y Bak bloquea la apoptosis en muchos tejidos, pero no su inactivación individual (Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001). En células sanas Bax se encuentra en forma monomérica en el citosol (Hsu *et al.*, 1997) y Bak es una proteína oligomérica integral de la membrana externa mitocondrial (Chittenden *et al.*, 1995). Parecen ejercer su acción principalmente en la mitocondria, siendo necesario un cambio conformacional previo que exponga las regiones de homodimerización, que puede estar originado por un cambio de pH (Khaled *et al.*, 1999) o por proteínas “sólo BH3” como Bid (Eskes *et al.*, 2000). Bax sufre un cambio conformacional que le permite oligomerizar e insertarse en la membrana externa mitocondrial produciendo la liberación de citocromo *c* y otros factores apoptogénicos del espacio intermembrana mitocondrial (Zamzami y Kroemer, 2001). Al igual que Bax, Bak sufre un cambio conformacional que conlleva su oligomerización y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> inhiben el cambio conformacional y/o la inserción y oligomerización de Bax (Desagher y Martinou, 2000).

## 3. Proteínas “sólo BH3”.

Se han identificado al menos 10 proteínas en mamíferos pertenecientes a esta subfamilia (Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Blk, Hrk, Noxa, Bnip3, Puma y Bmf). Cada una de estas proteínas está implicada en la transducción de señales mortales específicas, así como en el control de la homeostasis en determinados tejidos y en el desarrollo. Sólo poseen el pequeño dominio central BH3 de 9 aminoácidos, necesario y suficiente para inducir apoptosis. Sin embargo para esto es necesaria la presencia de Bax y Bak (Zong *et al.*, 2001).

Con la posible excepción de Bid, estas proteínas parecen ejercer su acción apoptótica por unión a los miembros antiapoptóticos de la familia, neutralizando así su acción. La hélice  $\alpha$  anfipática de su dominio BH3 puede unirse al surco hidrofóbico creado por las hélices  $\alpha$  de los dominios BH3, BH2 y BH1 de un miembro antiapoptótico (Settler *et al.*, 1997) el cual debe ser previamente “activado” por una señal de muerte. Bid es proteolizado por la acción de la caspasa-8 (Luo *et al.*, 1998) o la granzima B (Barry *et al.*, 2000), originando Bid truncado (tBid), el cual puede insertarse en la membrana externa mitocondrial y activar a Bak (Wei *et al.*, 2000).

Se pueden distinguir dos tipos de proteínas dentro de la familia “sólo BH3” (Letal *et al.*, 2002):

- a) Proteínas tipo Bid, que interaccionan tanto con los miembros proapoptóticos Bak y Bax activándolos como con los antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. A este grupo corresponden Bid y Bim.
- b) Proteínas tipo Bad que únicamente interaccionan con Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, permitiendo la liberación de proteínas tipo Bid que pueden activar a Bax/Bak. A este grupo pertenecen Bad, Bik y Noxa.

### 1.1.3. MITOCONDRIAS Y APOPTOSIS.

Las mitocondrias están particularmente afectadas durante las fases iniciales del proceso apoptótico y actualmente están consideradas como coordinadores centrales de la muerte celular (Bras *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 1995; Kroemer, 1997; Green y Kroemer, 1998; Green y Reed, 1998; Kroemer y Reed, 2000; Boya *et al.*, 2001; Ferri y Kroemer, 2001).

De hecho, diversas señales de transducción pro-apoptóticas y rutas de daño celular, tales como la ausencia de factores de crecimiento, daño en el DNA, hipoxia o agentes quimioterapéuticos, convergen en la mitocondria para inducir permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) y este fenómeno se lleva a cabo bajo el control de proteínas de la familia Bcl-2. (Kroemer *et al.*, 1995; Kroemer, 1997; Green y Kroemer, 1998; Green and Reed, 1998; Kroemer y Reed, 2000; Boya *et al.*, 2001; Ferri y Kroemer, 2001). La permeabilización de la membrana mitocondrial afecta

diferencialmente a las membranas mitocondriales interna y externa a través de diferentes mecanismos (Martinou y Green, 2001; Zamzami y Kroemer, 2001).

La membrana interna se caracteriza por un potencial transmembrana ( $\Delta\Psi_m$ ) generado a través de la actividad de las bombas de protones de la cadena respiratoria.  $\Delta\Psi_m$  se disipa tras la inducción apoptótica (Zamzami *et al*, 1995). Sin embargo la membrana interna retiene proteínas de la matriz indicando que la permeabilización de esta membrana es solamente parcial. Por el contrario, la membrana externa llega a ser completamente permeable a proteínas, conduciendo a la salida de proteínas mitocondriales del espacio intermembrana potencialmente tóxicas que actúan en la fase de degradación de la apoptosis.

Por tanto, hoy en día está ampliamente aceptado un modelo paralelo según el cual, la mitocondria constituye el centro de decisión de la muerte celular programada. Según este modelo, la fase pre-mitocondrial sería la fase de iniciación. Durante esta fase tiene lugar la acumulación de activadores (o la pérdida o disminución/inactivación de inhibidores) que provocarán alteraciones en la mitocondria, fundamentalmente la caída de su potencial transmembrana. Existen dos modelos para explicar la permeabilización de membrana externa mitocondrial:

a) La formación de canales por proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2. Propone la formación de canales integrados por proteínas proapoptóticas tipo Bax (Bax, Bak) mediante su oligomerización en la membrana externa mitocondrial (Eskes *et al*. 2000). Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> inhiben este proceso. Estos canales permiten la salida de factores apoptogénicos del espacio intermembrana, como citocromo c, Smac/Diablo o AIF, entre otros, sin alterar la función mitocondrial. La muerte celular por apoptosis puede involucrar una o varias vías conjuntamente. Cuando la célula tiene suficiente nivel de ATP para activar el proteasoma éste conduce la ruta que activa la caspasa-3 ejecutora. En su defecto, puede producirse la muerte por un mecanismo independiente de caspasas. Este modelo explica las situaciones en las que se produce liberación de factores apoptogénicos previa a la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial.

b) La apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP). Este poro está integrado por el VDAC (Voltaje Dependent Anion Channel), que es la proteína más abundante en la membrana externa mitocondrial y permeable a solutos de  $P_m \leq 5$  kDa, ANT (Adenin Nucleotide Translocator), y ciclofilina D, junto con otras proteínas, entre

la membrana mitocondrial interna y externa (Marzo *et al.*, 1998; Crompton, 1999). La apertura de este poro constituye uno de los sucesos decisivos para la muerte celular, provoca la disipación del potencial transmembrana mitocondrial, la pérdida de ATP y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial en un orden que depende de la rapidez de su apertura. Si los niveles de ATP son suficientes se produce muerte celular por apoptosis. En caso contrario el proceso termina en necrosis debido a un daño mitocondrial irreversible. También se ha descrito la participación de proteínas de la familia Bcl-2 en el control de la apertura del PTP. Los miembros proapoptóticos de esta familia presentan intracciones con ANT (Marzo *et al.*, 1998a) o VDAC (Shimizu *et al.*, 1999) que permiten la apertura del PTP, mientras que los miembros antiapoptóticos provocan el cierre del mismo (Shimizu *et al.*, 1999).

Se han caracterizado varias consecuencias directas de la transición de permeabilidad mitocondrial que constituirían la última fase de la apoptosis, post-mitocondrial o de degradación:

a) la disipación del potencial de membrana seguida de la ruptura del gradiente iónico entre ambos lados de la membrana externa mitocondrial.

b) el hinchamiento o “swelling” de las mitocondrias (puesto que están en un medio con presión osmótica inferior al de su contenido).

c) la salida de la mitocondria de diferentes proteínas, algunas de ellas, con un potencial apoptótico. De las proteínas apoptóticas, liberadas a partir del espacio intermembrana, unas participan en la activación caspasas, y otras contribuyen a la activación de las nucleasas responsables de las modificaciones nucleares (ver apartado 1.1.2). La mitocondria vierte al citosol probablemente todas las proteínas intermembrana solubles a través de la membrana externa permeabilizada cuando se produce la apoptosis. Estudios de espectrometría de masas en mitocondrias tratadas con atractilósido o t-Bid revelan la presencia de una gran variedad de diferentes proteínas que son liberadas al citosol (Patterson *et al.*, 2000; Van Loo *et al.*, 2002), entre ellas, la enzima adenilato kinasa (Kohler *et al.*, 1999), aunque actualmente se desconoce cuales de ellas participan como efectores en el proceso apoptótico, a excepción, principalmente, de las procaspasas -2, -3 y -9 (Susin *et al.*, 1999a) (apartado 1.1.3.1), citocromo *c* (Liu *et al.*, 1996) (apartado 1.1.3.2), Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000) (apartado 1.1.3.3), HtrA2/Omi (Zamzami y Kroemer, 2001) (apartado 1.1.3.4), Endo G (Van Loo *et al.*, 2001) (apartado 1.1.3.5) y AIF (Apoptosis-Inducing Factor, Susin *et*

*al.*, 1999b) la cual es la proteína objeto de este estudio y se detalla más adelante en el apartado 1.3.

#### **1.1.3.1. Caspasas del espacio intermembrana mitocondrial.**

A pesar de que la mayoría de pro-caspasas tienen una localización citosólica algunas pro-caspasas están presentes en el espacio intermembrana mitocondrial, incluyendo caspasas-2, -3 y -9 (Manzini *et al.*, 1998; Krajewski *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 1999a). La cantidad relativa de pro-caspasa-9 y -3 que se encuentra en la mitocondria, respecto a la del citosol depende del tipo celular. En células SHEP de neuroblastoma (pero no en células HeLa), el espacio intermembrana mitocondrial también contiene caspasa-9 madura, pre-procesada (Constantini *et al.*, 2002). Esta caspasa-9 pre-procesada es probable que tenga escasa actividad enzimática, o nula, en ausencia de interacción con Apaf-1. Todavía no está claro a través de qué mecanismos ciertas pro-caspasas se segregan a la mitocondria. Bajo inducción apoptótica, las pro-caspasas salen de la mitocondria, y es razonable asumir que participan en la inducción apoptótica. El secuestro de pro-caspasa-9 en el espacio intermembrana mitocondrial de algunos tipos celulares, por ejemplo las neuronas, puede constituir un mecanismo adicional para prevenir la activación de las caspasas.

#### **1.1.3.2. Citocromo *c*.**

El citocromo *c* es una proteína codificada por un gen nuclear. Se traduce en forma de precursor (apo-citocromo *c*) el cual no es activo para la inducción de la apoptosis. Este precursor se transporta a la mitocondria, donde se pliega en una proteína globular al mismo tiempo que la citocromo *c* liasa cataliza la unión de un grupo hemo. El holo-citocromo *c* permanece en el espacio intermembrana mitocondrial donde actúa como transportador electrónico entre los complejos III y IV de la respiración. En 1996 se demostró que el holo-citocromo *c* es necesario para la activación de la caspasa-3 en un sistema acelular (Liu *et al.*, 1996). Este hecho se ha confirmado por diferentes estudios en los cuales se demuestra que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 inhibe la liberación de citocromo *c* y la activación de las caspasas (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Una vez en el citosol, el citocromo *c* se une a Apaf-1 a través de su región C-terminal rica en dominios WD (Zhou *et al.*, 1997). Este hecho facilita la unión de ATP a Apaf-1 y expone una superficie de oligomerización en la región N-terminal homóloga *Ced-4* de la proteína (Adrain *et al.*, 1999). La oligomerización de Apaf-1 se

acompaña de la unión de pro-caspasa-9 al motivo CARD en N-terminal de Apaf-1. La maduración proteolítica de la caspasa-9 en el complejo se lleva a cabo a través de un procesamiento cis autocatalítico en la molécula caspasa-9 individual. Sin embargo, estudios con mutantes de pro-caspasa-9 incapaces de realizar este procesamiento han revelado que Apaf-1 funciona como un activador alostérico y esta sola interacción es suficiente para su activación enzimática.

### 1.1.3.3. Smac/DIABLO.

La proteína Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases) (Du *et al.*, 2000) también denominada Diablo (Direct IAP Binding protein with low pI) (Verhagen *et al.*, 2000) se sintetiza como un precursor de 239 aminoácidos que se transporta a la mitocondria a través de su dominio N-terminal. Esta secuencia de localización mitocondrial (MLS) se elimina proteolíticamente tras su importe al espacio intermembrana. En respuesta a varios estímulos apoptóticos, Smac/DIABLO madura se elimina al citosol, donde inhibe IAPs (inhibidores de proteínas apoptóticas). IAPs tales como XIAP, c-IAP1, y c-IAP2, pueden unirse e inhibir caspasa-3 y -9 procesadas. La unidad funcional en cada IAP es la llamada BIR (baculovirus IAP repeat). La mayoría de las IAP de los mamíferos tienen más de un dominio BIR, cada una con diferente función. Por ejemplo, en XIAP, el tercer dominio BIR (BIR3) inhibe potencialmente la actividad de la caspasa-9 procesada, mientras que la región espaciadora entre BIR1 y BIR2 se dirige selectivamente a caspasa-3 (Takahashi *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000). En células que llevan a cabo apoptosis, las caspasas se liberan del bloqueo IAP. Experimentos *in vitro* posteriores han puesto de manifiesto una interacción entre Smac/DIABLO y BIR2 y BIR3 de XIAP, que se anula por mutaciones en la región N-terminal de Smac/DIABLO. Se ha demostrado que AIF (Apoptosis-Inducing Factor) se une a XIAP. El dominio BIR2 de XIAP es suficiente para la interacción XIAP/AIF, la cual se anula por Smac/DIABLO. Además se ha encontrado que AIF es una diana para la ubiquitinación mediada por XIAP (Wilkinson *et al.*, 2008). Además, un péptido correspondiente a esta región N-terminal es suficiente para facilitar la activación de caspasas en extractos celulares. Tres proteínas pro-apoptóticas de *Drosophila*, Hid, Reaper y Grim, son similares en N-terminal a Smac, comenzando en un residuo de alanina (AVPS) que es responsable de su actividad inhibitoria de IAP (Abrams, 1999; Wu *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2001). Cuando se une a IAP, Smac desplaza caspasas activas o previene la unión de IAPs a caspasas activas y, por tanto, promueve la muerte celular.

#### 1.1.3.4. HtrA2/Omi.

HtrA2/Omi se identificó como una nueva proteína de unión a IAP (Hegde *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Verhagen *et al.*, 2001). El precursor de HtrA2 es una proteína de 50kDa. La secuencia N-terminal que contiene MLS se procesa después de su transporte a la mitocondria, generando una forma madura de 36kDa con una secuencia N-terminal similar a la de Smac. HtrA2 pertenece a una familia de serin proteasas muy conservadas entre bacterias y humanos. La endoproteasa HtrA bacteriana se localiza en el espacio periplásmico de la bacteria y su presencia es necesaria para la termotolerancia bacteriana (Lipinska *et al.*, 1990). Recientemente se ha demostrado que HtrA bacteriana tiene una función dual actuando como chaperona a una temperatura normal y como una proteasa activa a altas temperaturas (Spiess *et al.*, 1999). En células normales humanas, HtrA2 está confinada en el espacio intermembrana mitocondrial. Tras inducción de apoptosis con diferentes estímulos que incluyen estaurosporina, TRAIL, o radiación UV, HtrA2 se elimina al citosol (Hegde *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Vergagen *et al.*, 2001) donde la forma madura de la proteína, pero no su precursor, se une a IAPs de una forma similar a como lo hace Smac/DIABLO, y por tanto, facilitando la activación de las caspasas. Sin embargo, a diferencia de Smac/DIABLO, la sobreexpresión de HtrA2 extramitocondrial induce muerte celular sin formación de burbujas de la membrana plasmática o formación de cuerpos apoptóticos, mientras que se mantiene la integridad de la membrana plasmática (Suzuki *et al.*, 2001). Además, la sobreexpresión de HtrA2 induce muerte celular en presencia de inhibidores de caspasa así como en células Apaf-1<sup>-/-</sup> y caspasa-9<sup>-/-</sup> (Hegde *et al.*, 2001). La mutación en N-terminal (que anula la actividad anti-IAP) y la mutación simultánea de residuos aminoacídicos requeridos para la actividad serin proteasa eliminan completamente la función inductora de apoptosis de HtrA2 (Suzuki *et al.*, 2001). Por tanto, HtrA2 promueve la muerte celular a través de dos mecanismos diferentes: el primero relacionado con la inhibición de IAP e implica un incremento de la actividad caspasa y el segundo dependiente de su actividad serin proteasa y caspasa-independiente (Hegde *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001).

#### 1.1.3.5. Endonucleasa G.

La endonucleasa G (Endo G) es un factor mitocondrial que, al igual que AIF, se trasloca al núcleo (Li *et al.*, 2001). Endo G es una nucleasa mitocondrial codificada por un gen nuclear. Endo G se puede obtener de mitocondrias tratadas con la forma activa

de la proteína pro-apoptótica Bid. Una vez liberada al citosol, endo G se trastoca al núcleo donde produce fragmentación oligonucleosomal del DNA incluso en presencia de inhibidores de caspasas (Li *et al.*, 2001). Estudios posteriores han demostrado que Endo G origina la fragmentación de alto peso molecular y la ruptura oligonucleosomal de modo secuencial. Además, Endo G coopera con la exonucleasa y Dnasa I para facilitar el procesamiento del DNA (Widlak *et al.*, 2001). Además se ha demostrado que Endo G forma un complejo con AIF y que la proteína de choque térmico Hsp70 interacciona con EndoG y está implicada en la regulación de su actividad (Kalinowska, 2005). Por otra parte se ha encontrado también una relación entre CPS-6 (homólogo de Endo G) con WAH-1, un homólogo a AIF, en *Caenorhabditis elegans* (Wang *et al.*, 2002). En este caso WAH-1 se elimina al citosol y núcleo mediante la proteína de dominio BH3 EGL-1 de un modo dependiente de caspasas (CED-3). WAH-1 se asocia y coopera con CPS-6 (Endo G) promoviendo la degradación del DNA y la apoptosis. De este modo, AIF y Endo G parecen actuar en la misma ruta para la degradación del DNA, conservada en la evolución.

En conclusión, la mitocondria constituye el punto decisivo y sin retorno de este proceso de muerte celular, convirtiéndose en una diana terapéutica para un amplio espectro de patologías como la isquemia-reperfusión cerebral (Christophe y Nicholas, 2006), los procesos neurodegenerativos, como el Alzheimer, y enfermedades neurológicas (Culmsee y Landshamer, 2006; Camins *et al.*, 2008; Gazulli *et al.*, 2008), donde los procesos apoptóticos revisten gran importancia, y el cáncer (Lorenzo y Susin, 2007; Gazulli *et al.*, 2006).

#### **1.1.4 MECANISMOS DE LA APOPTOSIS.**

Los sistemas implicados en la apoptosis son complejos y sofisticados e implican una cascada de mecanismos moleculares que requieren energía. Actualmente están aceptadas dos rutas principales apoptoticas: la ruta apoptótica mitocondrial (vía intrínseca) y la apoptosis mediada por receptores mortales (vía extrínseca). Sin embargo existe evidencia de que las dos rutas están unidas y que las moléculas de una ruta pueden influir sobre la otra (Igney y Krammer, 2002). Existe una tercera ruta mediada por los sistemas perforina/granzima o granulisina, implicada en la citotoxicidad de los linfocitos T.



#### 1.1.4.1. Ruta apoptótica mitocondrial (vía intrínseca)

Esta ruta, también llamada *vía intrínseca* por estar generalmente activada por moléculas endógenas, que producen señales intracelulares que actúan directamente en moléculas diana celulares que afectan a la mitocondria (ver Figura 1.6). Estas señales pueden producirse por presencia o ausencia de las mencionadas moléculas endógenas. Así, la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas puede producir un fallo en el mecanismo de supresión de la apoptosis y conducir a la activación de la muerte celular. Por otra parte la presencia de estímulos apoptóticos como los agentes quimioterápicos, radiación ionizante, neurotoxinas, hipoxia, hipertermia, daño al DNA, infecciones virales, radicales libres, etc., pueden originar la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) iniciando esta ruta apoptótica (Elmore, 2007).

Puede llevarse a cabo por tres vías distintas:

##### 1. Apoptosis clásica.

Implica la liberación de citocromo *c* del espacio intermembrana, el cual desencadena la ejecución de la apoptosis (Figura 1.5). El citocromo *c* en el citoplasma se une al extremo C-terminal de la proteína adaptadora Apaf-1 (del inglés, Apoptotic Protease Activating Factor 1, homóloga de Ced-4 en *C. elegans*), facilitando la unión de dATP a Apaf-1 y permitiendo su oligomerización. El extremo N-terminal de Apaf-1 posee un dominio CARD que interacciona con el de la procaspasa 9, la cual se activa dentro del complejo llamado “apoptosoma” (Chinnaiyan, 1999; Acehan *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2004)). La estequiometría procaspasa 9:Apaf-1 es aproximadamente 2:1, y la de la caspasa 9 activa:Apaf-1 es 1:1. La liberación simultánea de Smac/Diablo anula la acción inhibitoria de los IAPs sobre las caspasas, permitiendo así la activación de las caspasas y dando lugar al conocido fenotipo apoptótico (Van Loo *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2000; Schimmer *et al.*, 2004).

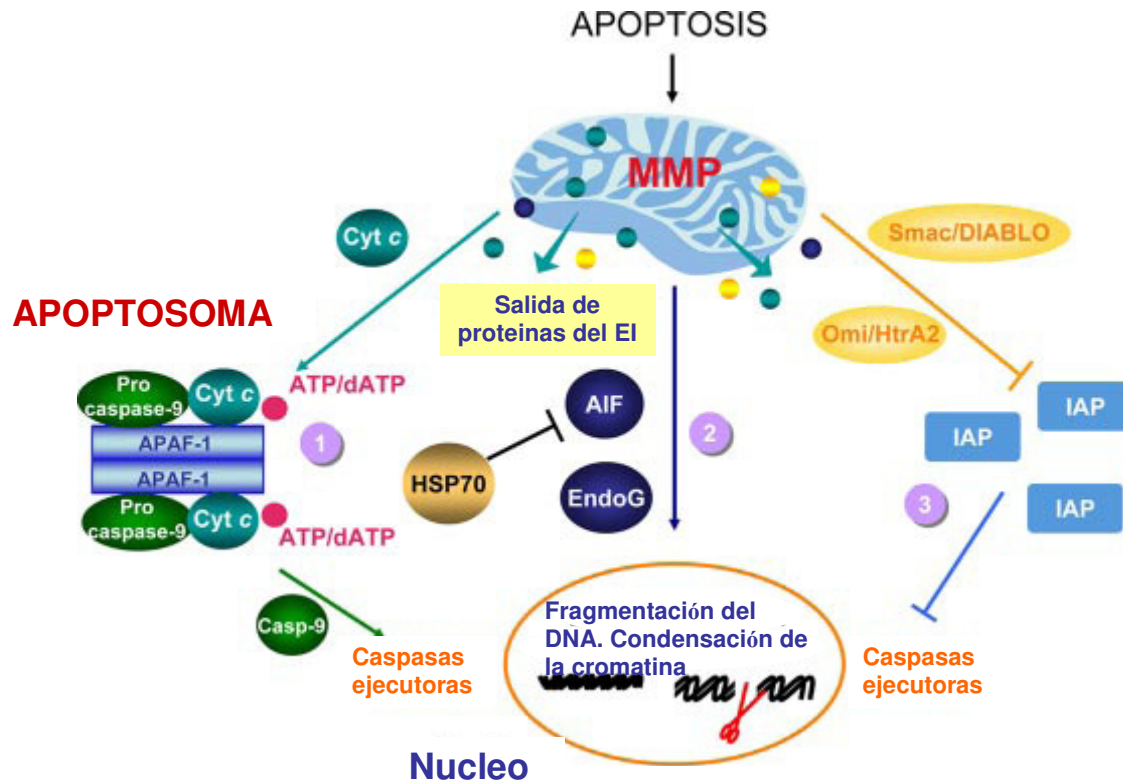


Figura 1.5. Salida de proteínas del espacio intermembrana (EI). Las señales proapoptóticas producen permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP). EL citocromo c induce la formación del “apoptosoma”. AIF y EndoG se translocan al núcleo donde inducen la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina por una vía independiente de caspasas. Modificado de Kroemer *et al.*, 2007.

## 2. Apoptosis “independiente de caspasas”.

La despolarización de la mitocondria produce también la liberación de AIF y endonucleasa G del espacio intermembrana (Figura 1.5). AIF y Endo G inducen apoptosis independientemente de caspasas. Una vez se transloca al núcleo AIF da lugar a un fenotipo característico debido a la fragmentación del DNA en fragmentos de alto peso molecular (~ 50 kpb) y condensación periférica de la cromatina, que se corresponde con el llamado “estadio I” (Susin *et al.*, 1999b). AIF puede actuar al mismo tiempo que la vía anterior (Susin *et al.*, 2000). La endonucleasa G también se transloca al núcleo, donde fragmenta la cromatina nuclear produciendo fragmentos de DNA oligonucleosomales (Li *et al.*, 2001).

### 3. Apoptosis mediada por ROS (Radicales libres de oxígeno).

Esta vía conduce a un fenotipo necrótico (“PCD necrosis like”) debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno y  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria (Leist y Jäättelä, 2001).

Normalmente, puede producirse la activación simultánea de varias rutas (Susin et al., 1999b). La activación de la vía dependiente de caspasas o independiente de caspasas en células neuronales parece depender de la región cerebral, el tipo celular y la edad (Volbracht *et al.*, 2001; Elmore, 2007).

#### 1.1.4.2. Ruta apoptótica mediada por receptores mortales (vía extrínseca).

Se denomina también vía extrínseca porque la inducción de muerte se produce en respuesta a ligandos extracelulares (Peter *et al.*, 1999). Los receptores mortales más conocidos pertenecen a la superfamilia del receptor TNF (TNFR) (Locksley *et al.*, 2001), los cuales pueden transmitir señales de proliferación, diferenciación o muerte, según el tipo celular en el que se expresen (Ashkenazi *et al.*, 1998; Wallach *et al.*, 1998). Todos estos receptores poseen el dominio citoplásmico de 80 aminoácidos llamado dominio mortal o DD (Death Domain) (Ashkenazi y Dixit, 1998), necesario para la transducción de la señal mortal. Hasta el momento los ligandos mejor caracterizados y sus correspondientes receptores mortales incluyen FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi *et al.*, 1998; Peter y Krammer, 1998; Suliman *et al.*, 2001; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005).

La secuencia de eventos de la ruta extrínseca mejor caracterizados son los definidos por los modelos FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR. El ligando de Fas o FasL, es una proteína de membrana de tipo II que se expresa en la membrana plasmática de la célula efectora o en microvesículas liberadas por lisosomas secretores (Monleón *et al.*, 2001). Tras la ligación y multimerización de Fas, inducida por FasL, un complejo de proteínas llamado DISC (Death-Inducing Signalling Complex) se asocia con su dominio citoplásmico (ver Figura 1.6). La molécula FADD (Fas Associated protein with a Death Domain) se une al dominio mortal DD de Fas a través de su propio dominio mortal DD. La unión del ligando TNF a su receptor TNFR produce la unión de la proteína TRADD, que a su vez se une a FADD y RIP (Hsu *et al.*, 1995; Wajant *et al.*,

2002). FADD posee un dominio efector mortal (DED, Death Effector Domain) al cual se une la procaspasa-8 a través de su propio dominio efector de muerte DED, formándose así el complejo. La agregación de dos o más moléculas de procaspasa-8 conduce a su activación autoproteolítica y su liberación al citoplasma (Kischkel *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998). Una vez activada, la caspasa-8 puede iniciar diferentes vías de señalización de apoptosis. Según algunos autores existen dos mecanismos de inducción de apoptosis vía Fas dependiendo del tipo celular (I ó II) (Scaffidi *et al.*, 1998). Según este modelo en células tipo I cantidades elevadas de caspasa-8 activa inician la cascada de caspasas directamente, proteolizando y activando a las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3. Esta vía no implica a la mitocondria y no es bloqueada por Bcl-2 pero sí por inhibidores de caspasas. En las células tipo II la apoptosis inducida por Fas precisa de la amplificación mitocondrial, de modo que pequeñas cantidades de caspasa-8 activa proteolizan a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2, que se transloca a la mitocondria induciendo la oligomerización de Bax/Bak y la liberación de citocromo c (Gross *et al.*, 1999). Esta vía se inhibe por Bcl-2 (Scaffidi *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1999). Sin embargo según otros autores las células tipo II sólo existen *in vitro* y todas las células *in vivo* son de tipo I, por lo que la muerte inducida por Fas sería independiente de Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Huang *et al.*, 2000). La apoptosis inducida por receptores mortales se puede inhibir mediante una proteína llamada c-FLIP, la cual se une a FADD y a la caspasa-8, inactivándolos (Kataoka *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999).

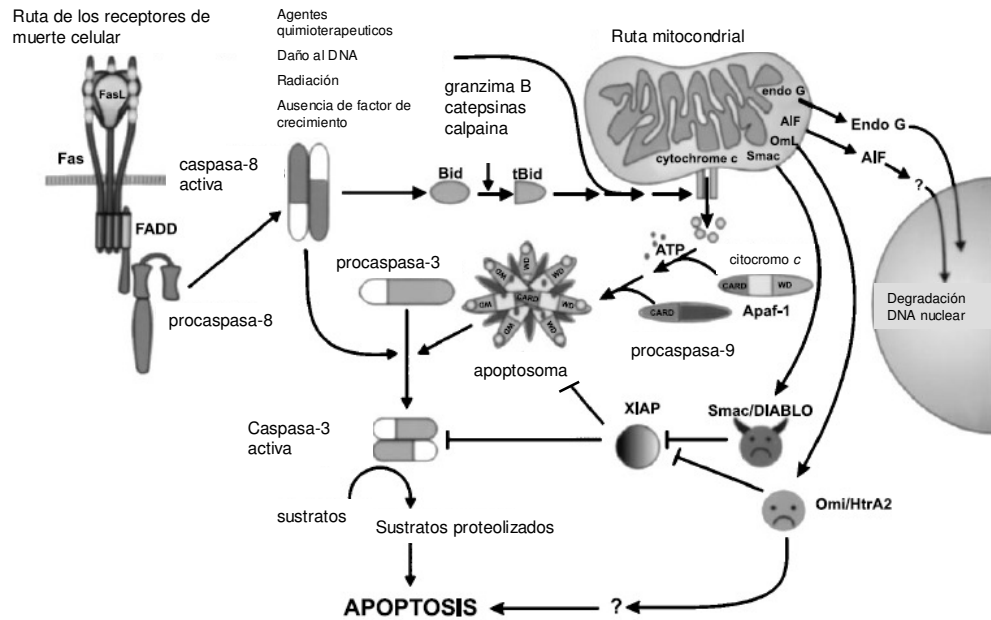


Figura 1.6. Principales rutas de muerte celular: la ruta de receptores mortales y la ruta mitocondrial. Muchos estímulos apoptóticos convergen en la mitocondria y provocan la salida de proteínas apoptóticas como el citocromo *c*, AIF, endonucleasa G, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2. El citocromo *c* induce la activación de caspasas mediante su unión a Apaf-1. Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 neutralizan la inhibición de las IAPs sobre las caspasas. AIF y endonucleasa G están implicadas en una vía de degradación del DNA nuclear independiente de caspasas. Modificado de G. van Gurp *et al.*, 2003.

Las proteínas de choque térmico (Hsp, del inglés Heat Shock Protein) desarrollan una importante función reguladora en todos los niveles del proceso apoptótico, tanto de la ruta mitocondrial como de la ruta mediada por receptores (Lanneau *et al.*, 2008; Parcellier *et al.*, 2003), interaccionando directamente con factores apoptogénicos como Akt (Rane *et al.*, 2003), c-Jun N-terminal kinasa (Park *et al.*, 2001), Bax (Stankiewicz *et al.*, 2005), citocromo *c* (Bruey *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000), FLIPS (Panner *et al.*, 2007), AIF (Ravagnan *et al.*, 2001) y Endo G (Kalinowska *et al.*, 2005), entre otros, o actuando a nivel lisosomal (Nylandsted *et al.*, 2004).

### 1.1.4.3. Otras rutas apoptóticas: sistema perforina/granzima y granulisina.

Los linfocitos T citotóxicos son capaces de inducir apoptosis en células diana a través de la ruta extrínseca, principalmente mediante el sistema FasL/FasR (Brunner *et al.*, 2003). Sin embargo los linfocitos T citotóxicos y las células NK (del Inglés, Nuclear Killer) han desarrollado otras rutas para inducir apoptosis sobre la célula diana. Hasta el momento los dos mecanismos principales identificados son el sistema perforina/granzima y la granulisina.

El sistema perforina/granzima se basa en la inserción de la perforina en la membrana plasmática de la célula diana facilitando la entrada de gránulos citoplásmicos eliminados mediante exocitosis que contienen granzimas. Dentro de la célula los granzimas activan un sistema de proteólisis que conduce a la muerte celular (Anel *et al.*, 1997; Trapani y Smyth, 2002). Se expresan al menos 10 serín proteasas diferentes, siendo la granzima A y la granzima B las principales responsables de esta citotoxicidad (Pardo *et al.*, 2002). La granzima B es una serín proteasa que comparte con las caspasas la especificidad por el sustrato, caracterizada por la necesidad de un residuo aspártico en la posición P<sub>1</sub>. Por tanto activa la pro-caspasa-10 y puede activar factores como ICAD (Sakahira *et al.*, 1998). La granzima B puede utilizar la vía mitocondrial para la amplificación de su señal de muerte mediante corte específico de Bid y la subsecuente despolarización de la membrana externa mitocondrial con la eliminación al citosol de citocromo *c* y otros factores apoptogénicos (Barry y Bleackley, 2002; Russell y Ley, 2002). La granzima B también puede activar directamente la caspasa-3. La granzima A también es una molécula inductora de apoptosis importante en los linfocitos T citotóxicos y activa rutas independientes de caspasas. Tiene una especificidad similar a la tripsina y corta enlaces Lys-X y Arg-X. En la célula la granzima A activa la DNasa NM23-H1, que es el producto de un gen supresor de tumores (Fan *et al.*, 2003). La proteína de ensamblaje nucleosomal SET inhibe el gen NM23-H1. La granzima A corta el complejo SET liberando NM23-H1, lo cual conduce a la degradación del DNA. El complejo SET tiene también funciones importantes en la estructura de la cromatina y la reparación del DNA. Por tanto la inactivación de este complejo por la granzima A contribuye a la apoptosis al alterar el mantenimiento del DNA y la integridad de la estructura de la cromatina (Lieberman y Fan, 2003).

La granulisina es una proteína localizada en gránulos que es exocitada por los linfocitos T citotóxicos (Pena *et al.*, 1997b). Es un miembro de la familia de unión a lípidos (SAPLIP) implicadas en la degradación de lípidos (Pena *et al.*, 1997a; Krensky

*et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 1999). Se ha sugerido que interacciona con las membranas lipídicas a través de una agrupación de residuos con carga positiva, produciéndose la agregación de varias moléculas, lo cual contribuye a perturbar el núcleo hidrofóbico de la membrana con la que interacciona (Anderson *et al.*, 2003). Tiene homología con la familia de las amebaporinas, los cuales son péptidos antibacterianos presentes en eucariotas unicelulares (Leippe *et al.*, 1995). La función principal de la granulicina parece ser la eliminación de diversos patógenos celulares mediante la permeabilización de sus membranas formando poros (Ernst *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2003).

La ruta intrínseca o mitocondrial, con excepción de su vía *independiente de caspasas*, la ruta extrínseca y la ruta de la perforina/granzima, con excepción de la vía derivada de la granzima A, confluyen en un punto común, definido por la activación de la caspasa-3, la cual inicia la fase final de la apoptosis (Figura 1.7). En esta fase también se activan el resto de caspasas ejecutoras (caspasa-6 y caspasa-7). Las caspasas ejecutoras, tal y como se ha descrito en el apartado 1.1.2.1, proteolizan varios sustratos como citoqueratinas, PARP, proteínas del citoesqueleto, la proteína nuclear NuMA y otras, lo cual en último término provoca los cambios morfológicos y bioquímicos observados en las células apoptóticas (Slee *et al.*, 2001). La endonucleasa CAD sale de la mitocondria y se transloca al núcleo, donde tras su activación por la caspasa-3, a través de la proteólisis de su inhibidor ICAD (Sakahira *et al.*, 1998), produce fragmentación oligonucleosomal del DNA y una mayor estado de condensación de la cromatina (Enari *et al.*, 1998), llamado “Estadio II” (Susin *et al.*, 2000).

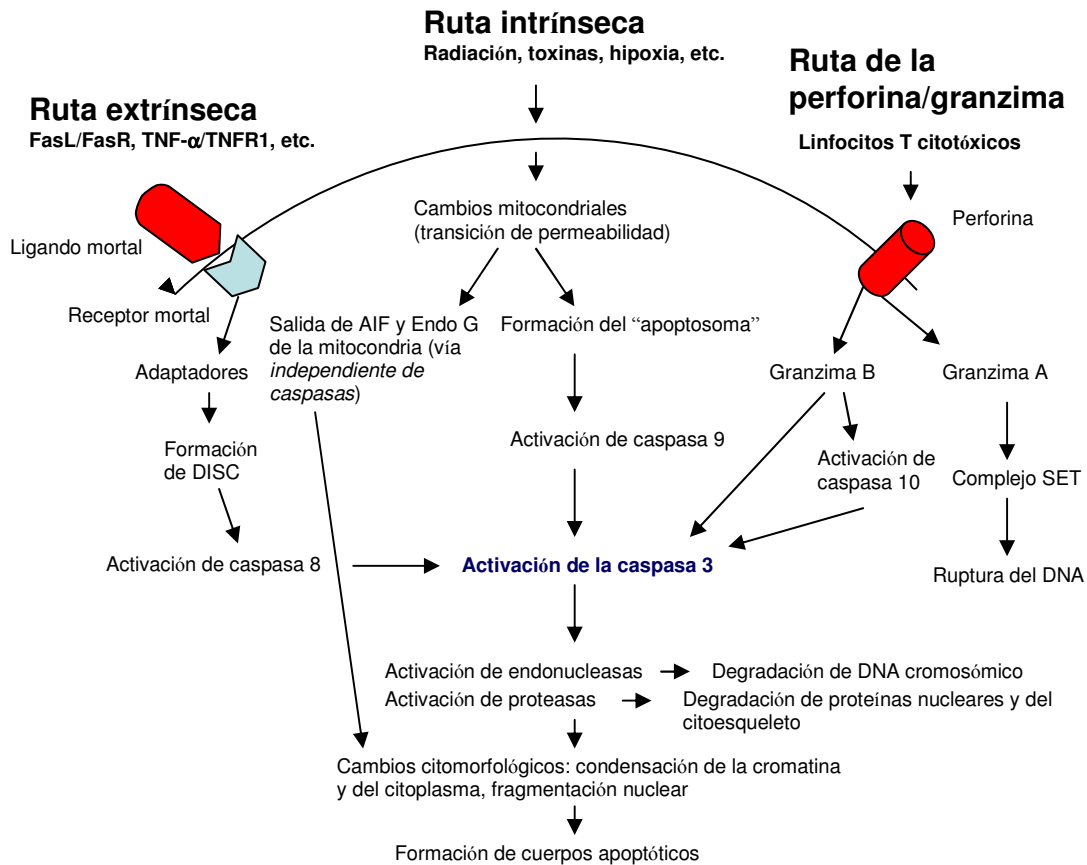


Figura 1.7. Representación esquemática de los eventos apoptóticos. Se muestran las dos rutas principales, intrínseca y extrínseca, así como la ruta de la perforina/granzima. Cada ruta activa su caspasa iniciadora específica (8, 9, 10), que a su vez activa la caspasa-3, lo cual marca el inicio de la fase ejecutora. La granzima B en la ruta de la perforina/granzima y la salida de AIF y EndoG en la ruta intrínseca o mitocondrial son vías apoptóticas independientes de caspasas. La fase de ejecución incluye cambios citomorfológicos característicos con la formación final de cuerpos apoptóticos y su fagocitosis por parte de los macrófagos. Esquema modificado de Elmore, 2007.

La fagocitosis de las células apoptóticas es el último paso de la muerte celular programada. La asimetría de fosfolípidos y la externalización de fosfatidilserina en la superficie externa de las células apoptóticas facilita el reconocimiento por los macrófagos permitiendo su eliminación en ausencia de respuesta inflamatoria (Fadok *et al.*, 2001; Elmore, 2007).



## 1.2 PROTEINAS REDOX Y APOPTOSIS.

Los estudios realizados sobre las funciones celulares no apoptóticas de proteínas inductoras de apoptosis han llevado a la hipótesis de que cualquier proteína que esté implicada de modo específico en el proceso apoptótico debe tener una función filogenéticamente conservada no relacionada con la apoptosis, y probablemente implicada en procesos de respuesta adaptativa a estrés celular (Galluzi *et al.*, 2008).

Durante los últimos años se ha demostrado que muchas bacterias patógenas secretan al medio enzimas relacionadas con la utilización de ATP, tales como nucleósido difosfato kinasa, 5'-nucleotidasa y adenilato kinasa. En varios patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* o *Vibrio cholerae* se ha demostrado que este proceso produce la muerte de macrófagos y mastocitos (Zaborina *et al.*, 1999; Melnikov *et al.*, 2000; Punj *et al.*, 2000). Este hecho proporciona la evidencia de que proteínas que están normalmente implicadas en procesos energéticos pueden producir muerte celular. Se ha demostrado en *P. aeruginosa* que la secreción al medio de azurina y citocromo *c*<sub>551</sub>, enzimas redox normalmente implicados en procesos energéticos a través de reacciones de transferencia de electrones, produce la muerte por apoptosis de macrófagos y mastocitos (Zaborina *et al.*, 2000). Este efecto sobre los macrófagos también se ha demostrado con un homólogo de azurina de *B. cepacia* (Punj *et al.*, 2003). Además se ha demostrado que estas proteínas son altamente citotóxicas para macrófagos J744 y células cancerígenas (Yamada *et al.*, 2002a). La azurina, una enzima que contiene cobre implicada en desnitrificación, entra en células de mamífero como macrófagos J774 y células humanas de melanoma, se transporta al núcleo y forma un complejo con p53. La estabilización de p53, normalmente lábil y con una vida media de pocos minutos, incrementa su concentración intracelular activando los procesos de parada del ciclo celular por activación transcripcional de un inhibidor e inducción de apoptosis a través de activación transcripcional de genes que codifican proteínas proapoptóticas como Bax o Noxa que interaccionan con la mitocondria o activando genes que codifican diferentes oxidasas mitocondriales capaces de generar ROS (Schuler y Green, 2001) o bien por interacción directa con la mitocondria (Marchenko *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la azurina puede ser transportada directamente a la mitocondria (Yamada *et al.*, 2002a). La generación de ROS no se debe a la actividad redox de la azurina, ya que un mutante carente de esta actividad es altamente citotóxico para los macrófagos (Goto *et al.*, 2003). Al igual que PRG3 la actividad redox no es requerida para inducir muerte celular por apoptosis (Ohiro *et al.*, 2002). Igualmente, el

citocromo *c* eliminado de la mitocondria no está implicado en la apoptosis por sus propiedades redox, sino por su capacidad para formar un complejo con apaf-1 y producir la activación del apoptosoma con la consecuente activación de la cascada de caspasas (Adrain y Martin, 2001). Se ha demostrado que AIF forma un complejo con Hsp70, aunque su función no se ha determinado (Ravagnan et al, 2002). La presencia de una proteína redox en el citosol parece señalar en la célula de mamífero un fallo en la generación de energía, iniciando en algunos casos el proceso apoptótico a través de la formación de complejos con proteínas citosólicas (Punj y Chakrabarty, 2003). Se desconoce si la azurina es capaz de producir fragmentación de alto peso molecular como AIF. Recientemente se ha descrito que la proteína 38 de la membrana externa de *Acinetobacter baumannii* (Omp38) puede actuar como un factor de virulencia ya que se localiza en la mitocondrias de células epiteliales infectadas e induce apoptosis a través de la salida al citosol de moléculas proapoptóticas como citocromo *c* y AIF (Choi *et al.*, 2005).

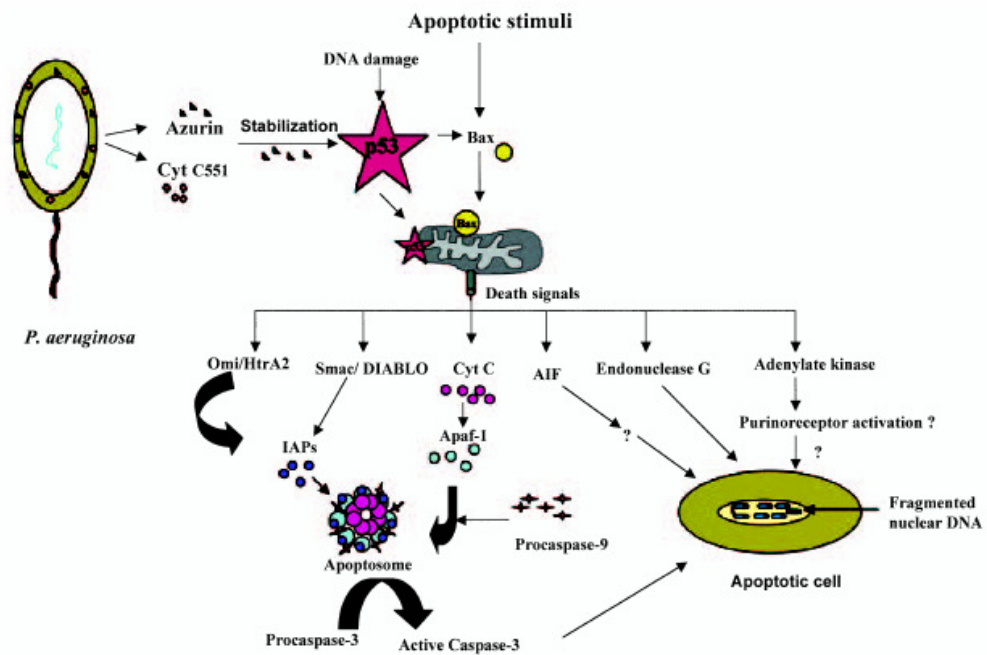


Figura 1.8. Diferentes funciones de las proteínas redox, ya sea eliminadas por *P. Aeruginosa* o por la mitocondria, en la muerte de células de mamífero. (Modificado de Punj *et al.*, 2003).

Se considera que las mitocondrias evolucionaron de organismos procariotas como endosimbiontes. Probablemente las mitocondrias provienen de una  $\alpha$ -proteobacteria ancestral que entró en una relación simbiótica con los antepasados de las presentes células eucariotas hace unos dos mil millones de años. Se considera que esta

relación simbiótica facilitó a las células eucariotas ancestrales a utilizar el metabolismo oxidativo de la bacteria simbiote en su proceso de adaptación desde un entorno anaeróbico hacia una atmósfera cada vez más rica en oxígeno. Esta relación produjo la pérdida de la mayoría de los genes esenciales de la bacteria excepto los requeridos para la respiración oxidativa y la síntesis de ATP, y cediendo al DNA de la célula hospedadora genes cuyos productos requieren la localización en la bacteria simbiote para su actividad, con lo cual las ancestrales bacterias simbiotes llegaron a ser endosimbiontes forzosos, conocidos actualmente como mitocondrias (Blackstone, 1995; Margulis, 1996; Doolittle, 1998). Se ha especulado que el origen del primitivo mecanismo de apoptosis pudo establecerse como consecuencia del microecosistema endosimbionte-célula hospedadora generado por la incorporación de la primitiva mitocondria en la célula proto-eucariótica hospedadora (Kroemer, 1997; Frade y Michaelidis, 1997; Green y Reed, 1998; Blackstone y Green, 1999; Lorenzo *et al.*, 1999). Desde este contexto, la analogía entre las mitocondrias y las actuales bacterias en relación a su capacidad de secretar proteínas redox para inducir la muerte celular de células de mamíferos es un ejemplo de conservación funcional durante los cientos de millones de años de evolución. Es posible que los antecesores de las actuales procariotas secretaran proteínas redox para matar a las primitivas células eucariotas. Durante la evolución, las mitocondrias parecen haber mantenido esta misma función para programar la muerte de su propia célula huésped (Punj y Chakrabarty, 2003; Kroemer G, 1997).

### **1.3. AIF (Apoptosis-Inducing Factor).**

#### **1.3.1. DESCUBRIMIENTO Y FUNCION.**

Una de las proteínas liberadas de la mitocondria durante el proceso de muerte celular es un nuevo factor: AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Esta proteína, responsable de la degradación inicial del ADN durante la muerte celular (en fragmentos de 50 Kb), se ha revelado como uno de los factores determinantes en el control de dicho proceso.

A partir de mitocondrias tratadas con atractilósido se descubrió una actividad que inducía apoptosis independiente de caspasas (Zamzami *et al.*, 1996). Se definía así una nueva ruta de muerte celular que posteriormente ha llegado a diferenciar la apoptosis en dos grupos: la muerte celular dependiente de caspasas y la muerte celular

independiente de caspasas. La proteína responsable de esta actividad independiente de caspasas se purificó y se llamó apoptosis inducing factor (AIF) (Susin *et al.*, 1999b). Posteriormente se ha estudiado la presencia de esta proteína en diferentes organismos, presentando una distribución ubicua entre los mamíferos (Daugas *et al.*, 2000). A través de la clonación del cDNA completo correspondiente a AIF de ratón (612 aminoácidos) y a AIF humano (613 aminoácidos) se demostró que AIF está muy conservada entre las dos especies (92% de identidad) (Susin *et al.*, 1999b). El gen *AIF* está localizado en la región q25-26 del cromosoma X humano y está constituido por 16 exones (Daugas *et al.*, 2000). El precursor de AIF es una proteína de 67kDa que está organizada en tres dominios: una región N-terminal que contiene una secuencia de localización mitocondrial (MLS), una secuencia central espaciadora de 27 aminoácidos, aproximadamente, y una parte C-terminal, que comprende los aminoácidos 128 al 612 para mAIF (484 aminoácidos) y presenta dos posibles secuencias de localización nuclear. Después de que el precursor se transporta al espacio intermembrana de la mitocondria, se procesa a AIF $\Delta$ 1-54, una forma madura de 62kDa (Otera *et al.*, 2005). Análisis topológicos han revelado recientemente que AIF madura es una proteína de la membrana interna tipo I con el extremo N-terminal expuesto a la matriz y la porción C-terminal al espacio intermembrana (Otera *et al.*, 2005). AIF purificada de mitocondrias ( $\Delta$ 1-101), así como AIF recombinante carente de la secuencia de localización mitocondrial y parte de la región espaciadora ( $\Delta$ 1-120), unen el grupo prostético FAD (flavin adenin dinucleótido), mientras que la proteína recombinante correspondiente al mAIF precursor no es capaz de unir FAD. Estos datos sugieren que el grupo prostético FAD se une a la proteína en la mitocondria, tras la eliminación de la secuencia de localización mitocondrial, como ha sido descrito para otras flavoproteínas mitocondriales (Saijo *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1996).

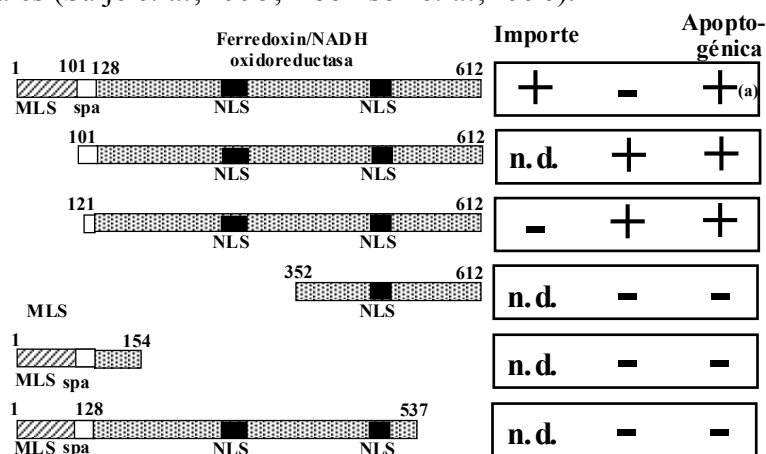


Figura 1.9. Formas de AIF y evaluación de su capacidad de importe mitocondrial y su carácter apoptogénico. (a) El precursor de AIF resulta apoptogénico cuando se realiza un plegamiento del mismo *in vitro* (Susin *et al.*, 1999b).

Se han identificado cuatro variantes de splicing del gen *AIF*: AIF-exB (Loeffler *et al.*, 2001), AIFsh (Delettre *et al.*, 2006a), AIFsh2 (Delettre *et al.*, 2006b) y AIFsh3 (Delettre *et al.*, 2006b) (Figura 1.10). AIFsh2, cuya expresión está ausente en células cerebrales, carece del dominio C-terminal de AIF y no tiene actividad apoptótica, pero sí actividad NAD(P)H oxidasa semejante a AIF (Delettre *et al.*, 2006b).

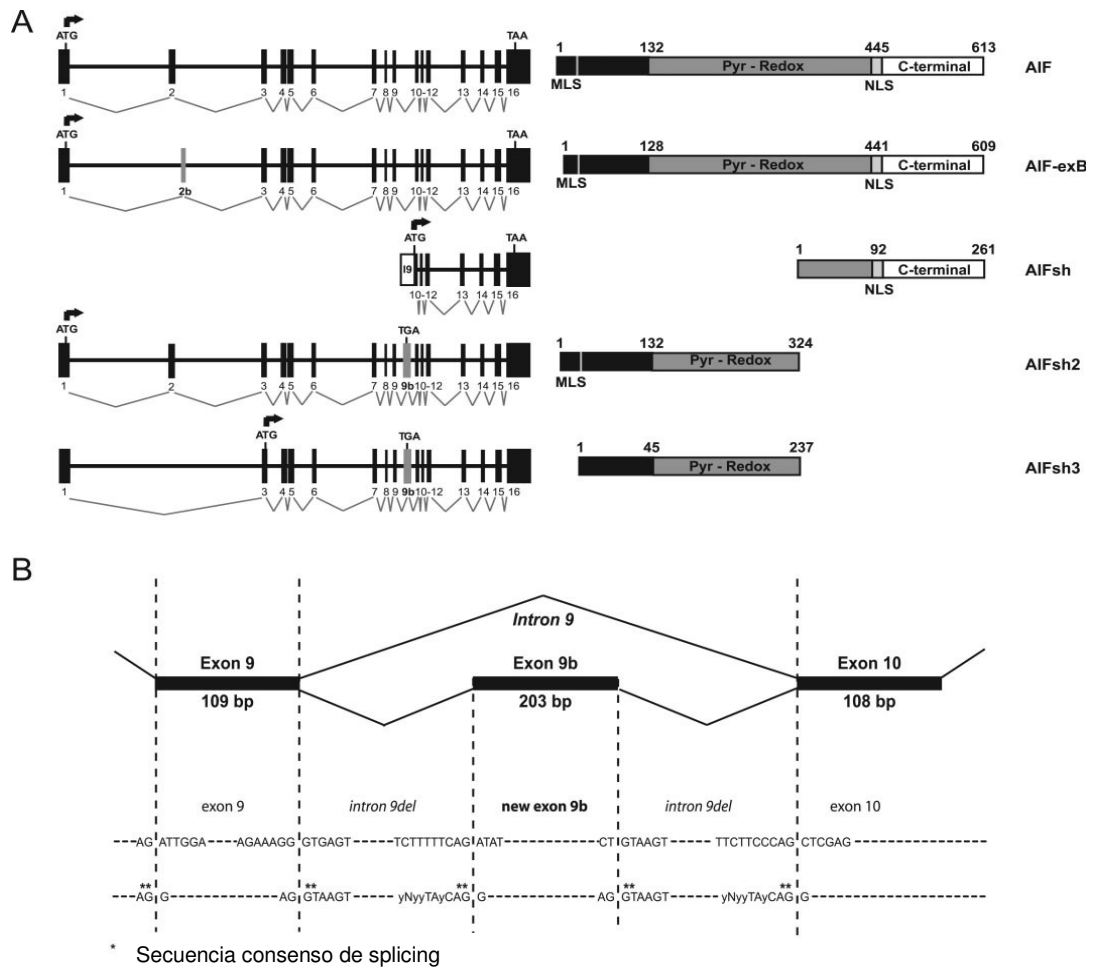


Figura 1.10. (A). Representación esquemática de los mRNAs con splicing alternativo de *AIF* y sus correspondientes proteínas: AIF-exB, AIFsh, AIFsh2 y AIFsh3. (Delettre *et al.*, 2006). (B). AIFsh2 y AIFsh3 presentan la inclusión de un exón adicional (9b), de 203 pb, generado a partir de una parte del intrón 9. Esta inclusión genera un codón de terminación responsable de la ausencia de dominio C-terminal en estas proteínas. (Delettre *et al.*, 2006).

Tras un estímulo apoptótico, la forma madura de AIF se procesa a una forma de 57kDa por un mecanismo independiente de caspasas en el espacio intermembrana (Otera *et al.*, 2005) y la forma procesada de AIF se elimina al citosol. Por tanto la salida de AIF de la mitocondria ocurre en dos etapas: la separación de AIF de la membrana interna por un proceso de inducción de apoptosis y la traslocación al citoplasma. Se ha

demostrado que la activación de poly(ADP-ribose) (PAR) polymerase-1 (PARP-1) induce la salida de AIF al citosol y su translocación al núcleo (Yu *et al.*, 2006). La inhibición de cistein proteasas inhibe la salida de AIF de la mitocondria (Yuste *et al.*, 2005) sugiriendo la existencia de una proteasa que actúa en este proceso y es regulada por estímulos proapoptóticos independientes de caspasas. Se ha demostrado la implicación de la calpaina I mitocondrial, una proteasa activada por calcio, en el mecanismo de eliminación al citosol de AIF durante la transición de permeabilidad mitocondrial (Polster *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007). Por tanto resulta lógico que un incremento en el calcio intracelular pueda activar este proceso, como han demostrado Norberg y cols. (Norberg *et al.*, 2008), que además han puesto de manifiesto este incremento de calcio como un requisito para la activación de la calpaina I y el subsecuente procesado de AIF a su forma truncada en el espacio intermembrana.

Una vez que AIF sale al citosol se trasloca al núcleo. AIF en el núcleo donde induce condensación periférica de la cromatina y fragmentación de alto peso molecular (50 kb). La actividad apoptogénica de AIF requiere la interacción directa con el ADN dúplex (Ye *et al.*, 2002). Se ha descrito la cooperación de AIF con la ciclofilina A en el proceso de cromatinolisis (Candé *et al.*, 2004). Sin embargo recientes estudios sugieren que AIF regula el estadio I de la morfología nuclear apoptótica pero no la fragmentación de alto peso molecular (Yuste *et al.*, 2005b). Estos estudios proponen que ICAD controla la fragmentación del DNA tanto de alto como de bajo peso molecular, y también los estadios I y II del fenotipo apoptótico y que la endonucleasa CAD es responsable de la fragmentación del DNA.

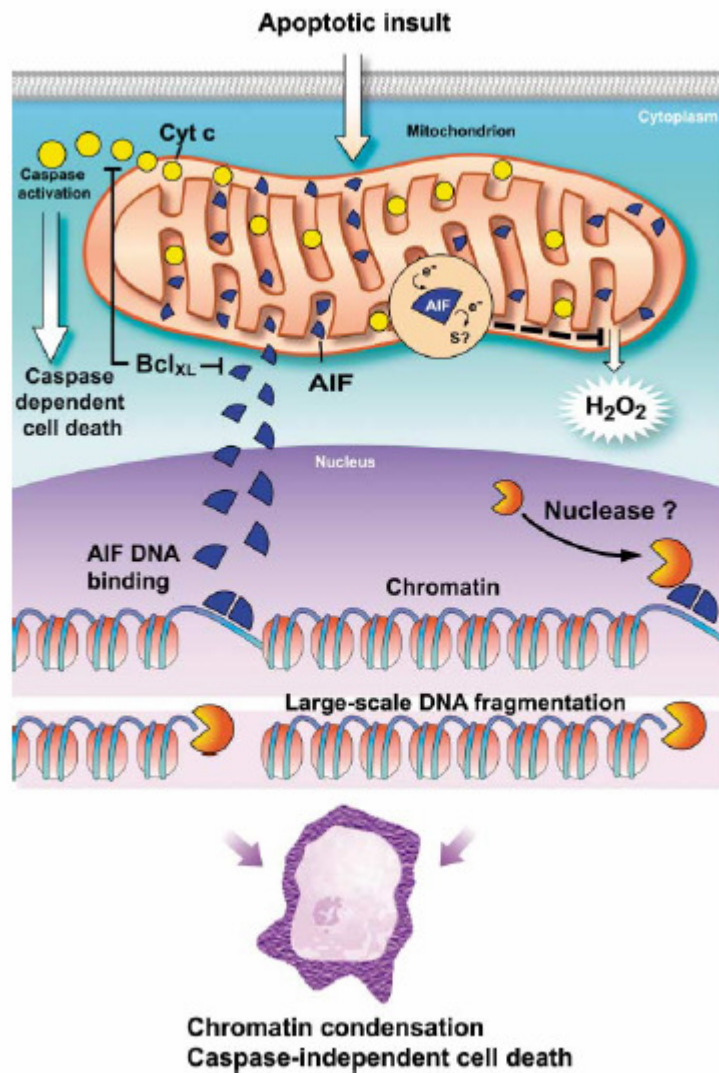


Figura 1.11. Esquema de la actividad apoptótica de AIF (Lipton y Bossy-Wetzel, 2002).

Por otra parte, se han encontrado homólogos de AIF en la ameba unicelular *Dictyostelium discoideum*, carente de caspasas (Arnoult *et al.*, 2001), en *Aspergillus nidulans* (AifA), un hongo filamentoso (Savoldi *et al.*, 2008), en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Ynr074cp) (Wissing *et al.*, 2004), en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (WAH-1) (Wang *et al.*, 2002) y en *Drosophila melanogaster* (DmAIF) (Joza *et al.*, 2008), de localización mitocondrial, que sufren un proceso de traslocación similar en respuesta a un estímulo apoptótico. Recientemente se ha descrito la clonación y caracterización de genes humanos homólogos a AIF: el llamado AIF-like (AIF-L) y AMID (apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated inducer of death), también llamado PRG3 (p53-responsive gene 3). AIF-L posee 598 aminoácidos y presenta un 35% de homología con AIF, principalmente en el dominio de unión a nucleótido, y comparte con AIF su expresión ubicua en todos los tejidos y su

función proapoptótica, sin embargo es dependiente de caspasas y a pesar de que su localización es predominantemente mitocondrial, carece de su señal de localización (Xie *et al.*, 2005). AMID comparte con AIF un 22% de identidad de secuencia aminoacídica y, al igual que ésta es un efector apoptótico independiente de caspasas (Ohiro *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002). Sin embargo carece de secuencia de localización mitocondrial y puede localizarse en el citoplasma o asociada a la membrana externa mitocondrial (Wu *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2005), aunque recientes estudios apoyan su asociación con la membrana plasmática (Bilyy *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 bloquea la redistribución de AIF en líneas celulares de mamíferos (Susin *et al.*, 1996, 1999b; Daugas *et al.*, 2000). Cuando se microinyecta AIF en el citoplasma de células intactas, induce diversas características de la apoptosis, como disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), exposición de fosfatidilserina y apoptosis nuclear (Ferri *et al.*, 2000; Susin *et al.*, 2000; Loeffler *et al.*, 2001). Los efectos nucleares y mitocondriales de AIF se pueden recapitular en sistemas acelulares (Susin *et al.*, 1999b, 2000). Se obtienen efectos similares cuando se transfectan células con AIF mutante por delección en el cual se ha eliminado la secuencia MLS, y por tanto, AIF se acumula en compartimentos extramitocondriales y, en particular, en el núcleo (Loeffler *et al.*, 2001). Ninguna de estas alteraciones se inhibe con inhibidores de caspasas o sobreexpresión de Bcl-2, y AIF puede inducir condensación de la cromatina en células carentes de Apaf-1 o caspasa-3 (Ferri *et al.*, 2000; Susin *et al.*, 2000; Loeffler *et al.*, 2001). Sin embargo, se descubrió un inhibidor endógeno de AIF: la proteína de choque térmico Hsp70. Hsp70 interacciona físicamente con AIF e inhibe sus efectos apoptóticos tanto *in vitro* como en células intactas (Ravagnan *et al.*, 2001). Además se demostró que Hsp70 se une al dominio de AIF formado por los aminoácidos 150 al 228 y que la delección de este dominio elimina esta unión, produciendo un incremento en el efecto apoptogénico de AIF (Gurbuxani *et al.* 2003). Hsp70 neutraliza AIF e inhibe la salida de catepsinas de los lisosomas (Lanneau *et al.*, 2008). Por otra parte la inactivación génica de AIF anula el proceso embrionario de cavitación en células madre (ES), el cual representa el primer proceso apoptótico en la morfogénesis (Joza *et al.*, 2001). El gen AIF tiene un elemento de respuesta a p53 y se ha demostrado que la expresión de AIF está sujeta a una regulación transcripcional positiva por niveles basales de p53 (Stambolsky *et al.*, 2006).

En el año 2002 se encontró que el ratón mutante Harlequín (Hq), que presenta una degeneración progresiva con la edad de las neuronas del cerebelo y la retina, posee una inserción proviral en el primer intrón del gen *Aif* que produce una disminución del



80% en su expresión (Klein *et al.*, 2002). Esto convirtió al ratón mutante Hq en un excelente modelo animal para el estudio de AIF. A partir de experimentos para examinar el estrés oxidativo en estos ratones mutantes Hq se observó que las células granulocíticas cerebelares de los ratones mutantes Hq eran más susceptibles a la apoptosis inducida por peróxido que los ratones normales. Además, la transducción retroviral de AIF salvaje rescató a estas células de la apoptosis. Estos hechos llevaron a los autores de estos experimentos a sugerir que AIF actúa eliminando radicales libres para prevenir la apoptosis, mediante un mecanismo diferente a su función apoptogénica (Klein *et al.*, 2002). Sin embargo, la función de AIF como posible molécula antioxidante ha sido ampliamente discutida posteriormente. Evidentemente un mecanismo alternativo que justificaría el efecto protector de AIF sería su participación en la cadena respiratoria mitocondrial (Lipton & Bossy-Wetzel, 2002), y su defecto incrementaría la producción de especies reactivas de oxígeno y por tanto las neuronas serían más sensibles a estímulos apoptóticos, incluyendo el estrés oxidativo (Suzuki *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001).

La presencia de AIF se observó en experimentos de identificación de las subunidades de los complejos respiratorios mediante electroforesis nativa bidimensional y espectrometría de masas (Devreese *et al.*, 2002). En estos experimentos se solubilizaron los complejos respiratorios a partir de mitocondrias aisladas y tras la separación por electroforesis nativa bidimensional, la identificación mediante espectrometría de masas reveló la presencia de AIF en el complejo IV, aunque no pudo afirmarse su asociación con este complejo debido a posibles efectos artefactuales.

En el año 2004 se demostró la relación funcional de AIF con la fosforilación oxidativa (Vahsen *et al.* 2004). En células madre embrionarias (ES) carentes de AIF por recombinación homóloga o mediante interferencia en el RNA (siRNA) en la línea celular humana HeLa existe un aumento en la producción de lactato y una mayor dependencia en la generación del ATP glicolítico, debido a una disminución severa de la actividad del complejo I, la cual se corresponde con un menor contenido en este complejo y sus componentes, principalmente las subunidades NDUF6, NDUF5, NDUF9 y Grim19. Esta reducción en los componentes del complejo I y su actividad en ausencia de AIF ha sido demostrada posteriormente en las líneas celulares tumorales de carcinoma de colon HCT116 y DLD-1 (Urbano *et al.*, 2005) y en células musculares y cardíacas de ratones con inactivación de AIF específica de tejido (Joza *et al.*, 2005). También se demostró en células ES AIF<sup>-/-</sup> (aunque no en células HeLa tratadas

mediante siRNA) una deficiencia en subunidades del complejo III, especialmente los genes UQCRC1, UQCRC2 y UQCRFS1, que codifica la proteína ferrosulfurada de Rieske. Todas estas deficiencias parecen ser debidas a un mecanismo post-transcripcional ya que los niveles de RNA no se alteraron (Vahsen *et al.* 2004). Este hecho descartaba la posibilidad de acción de AIF como un factor transcripcional en la regulación de estos genes. Además, estos autores han sugerido que las deficiencias observadas en el complejo III podrían deberse a su relación con el complejo I en la formación del supercomplejo I/III/IV, también llamado respirasoma (Schägger y Pfeiffer, 2000; Schägger, 2002). Por otra parte, en *Paracoccus denitrificans* se ha observado que el ensamblaje de los complejos respiratorios I, III y IV en este supercomplejo estabiliza el complejo I (Stroh *et al.*, 2004). En los experimentos de Vahsen y cols. no se encontró asociación directa de AIF como constituyente del complejo I. Por lo tanto estos autores propusieron la implicación de AIF en la biogénesis, ensamblaje y/o mantenimiento del complejo I respiratorio (Vahsen *et al.* 2004). También demostraron la implicación del homólogo de AIF en *S. cerevisiae* (Ynr074cp o Aif1p, Wissing *et al.*, 2004) en la fosforilación oxidativa, sugiriendo un efecto pleiotrópico de AIF en el ensamblaje y/o mantenimiento de los complejos respiratorios (Vahsen *et al.* 2004). La deficiencia en la fosforilación oxidativa se ha observado en experimentos *in vivo* en mitocondrias de ratones mutantes Harlequín (genotipo AIF<sup>HQY</sup>) y parece ser dependiente de tejido, ya que únicamente se observó en retina y cerebro. A diferencia de lo descrito para el ratón mutante Hq, en las células ES AIF<sup>-y</sup> no se encontró diferencia en el nivel de producción de radicales libres ni en el daño oxidativo respecto a las células control. La sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células granulocíticas cerebelares del ratón AIF<sup>HQY</sup> (Klein *et al.* 2002) y de las células ES carentes de AIF puede ser debida al defecto en complejo I, ya que se ha relacionado este complejo con la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (Atorino *et al.* 2003; Zoccarato *et al.* 2004; Vahsen *et al.* 2004). Urbano y cols publicaron en el año 2004 sus estudios sobre AIF en líneas celulares tumorales de carcinoma de colon. En este estudio demostraron que tanto la inactivación genética de AIF por recombinación homóloga como su eliminación a nivel de RNA mediante siRNA originaron una significativa reducción de los niveles de anión superóxido y otros radicales libres, al contrario de lo descrito para el ratón mutante Hq. También se demostró la importancia de la actividad NADH oxidasa de AIF para el funcionamiento del complejo I así como para el mantenimiento del estado transformado de las células tumorales de colon (Urbano *et al.*, 2005). El knockdown de AIF en diferentes tipos de células de carcinoma produjo un descenso en los niveles de superóxido, mayor sensibilidad a la apoptosis y pérdida de tumorigenicidad. Por otra parte la actividad redox de AIF parece estar implicada en la

regulación de los gránulos de estrés (SG) a través del mantenimiento de los niveles de glutatión en condiciones de estrés (Cande *et al.* 2004). Los defectos en la respiración oxidativa mitocondrial y el metabolismo energético de la mitocondria están implicados en una gran variedad de enfermedades humanas, como miopatías y cardiomiopatías, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento (Lane, 2006; Chomyn *et al.*, 2003; DiMauro y Schon, 2003; Wallace, 1999; Wallace, 1997). Se demostró que la inactivación de AIF específica de tejido en células del músculo esquelético de ratones origina un deterioro severo de la musculatura esquelética y atrofia muscular y en células cardíacas produce cardiomiopatía severa (Joza *et al.*, 2005). Además, en estas células cardíacas se observó un cambio en el metabolismo celular hacia la glicolisis (Joza *et al.*, 2005), como previamente se había observado en células madre embrionarias (ES) carentes de AIF por recombinación homóloga o mediante interferencia en el RNA (siRNA) en la línea celular humana HeLa (Vahsen *et al.* 2004). Este hecho ha sido más ampliamente estudiado posteriormente, incluyendo a ratones con la inactivación de AIF específica de hígado (Pospisilik *et al.*, 2007). En este modelo animal se ha demostrado la implicación de la ausencia de AIF en el metabolismo celular, con un efecto protector de la obesidad y la diabetes como consecuencia de un incremento en el metabolismo anaerobio de la glucosa y oxidación de los ácidos grasos para compensar la deficiencia energética originada por los defectos en la fosforilación oxidativa, que conllevan una disminución en los niveles de ATP y NAD<sup>+</sup> e incremento de AMP (Pospisilik *et al.*, 2007).

De este modo AIF parece ser una proteína con una doble función, necesaria tanto para la vida como para la muerte celular (Modjtahedi *et al.*, 2006) e implicada en procesos tumorales.

### 1.3.2. ESTRUCTURA PRIMARIA Y RELACIONES EVOLUTIVAS.

Se ha investigado el origen evolutivo de AIF mediante cálculos filogenéticos y bases de datos (Lorenzo *et al.* 1999) y análisis estructurales (Maté *et al.*, 2002). AIF presenta gran homología de secuencia con ferredoxina-NADH reductasas de eubacterias y arqueobacterias. Entre las eucariotas la mayor homología de secuencia observada es con diversas ascorbato oxidoreductasas de plantas, en particular, con dehidroascorbato reductasa de *Arabidopsis thaliana*, monodehidroascorbato reductasa de *Cucumis sativus* (pepino) y la radical libre ascorbato reductasa de *Lycopersicon esculentum* (tomate). Respecto a los animales, AIF presenta gran homología de secuencia con posibles

oxidoreductasas de vertebrados (*Xenopus laevis*) e invertebrados (*C. elegans*, *Drosophila melanogaster*), y además con *S. pombe*. La resolución de la estructura cristalina de AIF sugiere que las proteínas homólogas más cercanas en la evolución son las ferredoxina reductasas bacterianas (Maté *et al*, 2002).

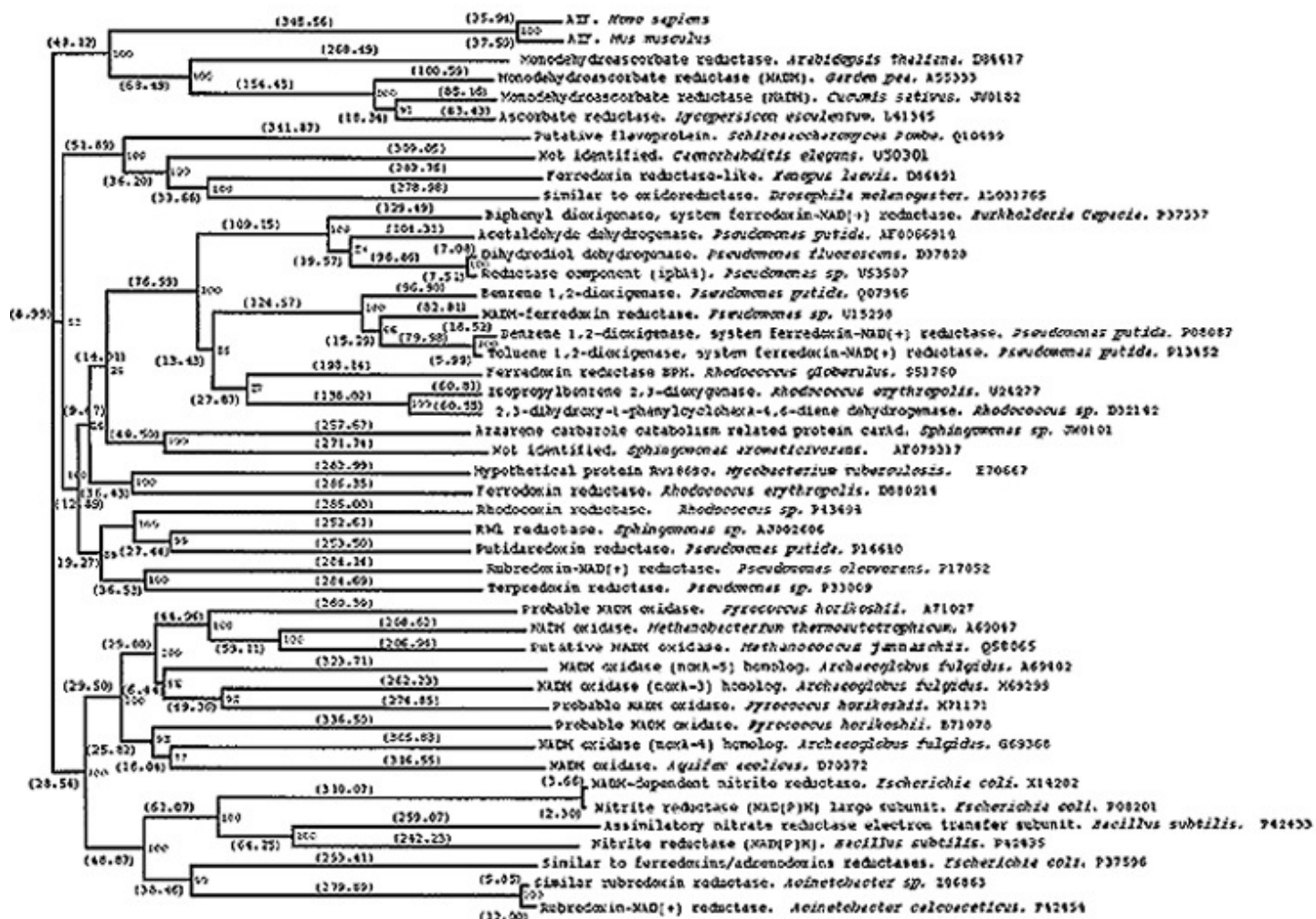


Figura 1.9. Relaciones filogenéticas de AIF y las diferentes NADH oxidasas bacterianas. Lorenzo *et al.*, 1999.

### 1.3.3. ESTRUCTURA TERCIARIA DE AIF.

#### 1.3.3.1. Resolución de la estructura cristalina de AIF y análogos estructurales.

La resolución de la estructura cristalina de AIF de ratón, correspondiente a mAIFΔ1-121 (Maté *et al.*, 2002) y AIF humano (Ye *et al.*, 2002) han puesto de manifiesto que ambas estructuras son homólogas a BphA4, el componente ferredoxina reductasa de la bifenil dioxigenasa de *Pseudomonas sp.* cepa KKS102, perteneciente al

grupo ONFRs (Oxygenase-coupled NADH-dependent Ferredoxin Reductases), que presenta un plegamiento similar a enzimas de la familia de la glutatión reductasa, GR (Senda *et al.*, 2000).

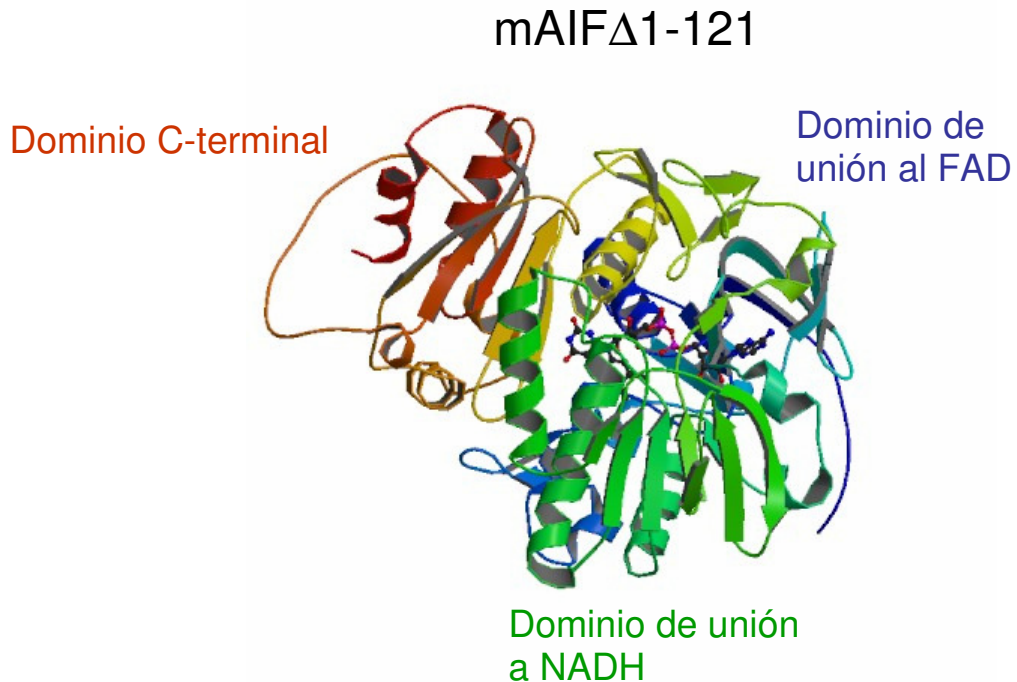


Figura 1.13. Estructura cristalina de mAIF $\Delta$ 1-121 (Maté *et al.*, 2002). Adaptada del Protein Data Bank.

En base a la homología con BphA4 la estructura de AIF se puede dividir en tres dominios: un dominio de unión a FAD (residuos 122-262 y 400-477 para mAIF y residuos 128-262 y 401-480 para hAIF), un dominio de unión a NADH (residuos 263-399 para mAIF y 263-400 para hAIF) y un dominio C-terminal (residuos 478-610 para mAIF y 481-608 para hAIF) (Figura 1.13). El alineamiento estructural (Figura 1.14) muestra que prácticamente todos los residuos superponibles se encuentran en los dominios de unión a FAD y a NADH, el cual presenta el motivo de plegamiento de Rossmann, típico de unión de piridín nucleótidos (Rossmann *et al.*, 1974; Karplus *et al.*, 1991) mientras que difiere en el dominio C-terminal respecto a BphA4. Este dominio C-terminal en AIF está formado por cinco láminas  $\beta$  antiparalelas (residuos 477-579) seguido de dos hélices alfa (residuos 580-610). La diferencia más significativa radica en una larga inserción (residuos 509-559) en este último dominio, ausente en BphA4 y GR de *E. coli*. La región N-terminal de esta inserción presenta una estructura secundaria en forma de dos hélices cortas seguida de un giro rico en prolinas en conformación abierta.

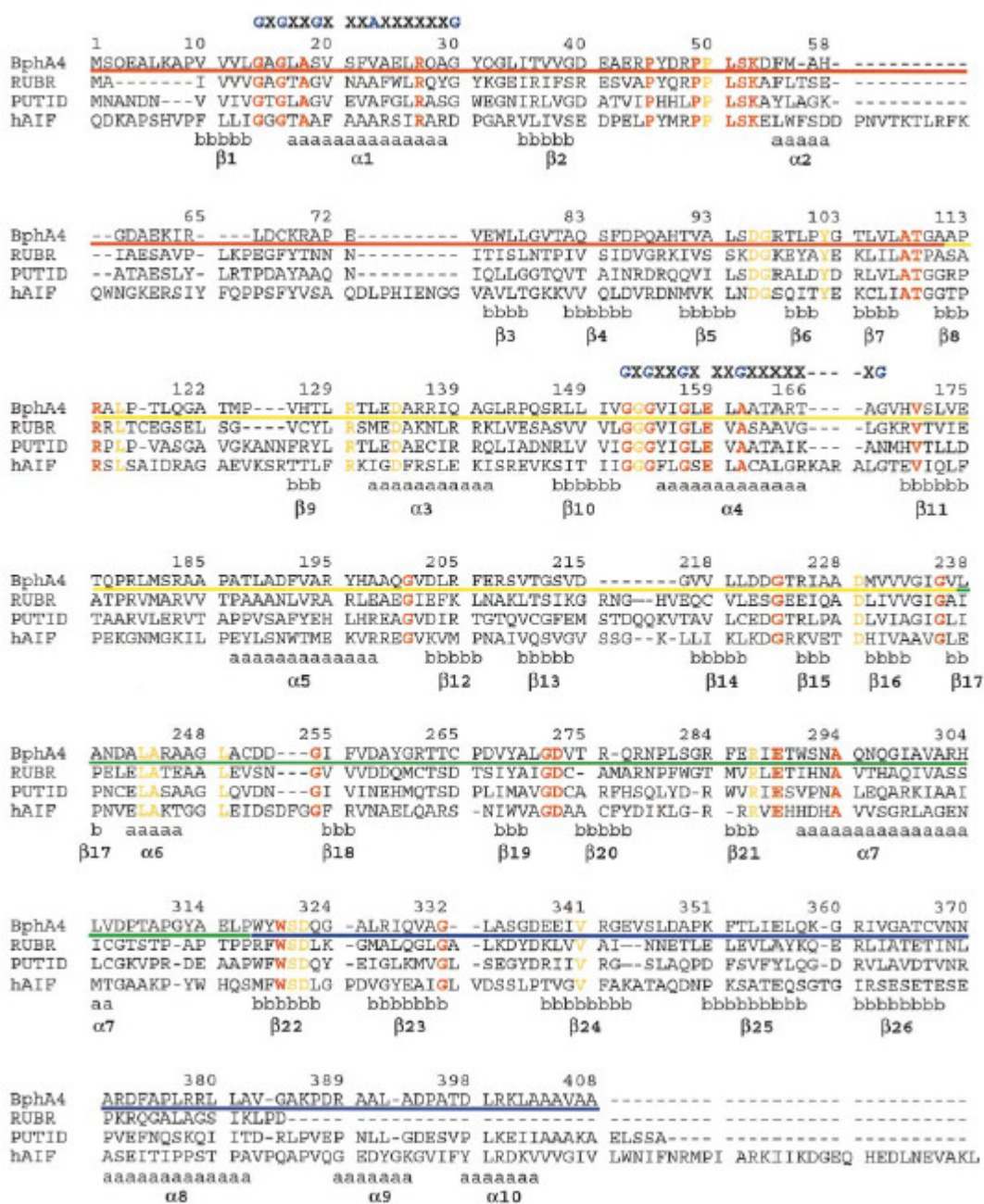


Figura 1.14. Alineamiento de secuencias de BphA4 con hAIF, rubredoxina reductasa (RUBR) y putidaredoxina reductasa (PUTID). Senda *et al.*, 2000.

Por otra parte, se ha descrito que mAIFΔ1-121 se comporta como un monómero en solución (Maté *et al.*, 2002) pero se ha cristalizado de forma dimérica (Figura 1.15), al igual que BphA4 (Senda *et al.*, 2000) presentando residuos conservados en la superficie de la molécula del sitio de unión a NADH y en la región que une el dímero cristalográfico (Maté *et al.*, 2002)



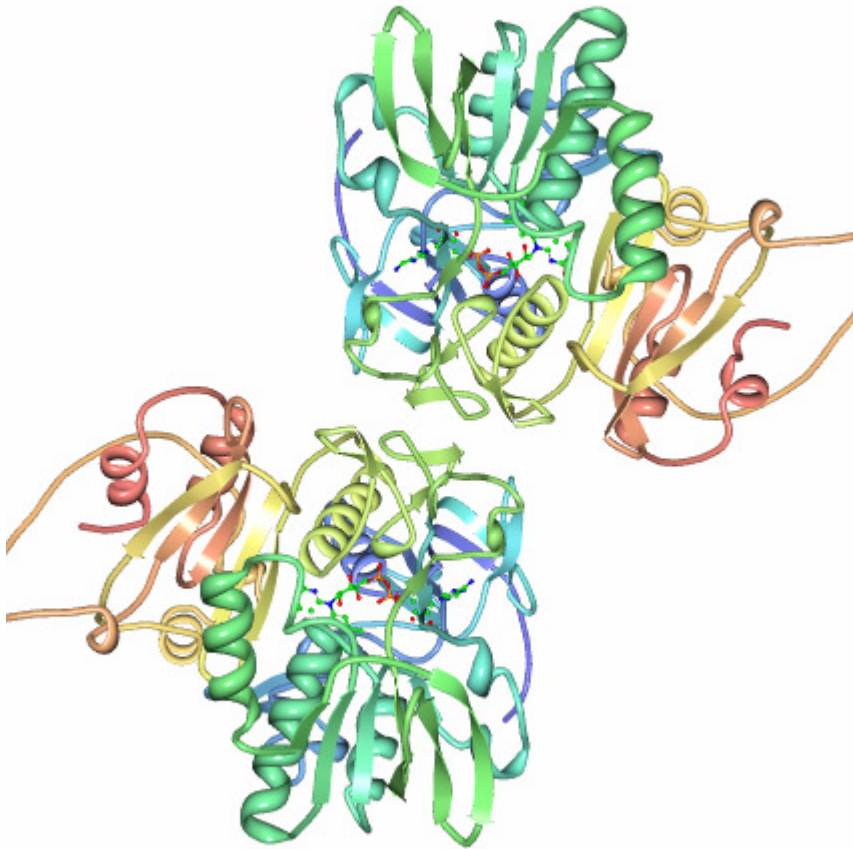


Figura 1.15. Dímero cristalográfico de mAIF $\Delta$ 1-121 (Maté *et al.*, 2002). Código PDB: 1gv4. Imagen obtenida del Protein Data Bank mediante el software ProteinWorkshop 1.50.

### 1.3.3.2. Relación de la estructura con el mecanismo apoptogénico de AIF.

La inserción C-terminal parece una característica propia de AIF, ya que está ausente en el resto de proteínas homólogas, incluyendo el homólogo a AIF descrito en *D. discoideum* (Arnoult *et al.*, 2001). Por tanto, esta inserción no parece tener una relación directa en el mecanismo apoptogénico de AIF. Se ha demostrado que la actividad apoptogénica de AIF requiere la interacción directa con el ADN dúplex (Ye *et al.*, 2002). Al contrario que BphA4, la mayor parte de la superficie de AIF posee un potencial electrostático positivo. Un modelo computacional de la interacción de hAIF con DNA dúplex (Figura 1.14), realizado en base a la afinidad por el ADN de diferentes mutantes de residuos cargados positivamente de la superficie, muestra que la estructura

del ADN forma un complejo de baja energía a lo largo del surco entre los dominios 1 y 3 de hAIF (Ye *et al.*, 2002). Sin embargo, el mecanismo de inducción de la condensación de la cromatina durante las primeras fases de la apoptosis nuclear y la fragmentación de 50 kb del ADN permanece sin resolver.

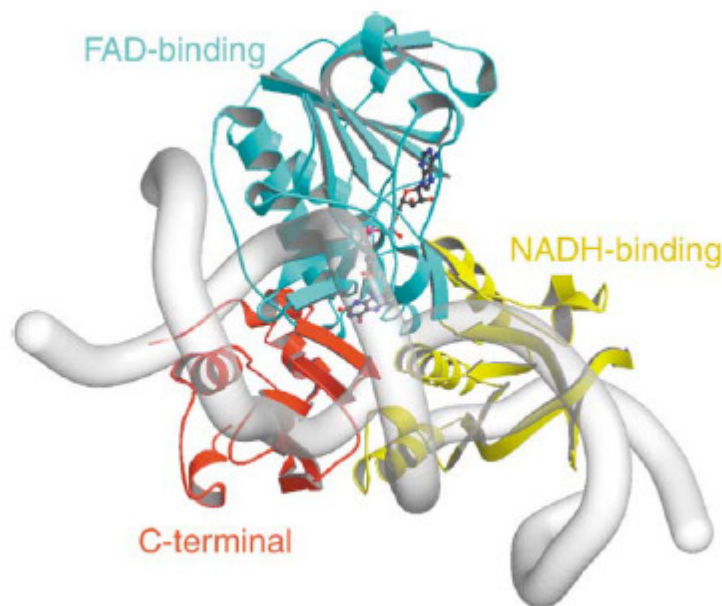


Figura 1.16. Estructura cristalográfica de AIF. Modelo de unión al DNA dúplex. En diferentes colores se muestran los tres dominios de la proteína: dominio de unión a FAD, dominio de unión a NADH y dominio C-terminal. (Lipton & Bossy-Wetzel, 2002).

### 1.3.4. UNIÓN DE AIF AL GRUPO PROSTÉTICO FAD.

#### 1.3.4.1. El Flavin Adenin Dinucleótido (FAD) como centro redox.

El flavín-adenín dinucleótido (FAD) y el flavín-adenín mononucleótido (FMN) son cofactores que presentan un gran número de proteínas, las llamadas flavoproteínas, para poder llevar a cabo su función biológica. Son grupos prostéticos firmemente unidos, de forma covalente o no covalente, que participan en una amplia variedad de procesos de oxidación-reducción (Ghisla & Massey, 1989). Estos grupos actúan como cofactores permitiendo reacciones que no tendrían lugar únicamente a través de las propiedades de las cadenas polipeptídicas. Ambos derivan de la vitamina riboflavina (Figura 1.17), la cual consta de un anillo heterocíclico, la isoaloxacina (7,8-



dimetilisoaloxacina), comúnmente llamada flavina, conectada a través del N(10) al alcohol ribitol.

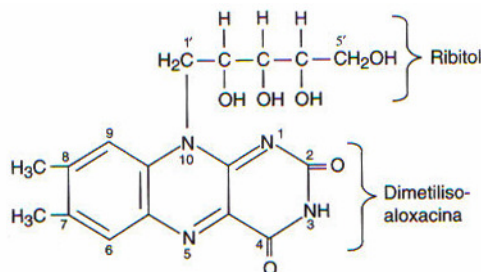


Figura 1.17. Estructura de la vitamina riboflavina. Se muestra el anillo de isoaloxacina (dimetilisoaloxacina) en estado oxidado con la numeración de los átomos.

El FMN tiene un fosfato esterificado en el hidroxilo 5' del ribitol. El FAD tiene una adenosina ligada a la riboflavina a través de un enlace pirofosfato (Figura 1.18). El anillo de isoaloxacina es la parte de estas moléculas que participa activamente en los procesos de redox. El resto de la molécula no se considera implicado en la catálisis, pero actúa como anclaje a la proteína (Ghisla y Massey, 1989).

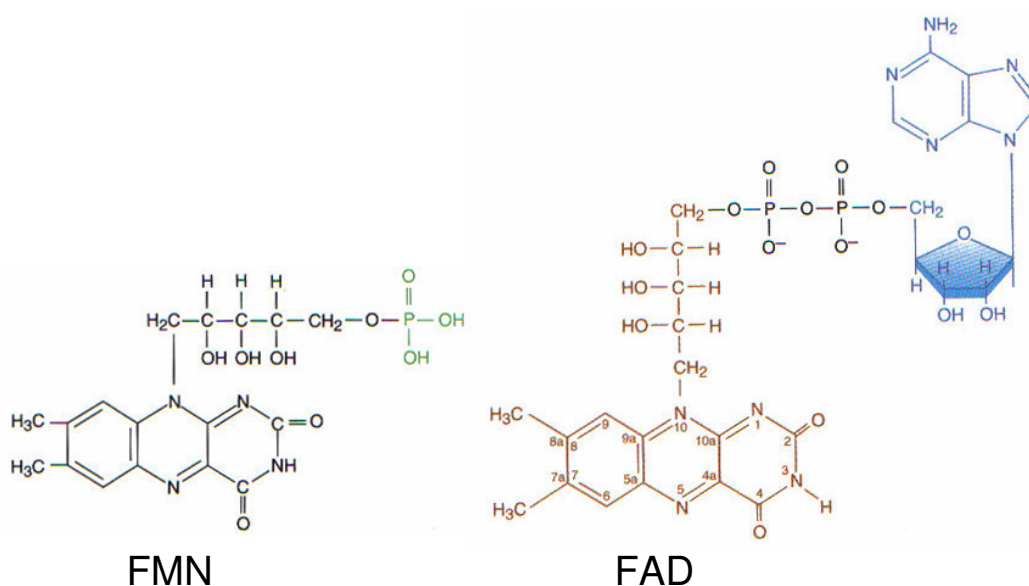


Figura 1.18. Estructura de los cofactores de flavina, FMN y FAD. Se muestra el anillo de isoaloxacina en estado oxidado con la numeración de los átomos.

La flavina puede interpretarse como una parte 1,2-diamino-4,5-dimetilbenceno rica en electrones, fusionada con 5,6-diamino-uracilo deficiente en electrones. Esta última parte de la flavina localiza y estabiliza los electrones tomados por la flavina

oxidada. El anillo de isoaloxacina presenta tres estados de oxidación, hidroquinona, semiquinona y oxidado, pasando de la forma oxidada a la completamente reducida (hidroquinona) al aceptar dos electrones (Figura 1.19). Estos tres estados redox confieren a la enzima características electrónicas particulares y determinan por tanto sus características espectroscópicas y su color, amarillo en su forma oxidada e incolora en su forma reducida. El espectro de las flavoproteínas presenta unos máximos de absorbancia alrededor de 380 y 450 nm, con ciertas variaciones según las características del entorno del cofactor.

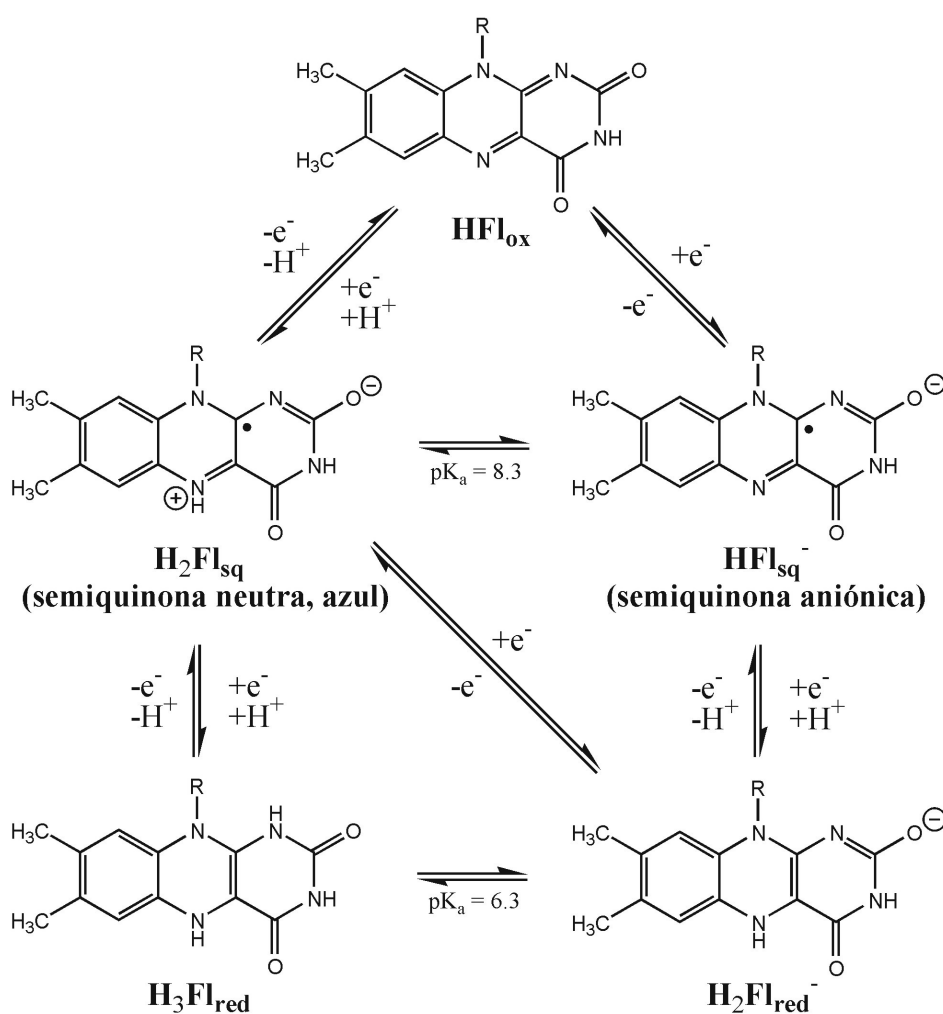


Figura 1.19. Estados de oxidación del anillo de isoaloxacina, con sus formas predominantes entre los pHs 3 y 9. Los valores de pK indicados se refieren a la flavina libre y pueden variar para cada proteína; generalmente estos cambios se observan en la estabilización preferente de la semiquinona neutra o de la semiquinona aniónica.

La reducción de la flavina ocurre reversiblemente en dos pasos de transferencia de un solo electrón, pasando por un estado semiquinona, o en un solo paso de transferencia de dos electrones, lo cual hace posible que actúe en procesos en los que

concurrer elementos que transfieren/aceptan un electrón o dos electrones. El proceso redox implica cambios que afectan particularmente las posiciones N(1), C(1a), C(4a) y N(5). El potencial medio de la conversión entre la forma oxidada y reducida ( $E_{ox/red}$ ) en el FAD libre es, aproximadamente, -240 mV a pH 7, pero varía dentro de un amplio rango al interactuar con la proteína (Ghisla y Massey, 1989). La cadena polipeptídica puede modular el potencial redox estabilizando o desestabilizando la carga negativa del anillo de pirimidina. Por tanto, cualquier interacción que tienda a disminuir la densidad de carga negativa del anillo de pirimidina incrementará su potencial de reducción, mientras que la presencia de una carga negativa o un ambiente hidrofóbico lo hará más reductor (Ghisla y Massey, 1989). En este caso, la modulación de los potenciales de reducción del FAD depende de diversos factores, tales como cambios conformacionales en el anillo de isoaloxacina ligados a su estado redox, distribución de los puentes de hidrógeno entre grupos de la cadena polipeptídica y los átomos N1 o N5 de la flavina, interacciones de Van der Waals, establecimiento de puentes salinos o grado de exposición al solvente.

#### 1.3.4.2. Interacción de residuos de AIF con FAD

La molécula de FAD se une de forma no covalente a AIF, de forma extendida, análoga a la observada en BphA4 y a GR (Mittl y Schulz, 1994; Senda *et al.*, 2000; Maté *et al.*, 2002). Sin embargo, la conformación del FAD es ligeramente diferente a GR. Esta diferencia radica principalmente en el ángulo de torsión definido por C2'-C1'-N10-C10, con 10° de desviación aproximadamente, y que provoca una diferente disposición de los anillos de isoaloxacina (Senda *et al.*, 2000; Maté *et al.*, 2002). El nucleósido adenina y el grupo pirofosfato del FAD están en contacto con la región más conservada del dominio de unión al FAD (residuos 138-140, 164, 232, 258-260 y 403 en mAIF). El anillo de isoaloxacina está parcialmente accesible al solvente, como corresponde con su función de centro redox. La parte xileno del anillo de isoaloxacina se encuentra localizado en un bolsillo hidrofóbico, protegido del solvente, formado por los residuos Pro172 (Pro173 en hAIF), Pro173 (Pro174 en hAIF), Leu174 (Leu175 en hAIF), Phe283 (Phe283 en hAIF), Leu310 (Leu311 en hAIF) y la parte alifática de las cadenas de Arg171 (Arg172 en hAIF) y Arg284 (Arg285 en hAIF). El residuo Pro172 (Pro173 en hAIF), análogo al residuo Pro49 de BphA4, interactúa con el anillo de isoaloxacina en el lado si y esta conformación restringida parece ser importante para el posicionamiento del anillo. Por otra parte, el entorno de la parte pteridina presenta un

carácter polar positivo que, según se ha descrito en el apartado 1.4.4.1, incrementa el potencial de reducción de la flavina (Maté *et al.*, 2002).

Análogamente a lo observado en otras flavoproteínas los átomos N1 y O2 del anillo de isoaloxacina están a distancias correspondientes a puentes de hidrógeno respecto a un átomo de la cadena amida principal, en este caso de la His454 (His455 en hAIF) en la zona N-terminal de una hélice  $\alpha$ . Este residuo se corresponde con el triptófano 291 en BphA4. En BphA4 el átomo O2 del anillo forma un puente de hidrógeno bifurcado con el nitrógeno de la cadena principal amida del Trp291 (3.0 Å) y una molécula de agua (2.8 Å). Se considera que esta carga parcial positiva contribuye a la estabilización de la carga negativa en la flavina reducida (Pai y Schulz, 1983). Por otra parte el átomo N5 del anillo de isoaloxacina estabiliza un puente de hidrógeno (3.0 Å) con el N $\zeta$  de la Lys176 (Lys177 en hAIF), que a su vez forma un puente salino con el Glu313 (Glu314 en hAIF) (2.8 Å). Estas interacciones están conservadas tanto BphA4 y en diversas enzimas de la familia GR como la glutathion reductasa, tripanotona reductasa y dihidrolipoamida dehidrogenasa (Karplus y Schulz, 1989; Lantwin *et al.*, 1994; Mattevi *et al.*, 1992).

### 1.3.5. ESTUDIO DEL SITIO DE UNION DE AIF AL NADH.

#### 1.3.5.1. Los coenzimas NADH y NADPH.

El coenzima NADH junto con su forma oxidada  $\text{NAD}^+$  y sus formas fosforiladas NADPH y  $\text{NADP}^+$  constituyen un grupo de coenzimas de gran importancia en las reacciones metabólicas. Se sintetizan a partir de niacina (vitamina B<sub>3</sub>) y constan de una adenina, una ribosa que, en el caso del  $\text{NADP}^+/\text{H}$  está fosforilada en la posición 2', dos grupos fosfato inorgánicos, otra ribosa y el anillo de nicotinamina (Figura 1.20).

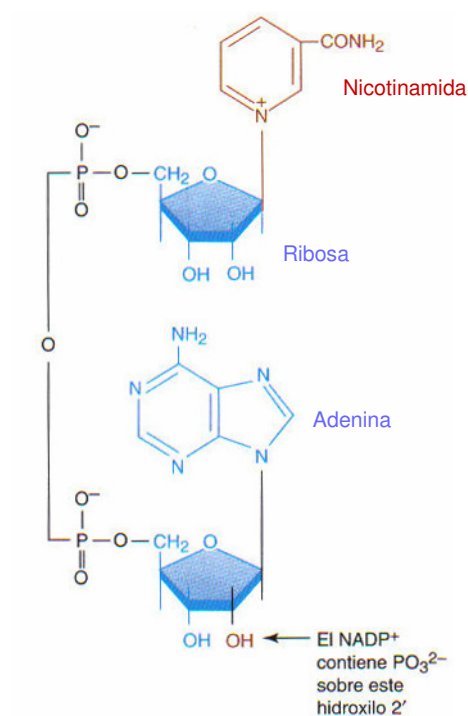


Figura 1.20. Estructura del coenzima Nicotinamida Adenin Dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ).

De forma similar a lo que ocurre en el caso del FAD, la mayor parte del cofactor se utiliza únicamente para el anclaje a la proteína, mientras que la funcionalidad redox depende de una pequeña región de la molécula. En este caso, la reactividad del coenzima se debe al anillo de nicotinamida, que puede encontrarse en dos estados de oxidación (Figura 1.21). La diferencia entre ambos estados corresponde con la transferencia de dos electrones y un protón, formalmente, un ion hidruro ( $\text{H}^-$ ). El potencial para este proceso es  $E_{\text{ox/red}} \approx -320 \text{ mV}$  (Rodkey, 1955; Rodkey y Donovan, 1959).

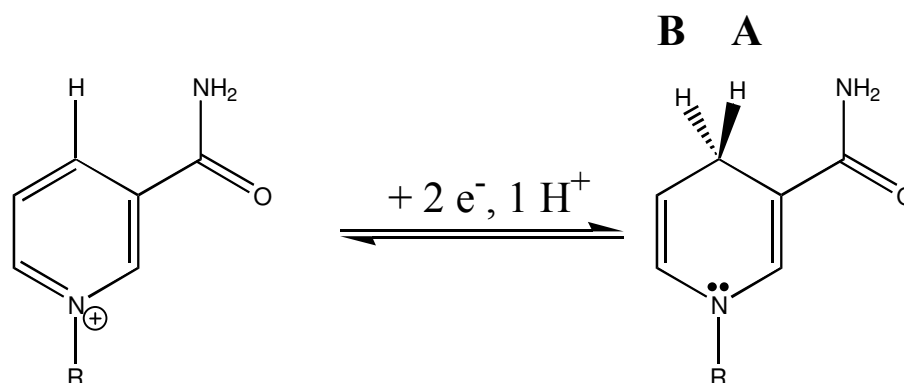


Figura 1.21. Formas oxidada ( $\text{NAD(P)}^+$ , izquierda) y reducida ( $\text{NAD(P)H}$ , derecha) de los nucleótidos de piridina. A y B indican los dos hidrógenos sobre el carbono 4 de la forma reducida, en reacciones enzimáticas las dos posiciones no son equivalentes y el hidruro entra o sale por una de las dos posiciones.

NADH y NADPH presentan unas propiedades espectroscópicas similares. Las formas reducidas tienen dos máximos, a 338 nm y 259 nm, con coeficientes de extinción  $\epsilon_{338} = 6.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{259} = 15.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Al oxidarse el coenzima, el máximo en la región visible del espectro desaparece, y así para  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  sólo se observa un máximo a 259 nm con un coeficiente de extinción  $\epsilon_{259} = 16.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 1.3.5.2. Interacción de residuos de AIF con NADH.

Apoptosis Inducing Factor (AIF) presenta en su secuencia un dominio de unión a piridín nucleótido. En el presente trabajo se han caracterizado reacciones enzimáticas de la proteína en las cuales intervienen estos coenzimas. Hasta el momento no se ha descrito la estructura cristalina del complejo AIF:NADH. Los datos de los cuales se dispone se pueden obtener por comparación con la estructura del complejo BphA4-NADH y complejos análogos descritos en enzimas de la familia glutatión reductasa (GR). De este modo se observa que el sitio de unión de la nicotinamida está más conservado que el entorno de la adenina. La Tyr177 de la GR debe moverse para permitir a la nicotinamida formar un apilamiento de orbitales  $\pi$  con la isoaloxacina, ubicándose el átomo C4 de la nicotinamida adyacente al átomo N5 de la flavina, de modo que la cara A de la nicotinamida queda enfrentada con la cara *re* de la flavina (Pai *et al.*, 1988; Karplus & Schulz, 1989). Se ha sugerido que esta función de la Tyr177 de la GR puede estar desempeñada por la Phe309 en mAIF (Phe310 en hAIF) (Maté *et al.*, 2002). Esta misma disposición se ha descrito para la NADH peroxidasa, análogo estructural de la GR (Stehle *et al.*, 1993) y para BphA4 (Senda *et al.*, 2000). En cambio, en la estructura de la quinona reductasa, aunque la nicotinamida se encuentra coplanar con la flavina, no se superpone al anillo central de la isoaloxacina (Li *et al.*, 1995) y en la estructura de complejos potencialmente productivos de FNR de guisante [FNR:NADP<sup>+</sup>] el anillo de nicotinamida no es paralelo al anillo de isoaloxacina, sino que ambos forman un ángulo de 30° y el átomo C4 de la nicotinamida está localizado a 3 Å del átomo N5 de la flavina (Deng *et al.*, 1999).

En BphA4 la cavidad que acomoda el anillo de nicotinamida del NADH presenta unas dimensiones de 6 Å x 8 Å x 10 Å, inferiores a las que presenta AIF. Esta diferencia radica en la ausencia en AIF de un residuo equivalente a Arg183 en BphA4, el cual forma puentes de hidrógeno con el grupo pirofosfato y la ribosa del NADH, formando una de las paredes de la cavidad. Por tanto AIF posee comparativamente una cavidad más grande con un número menor de contactos específicos y por ello se ha

sugerido una unión más débil al NADH y la posibilidad de unión en esta cavidad a un sustrato desconocido reducible por FADH<sub>2</sub>.

En conclusión, la oxidación del NADH, primer paso de la reacción redox, parece ocurrir de un modo similar en AIF, BphA4 y las proteínas de la familia de la glutathion reductasa. Además, se ha demostrado en AIF $\Delta$ 1-77 de ratón que la H454, correspondiente al residuo W291 de BphA4, es un residuo importante que modula el potencial redox de AIF y su unión al NADH (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Su sustitución por leucina (H454L) afecta en gran medida las propiedades redox de mAIF $\Delta$ 1-77. Sin embargo, la reoxidación del FADH<sub>2</sub>, segundo paso de la reacción, es significativamente diferente. Las proteínas de la familia de la GR tienen un puente disulfuro que se encuentra altamente conservado y funciona como aceptor de electrones del anillo de isoaloxacina. AIF y diversas NADH reductasas similares a BphA4 presentan en el lado *si* del anillo de isoaloxacina un mismo motivo de tres residuos consecutivos: Trp-Ser-Asp. En BphA4 este Trp (Trp482 en mAIF y Trp483 en hAIF) se encuentra muy expuesto al solvente y se ha demostrado la implicación de este residuo en la transferencia electrónica desde el FAD reducido al cluster [2Fe-2S] de la ferredoxina (Senda *et al.*, 2007). Sin embargo en AIF este residuo parece carecer de contacto con el solvente debido al plegamiento de la región helicoidal de la inserción en el dominio C-terminal de la proteína, que separa al Trp482 (Trp483 en hAIF) del solvente (Maté *et al.*, 2002).

### 1.3.6. IMPLICACION DE LOS RESIDUOS DEL SITIO ACTIVO EN LA TRANSFERENCIA ELECTRONICA.

La gran homología estructural entre AIF y BphA4 (Maté *et al.*, 2002), anteriormente detallada, confieren importancia a ésta última como modelo de transferencia electrónica de AIF. De hecho, los residuos de AIF Lys176 (Lys177 en hAIF), Glu313 (Glu314 en hAIF), Pro172 (Pro173 en hAIF) y Trp482 (Trp483 en hAIF) están muy conservados entre las ferredoxina reductasas bacterianas NADH dependientes acopladas a oxigenasa (ONFRs) (Senda *et al.*, 2000). Por ello, estos residuos, situados en el entorno del bolsillo que acomoda los anillos de isoaloxacina y nicotinamida, probablemente están implicados en un mecanismo de transferencia electrónica similar entre las ONFRs bacterianas y AIF.

La reacción redox de BphA4 se puede subdividir en dos semi-reacciones: reductora y oxidativa. La semi-reacción reductora consiste en la transferencia desde el NADH al FAD. Debido a la conservación de la relativa disposición de los anillos de isoaloxacina y nicotinamida entre las ONFRs bacterianas y las enzimas de la familia de la glutatión reductas, sería razonable que los residuos de este entorno estén implicados en la transferencia del hidruro. Entre estos residuos, la Lys53 (Lys176 en mAIF) y Glu159 (Glu313 en mAIF) parecen conferir un entorno electrostático óptimo para la transferencia del hidruro desde el NADH al FAD. Además, en el mecanismo catalítico de la glutatión reductasa propuesto, estos residuos parecen estar implicados en la transferencia del hidruro (Karplus y Schulz, 1989). Por otra parte se ha sugerido que el residuo H453 de mAIF $\Delta$ 1-77, situado en el entorno del FAD, podría estar interaccionando y orientando el anillo de nicotinamida para la formación de complejos de transferencia de carga (Churbanova y Sevrioukova, 2008). La semi-reacción oxidativa de BphA4 consiste en una transferencia en un solo paso de dos electrones desde el FAD reducido del cluster [2Fe-2S] a la ferredoxina. En el lado *si* del anillo de isoaloxacina el Trp320 (Trp482 en mAIF) está muy conservado entre las ONFRs bacterianas. En BphA4 se ha demostrado la implicación de este residuo en la transferencia electrónica desde el FAD reducido al cluster [2Fe-2S] de la ferredoxina (Senda *et al.*, 2007). En este caso la cadena lateral de este residuo está expuesta al solvente, sin embargo, en AIF este residuo parece aislado del solvente por el plegamiento de la región helicoidal de la inserción en el dominio C-terminal de la proteína, la cual está ausente en BphA4 (Maté *et al.*, 2002). En la glutatión reductasa, al igual que en otras enzimas de la familia como dihidrolipoamida reductasa, mercurio reductasa, alquilhidroperóxido reductasa y tioredoxina reductasa, la semi-reacción oxidativa difiere significativamente de las ONFRs, ya que poseen dos cisteínas esenciales para la formación de un puente disulfuro implicado en la transferencia electrónica al sustrato (Pai y Schulz, 1983). Recientemente se ha clonado y caracterizado un gen humano homólogo a AIF: AIFL (Xie *et al.*, 2005). Esta proteína tiene 598 aminoácidos, con un dominio 2Fe-2S Rieske característico y un dominio de unión a piridín-nucleótido. Presenta un 35% de homología con AIF, principalmente en su dominio de unión a nucleótido. Todos los residuos anteriormente descritos están conservados, a excepción de Trp482 (Trp483 en hAIF).



## *2. OBJETIVOS*



## 2. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL.

Desde que AIF (Apoptosis Inducing Factor) se descubriera en 1999 por el Dr. Susin (Susin *et al.*, 1999), como una proteína capaz de inducir apoptosis por un mecanismo independiente de caspasas se han publicado en la literatura numerosos artículos sobre la misma y existe un gran interés de la comunidad científica tanto en su actividad apoptogénica, dado que se trata de una posible diana terapéutica, como en su función metabólica. AIF se ha demostrado que es esencial para la vida celular y la fosforilación oxidativa, aunque su función exacta permanece desconocida. Por tanto, el estudio de las características de AIF y sus propiedades, así como su mecanismo de transferencia electrónica es importante para elucidar sus funciones celulares. Por ello se ha realizado el presente trabajo, como tesis doctoral, cuyos objetivos han sido:

1. Estudiar las propiedades redox de la flavoproteína Apoptosis Inducing Factor (AIF). Realizar un estudio bioquímico de la proteína y determinar sus actividades.
2. Determinar la relación de sus propiedades redox con su actividad apoptogénica.
3. Analizar los mecanismos moleculares implicados en la transferencia electrónica de la proteína mediante la caracterización de mutantes.



# *3. MATERIALES Y METODOS*



### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los organismos y microorganismos empleados en este trabajo se pueden clasificar en los siguientes grupos:

#### Técnicas de biología celular

Células de la línea fibroblástica HeLa, para la obtención de núcleos, utilizados en los experimentos con sistemas acelulares.

Fibroblastos Rat-1, para los experimentos de microinyección.

Ratones Balb/c, sacrificados por dislocación craneo-vertebral, para la obtención de mitocondrias de hepatocitos.

#### Técnicas de biología molecular

Células supercompetentes XL2 (*Stratagene*).

Células XL2 (*Stratagene*) con el plásmido pBSK (*Invitrogen*).

Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(D3) (*Stratagene*).

Cepas de *E. coli* BL21(D3) con el plásmido pET 28a (*Novagen*) que contiene el gen de resistencia a kanamicina (ver mapa genético en el apartado 2.4.5).

### 3.2. CULTIVOS.

#### 3.2.1. CULTIVO DE *Escherichia coli*.

##### 3.2.1.1. Cultivo en medio sólido.

Se utiliza agar preparado para medio de cultivo (Plate Count Agar de *Difco*<sup>TM</sup>), con una proporción 23.5 gr/l agua. Se esteriliza en un autoclave (Autotester 437-G de *Selecta*), se enfría en baño termostatzado media hora a 60°C y, si el medio va a ser selectivo, se añade el antibiótico adecuado, a partir de una disolución concentrada de los mismos, esterilizada por filtración con corte de 0.2 µm, hasta una concentración de:

Ampicilina (*Boehringer Mannheim*): 50 mg L<sup>-1</sup>

Kanamicina (*Boehringer Mannheim*): 30 mg L<sup>-1</sup>

Se vierte con cuidado el medio en placas de *Petri* en una campana de flujo laminar, con 20 ml aproximadamente de medio por placa, y se deja solidificar bajo luz ultravioleta germicida. Las placas se inoculan con la ayuda de un asa de platino estéril a partir de colonias de otras placas o con un triángulo de vidrio estéril a partir de cultivos líquidos y se dejan crecer en una estufa a 37°C durante toda la noche.

### 3.2.1.2. Cultivo en medio líquido.

El medio líquido de cultivo de *E. coli* utilizado es el de *Luria-Bertani* (LB) cuya composición es: 10 gr/l triptona, 5 gr/l cloruro sódico y 5 gr/l extracto de levadura.

El pH de los medios se ajusta a 7,0 y se autoclavan a 120°C (1 atm de sobrepresión) durante 20 minutos. Después del enfriamiento, se añaden los antibióticos adecuados filtrados a través de membranas estériles de 0.2 µm de diámetro.

#### *Cultivo para prueba de expresión*

Se transforman células BL21(D3) con plásmido pET28a con inserto. Se siembra en placas Petri de LB con kanamicina y se incuba a 37°C. Las colonias se siembran en tubos Falcon con 10 ml de LB con kanamicina. Se incuban a 37°C y 1ml de estos se inocula a otros tubos Falcon, controlando la densidad óptica hasta 0.8-1. Se añade IPTG a una concentración final 1mM. Recogemos muestras de 50 o 100 µl, se centrifuga a 14000 rpm, y el residuo se resuspende en 10 µl de tampón de electroforesis. Tras una electroforesis en gel de poliacrilamida para visualizar la proteína recombinante, se seleccionaron las colonias con mayor expresión. Como control negativo utilizamos células BL21(D3) sin plásmido. Como control de la inducción utilizamos células sin IPTG (Isopropil-β-tio-D-galactopiranosido, de *Promega*)

#### *Cultivo a media escala*

A partir de un cultivo en placa Petri se siembra un inóculo de células BL21(D3) con plásmido en un tubo Falcon con 10 ml de LB con kanamicina y se incuba en agitación (160 rpm) en un incubador orbital (Certomat™ de *B. Braun Biotech*) a 37°C. Al día siguiente se inocula 1 ml de este cultivo en botellas con 200 ml de LB y kanamicina y se incuba en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 37°C. Al día siguiente se inoculan 50 mililitros de cultivo en matraces con 1l de LB con kanamicina. Se incuba en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 37°C hasta una densidad



óptica entre 0.8 y 1. Se añade IPTG (Isopropil- $\beta$ -tio-D-galactopiranosido, de *Promega*) a una concentración final 1 mM y se incuba toda la noche en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 18°C.

Se recogen las células por centrifugación en un rotor JA-14 (*Beckmann*) a 8000 rpm y 4°C durante 15 minutos. El precipitado se lava con una disolución de Tris-HCl 50 mM, pH8 EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) 20 mM y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Si el precipitado no se va a procesar inmediatamente, se pesa y congela a -80°C.

#### 3.2.1.3. Conservación de cepas.

Los cultivos en placas pueden ser conservados a 4°C durante un mes. Las cepas de BL21(D3) sin plásmido se pueden guardar durante largo tiempo. Para ello se preparan cultivos en medio líquido y se les añade glicerol estéril hasta el 10% (a un vial de microcentrífuga estéril se añade 900  $\mu$ l de cultivo y 100  $\mu$ l de glicerol estéril). Se agita bien en vortex y se congela a -80°C. La cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de la proteína, BL21(DE3) Gold (*Stratagene*), no es adecuada para la conservación del plásmido. Por tanto, la conservación de los plásmidos mutados deben realizarse en otras cepas como JM109 o DH5 $\alpha$  y/o como plásmido aislado y congelado.

#### 3.2.2. CULTIVO DE CELULAS HeLa Y DE FIBROBLASTOS Rat-1.

Las células se han cultivado en esterilidad en el siguiente medio: DMEM con Glutamax (*Gibco*), piruvato sodico (100 mM, *Sigma*), Hepes 1M (1 mM, *Sigma*), penicilina (100 U/ml, *Gibco*), Streptomycin (100 mg/ml, *Gibco*) y 10 % de suero filtrado y deplementado (suero fetal de ternera deplementado por calor 56°C, durante 45 minutos)

Se han mantenido en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **3.3. TECNICAS DE BIOLOGIA CELULAR.**

#### **3.3.1. PREPARACION DE MITOCONDRIAS.**

Las mitocondrias se han aislado a partir de hepatocitos de raton Balb/c (sacrificados por dislocacion craneo-vertebral y por CO<sub>2</sub>). El hígado se extrae *in situ* y se lava con medio de homogeneización (Sacarosa 0.3 M (*Sigma*), TES 0.5 mM (*Sigma*) y EGTA 0.2 mM (*Sigma*), pH 7.2 (KOH)). Se corta en pequeños pedazos y se homogeneiza en 10 ml de medio de homogeneización en un homogeneizador *Potter-Thomas*. Una vez verificada la ruptura de la membrana plasmática en una célula de Malassez después de la coloración con Azul de Trypan (Trypan Blue 0.4%, *Sigma*), hasta la obtención de una ruptura de al menos el 95% de ellas. La muestra obtenida se centrifuga en un tubo *Corex* 10 minutos a 2250 rpm (Rotor *Beckman* JA17, 760xg max) a 4°C para eliminar los restos celulares y tejidos (precipitado). El sobrenadante se centrifuga 10 minutos a 8000 rpm (Rotor JA17, 8740xg max). El precipitado de esta centrifugación, que contiene los principales orgánulos, se resuspenden un volumen entre 0.2 y 1 ml de medio de homogeneización. La muestra se deposita lentamente sobre un gradiente de Percoll (*Pharmacia*) (60/30/18%) en un tubo *Corex* preparado con anterioridad.

Medio de homogeneización de Percoll: Sacarosa 0.3 M, TES 10 mM y EGTA 0.2 mM, pH 6.9 (KOH). En este medio se preparan las soluciones de Percoll al 18, 30 y 60% de sacarosa.

Se centrifuga 10 minutos a 8000 rpm y se toma la banda mitocondrial que ha quedado entre los gradientes 60% y 30%. Se diluye 10 a 12 veces en medio de homogeneización para eliminar el Percoll y se centrifuga 10 minutos a 7000 rpm (rotor JA17, 6800 g). Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado.

#### **3.3.2. HINCHAMIENTO O “SWELLING” DE MITOCONDRIAS AISLADAS.**

Dado que las mitocondrias están un tampón con presión osmótica inferior al de su contenido (establecido por las diferentes proteínas mitocondriales), su transición de permeabilidad y su hinchamiento (del inglés "swelling") posterior se corresponde a la transferencia de agua y pequeñas moléculas a su interior. Este hinchamiento mitocondrial, corresponde con una pérdida de densidad óptica, lo cual permite una

detección y cuantificación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de dicho proceso.

El hinchamiento puede ser provocado por diferentes inductores de la apertura del poro de transición de permeabilidad: atractilósido (Atr), inhibidor de la translocación ATP/ADP, el pro-oxidante ter-butilhidroperóxido (t-BHP), el agente desacoplante carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (mCICCp), el ion calcio, el ion arsenito o finalmente por shock osmótico, que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana externa de las mitocondrias. Todos estos productos provocan la liberación de las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial al medio externo.

En una cubeta de cuarzo de un espectrofluorímetro se añade 1 mg de proteína en 200 microlitros de tampón de swelling: sacarosa 0.2 M (*Sigma*); Tris-MOPS 10 mM pH 7.4 (*Sigma*); succinato 5 mM (*Sigma*); fosfato 1 mM (*Merck*); rotenona 2  $\mu$ M (*Sigma*); EGTA 10  $\mu$ M (*Sigma*) y se mide a  $\lambda_{emisión}=\lambda_{excitación}=545$  nm. Después de un intervalo de estabilización de 45 segundos se añade una de las sustancias anteriormente descritas y se analiza el descenso de la fluorescencia con respecto al tiempo.

### **3.3.3. PREPARACION DE EXTRACTO CORRESPONDIENTE AL ESPACIO INTERMEMBRANA,**

El precipitado final del aislamiento de mitocondrias de hígado de ratón (Materiales y métodos, apartado 3.3.1) se disuelve en Tris-HCl 50 mM pH 7.6 y atractilósido 30 mM como inductor de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

Se añaden los siguientes inhibidores de proteasas:

1  $\mu$ l PMSF (100 mM)

1  $\mu$ l aprotinina (10 mg/ml)

1  $\mu$ l pepstatina A (5 mg/ml)

Finalmente se centrifuga a 50000 rpm durante 1 hora y media.

### **3.3.4. PREPARACION DE EXTRACTO MITOCONDRIAL TOTAL.**

Para la preparación de extracto mitocondrial total se resuspende el precipitado obtenido en la preparación de mitocondrias (apartado 3.3.1) en buffer de lisis (*Pierce*).

### **3.3.5. PREPARACION DE NUCLEOS.**

Tras un tratamiento con tripsina de las células adherentes HeLa, se lavan primero en tampón PBS (Phosphate Buffer Saline: solución a pH 7.4 que contiene NaCl 137 mM, (*Merck*); KCl 2.7 mM (*Merck*), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidrido 1.4 mM (*Merck*); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.3 mM, *Merck*)), a 1200 rpm, 5 minutos y posteriormente con tampon HNB<sub>1</sub> (se resuspenden en un volumen de 5 ml y se centrifugan a 1200 rpm 5 minutos) (Hela Nuclei Washing Buffer): Pipes 10 mM (*Sigma*), KCl 10 mM (*Merck*), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (*Sigma*), PMSF 0.1 mM (*Sigma*); pH 7.4.

Las células se resuspenden en 6 ml de tampon HNB<sub>2</sub> (Hela Nuclei Buffer: Pipes 10 mM (*Sigma*), KCl 10 mM (*Merck*), MgCl<sub>2</sub> 2 mM (*Sigma*), DTT 1 mM (*Sigma*), citocalasina B 10 μM (*Sigma*), PMSF 0.1 mM (*Sigma*); pH 7.4) y se dejan hinchar 60 minutos a 4°C. Se rompen en un agitador *Potter Thomas* (20-40 ciclos) y se verifica el estado de las células al microscopio con Azul Trypan para obtener la máxima eficacia. Se deposita el homogeneizado celular en un gradiente HNB<sub>2</sub> 30% sacarosa. Se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm. El precipitado, que contiene los núcleos, se lava 3 veces con tampon HNB<sub>1</sub> y se resuspende en 100 a 200 microlitros de tampon HNB<sub>2</sub>. Se pueden conservar a -20°C en un medio 50% glicerol en HNB<sub>2</sub>.

### **3.3.6. ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO.**

Esta técnica permite detectar y contar las células, los núcleos o las mitocondrias tratadas por diferentes marcadores fluorescentes con afinidad específica, sobre moléculas de membrana (anticuerpos específicos) o estructuras vitales de las células o de los orgánulos. Tras la excitación a una longitud de onda dada, que depende del marcador, la detección y el conteo se realiza en función de la cantidad de fluorescencia emitida por el marcador acoplado a las células, a los núcleos o a las mitocondrias, a una longitud de onda que depende también del marcador.

El citómetro de flujo utilizado para el estudio de células y núcleos es del tipo Epics Profile II y Vantage (*Becton-Dickinson*), mientras que para el estudio de mitocondrias es del tipo Elite.

*Determinación de las modificaciones apoptóticas de los núcleos aislados.*

El marcaje con ioduro de propidio (PI) permite el estudio del ciclo celular. El PI se fija al ADN y la intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN presente en el núcleo. De este modo, el histograma (número de células en función del contenido en ADN) muestra un primer pico correspondiente a las células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo (contenido normal en ADN), después las células en fase S, seguidas de las células en fases G<sub>2</sub> y M (contenido doble de ADN). Las células apoptóticas, que presentan menor contenido en ADN (hipoploidía) en relación a las células viables, se sitúan a la izquierda del pico correspondiente a la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. En base a la determinación de los porcentajes correspondientes se determina el contenido en ADN de los núcleos aislados.

Los núcleos a estudiar (10<sup>6</sup>/ml en medio CFS) se incuban con PI (10 microgramos/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y después se analizan por citometría de flujo.

Medio CFS (cell free system): solución a pH 7.4 que contiene: manitol (*Merck*) 220 mM; sacarosa (*Merck*) 68 mM; NaCl (*Merck*) 2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Merck*) 2.5 mM; EGTA (*Sigma*) 0.5 mM; MgCl<sub>2</sub> (*Merck*) 2mM; Piruvato (*Gibco*) 5 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *Sigma*) 0.1 mM; ATP (*Sigma*) 2 mM; creatin fosfoquinasa (*Sigma*) 50 mg/ml; fosfocreatina (*Sigma*) 10 mM; ditiotreitolo (*Sigma*) 1 mM; Hepes NaOH (*Gibco*) 10 mM.

**3.3.7. DETERMINACION POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA INDICADORA DE LAS ALTERACIONES NUCLEARES LIGADAS A LA APOPTOSIS.**

*Microscopía de fluorescencia*

Los núcleos aislados y tratados con los sobrenadantes de mitocondrias o por AIF recombinante se marcan con el fluoroforo intercalante 4'-6-diamidono-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI, 10 μM) y después se examinan en microscopía de fluorescencia.

Se examinan, como mínimo, 200 núcleos para establecer el porcentaje de núcleos apoptóticos contenidos en la preparación: condensación de la cromatina y/o aspecto translúcido de los núcleos debido a pérdida del DNA.

### **3.4. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.**

#### **3.4.1. TECNICAS BASICAS.**

Todos los materiales y reactivos utilizados en los métodos de Biología Molecular que se detallan a continuación tienen que ser siempre estériles, debiéndose trabajar en ambientes exentos de contaminantes.

##### 3.4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

Se han utilizado varios sistemas para el aislamiento de DNA plasmídico:

a) Sistemas de purificación mediante columnas de adsorción a sílice:

Sistema de purificación de DNA Wizard plus Minipreps.

Kit de purificación de DNA plasmídico (*Pharmacia*)

b) Protocolo de aislamiento de DNA plasmídico:

Se parte de un cultivo de 5-10 ml de células (en este trabajo las utilizadas han sido XL2 y E. coli BL21(D3)), crecido durante la noche a 37°C con agitación, que contiene el plásmido que se quiere aislar (pBSK o pET28a). Se centrifuga 15 minutos a 4000 rpm para recoger las células. A continuación se seca el precipitado, decantando el tubo y eliminando el sobrenadante con pipeta.

A este tubo se añaden 60 µl de tampón STET:

##### Tampón STET

Triton 0.1%

Sacarosa 5mM

Tris 25mM/HCl pH 8.8

EDTA 10mM

Se agita con vortex hasta diluir el precipitado. Se pasa todo a viales de 1.5 ml. Se añaden 40 µl de fenol/cloroformo, agitando bien hasta obtener un aspecto lechoso. Se

deja 10 minutos en hielo y se centrifuga 14000 rpm 15 minutos. Se cogen 40 µl de la fase inorgánica (superior) y se pasan a un vial nuevo, donde se añaden 60 µl de acetato sódico 3M pH 5.2 y 200 µl de etanol frío. Se deja 30 minutos (mínimo) a -20°C. Se centrifuga a 14000 rpm a 4°C 10 minutos. Tras decantar el sobrenadante se añade 1ml de etanol 70%. Se centrifuga 14000 rpm durante 10 minutos, observando un precipitado blanco. Se decanta el sobrenadante y se centrifuga brevemente. El etanol se elimina completamente con pipeta. Se dejar secar en campana con aspiración hasta que el precipitado es transparente. Finalmente este precipitado se resuspende en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8.8. Para purificar este DNA de restos de RNA se añade RNAsa a una concentración final de 20 µg/ml y se deja 15 minutos a 65-70°C.

#### 3.4.1.2. Obtención de células competentes.

Se esterilizan 100 ml de medio LB sin antibiótico en un matraz de 250 ml y se inocula 1ml de células BL21(D3) en un Falcon 10 ml de LB. Al día siguiente se añade 1 ml de este cultivo al matraz con 100 ml de LB y se deja crecer hasta una densidad óptica de, aproximadamente, 0.35-0.45 a 600nm. Para hacer competentes estas células se sigue el siguiente procedimiento:

Se enfría el matraz en hielo, aproximadamente 20-30 minutos, para parar el crecimiento. El contenido se traspasa a dos tubos de centrifuga, previamente esterilizados y enfriados. Se centrifuga en frío (4°C), a 4000 rpm, 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 1ml de tampón de trituración estéril y frío usando una pipeta automática.

##### Tampón de trituración

CaCl<sub>2</sub> 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 70 mM

NaAc 40 mM

Se añaden 19 ml más de tampón de trituración y se mezcla suavemente. Se centrifuga en frío 4°C, a 4000 rpm durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 4 ml de disolución de conservación estéril de células competentes:

##### Solución de conservación

CaCl<sub>2</sub> 100 mM

glicerol 15%

Se distribuye en alícuotas y se congela rápidamente a -80°C.

### 3.4.1.3. Transformación de células competentes.

Se han utilizado dos procedimientos para transformar células competentes, según las células utilizadas:

#### *Transformación de células supercompetentes XL2.*

Se añaden 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (Stratagene) a cada tubo con 150  $\mu$ l de células. En este caso el plásmido utilizado es pBSK, con resistencia a ampicilina. La relación DNA plasmídico:células ha de ser entorno a 1:20. Se deja el vial 20 minutos en hielo. Las células se exponen a un choque térmico de 50 segundos a 42°C en baño de agua. Se deja 2 minutos en hielo. Se añade 500  $\mu$ l LB sin antibiótico y se deja 1 hora a 37°C. Se siembra en placas con ampicilina (*Boehringer Mannheim*) 50 mg L<sup>-1</sup> y se deja crecer a 37°C toda la noche.

#### *Transformación de células competentes BL21(D3).*

En este caso el plásmido utilizado es pET28a, con resistencia a kanamicina. La relación DNA plasmídico:células utilizada es 1:50. Se siguen los siguientes pasos: Se deja 30 minutos en hielo. Las células se exponen a un choque térmico de 50 segundos a 42°C en baño de agua. Se deja el vial 2 minutos en hielo. Se añaden 500  $\mu$ l de LB sin antibiótico. Se deja 2 hora y media a 37°C. Se siembra en placas con kanamicina (*Boehringer Mannheim*) 30 mg L<sup>-1</sup> y se deja crecer a 37°C toda la noche.

### 3.4.1.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa se utiliza con fines analíticos para conocer la pureza y la concentración aproximada de un fragmento de DNA, así como para analizar los fragmentos obtenidos tras una digestión enzimática. También se puede utilizar con fines preparativos para aislar o purificar DNA. Esta técnica está basada en el desplazamiento hacia el cátodo (polo positivo) del DNA (molécula cargada negativamente), en presencia de un campo eléctrico.

En este trabajo se han utilizado geles de agarosa con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989) para visualizar los fragmentos de DNA. La agarosa se funde en el tampón TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) y se le añade el bromuro de etidio a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml. La mezcla se vierte con cuidado en una cubeta y se colocan los peines para formar los pocillos. Cuando gelifica, se desmontan



los peines, se coloca en la cubeta de electroforesis y se añade por encima tampón TBE. La preparación de las muestras se realiza mezclando a partes iguales la solución de DNA (generalmente 5  $\mu$ l) con el mismo volumen de agua y 0.6 volúmenes de tampón de carga (EDTA 50 mM, pH 8, glicerol 50%, SDS 0.1%, azul de bromofenol 0.05%; en TBE). Las muestras se cargan en los pocillos y en uno se aplica 5  $\mu$ l de marcador de concentración conocida. La electroforesis se realiza a una diferencia de potencial constante entre los electrodos de la cubeta de unos 90 voltios. Los fragmentos separados de DNA se visualizan debido a que el bromuro de etidio unido al DNA produce fluorescencia visible al ser excitado con luz ultravioleta en un transiluminador (20 II macrovue de LKB *Bromma* con una lámpara ultravioleta de 302 nm).

Para conocer el peso de los fragmentos se comparan las distancias migradas en el gel de los fragmentos de DNA con los fragmentos de un marcador de peso molecular. El marcador utilizado es el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (*Fermentas*). Para cuantificar el DNA se compara la intensidad de las bandas de DNA con las del marcador. Se cargan 5 $\mu$ l de marcador lambda/*HindIII* (1 $\mu$ g de DNA total) en un pocillo.

Las bandas del marcador son las siguientes:

nº banda	pares de bases	ng (5 $\mu$ l)
1	564	12
2	2027	42
3	2322	48
4	4361	90
5	6557	135
6	9416	194
7	23130	477

#### 3.4.2. CLONAJE DE hAIF EN pBSK.

Se ha partido de un fragmento de DNA de hAIF, previamente extraído del vector de clonación pCR2.1 (*Invitrogen*) (Figura 3.1) mediante digestión con la enzima *EcoRI*. El vector de clonaje pCR2.1 es un plásmido de 3.9 Kb, confiere resistencia frente a los antibióticos ampicilina y kanamicina, y contiene el origen de replicación junto con una

porción del gen *lac Z* de *E. coli*. Ese fragmento codifica los primeros 146 aminoácidos de la  $\beta$ -galactosidasa para la  $\alpha$ -complementación.

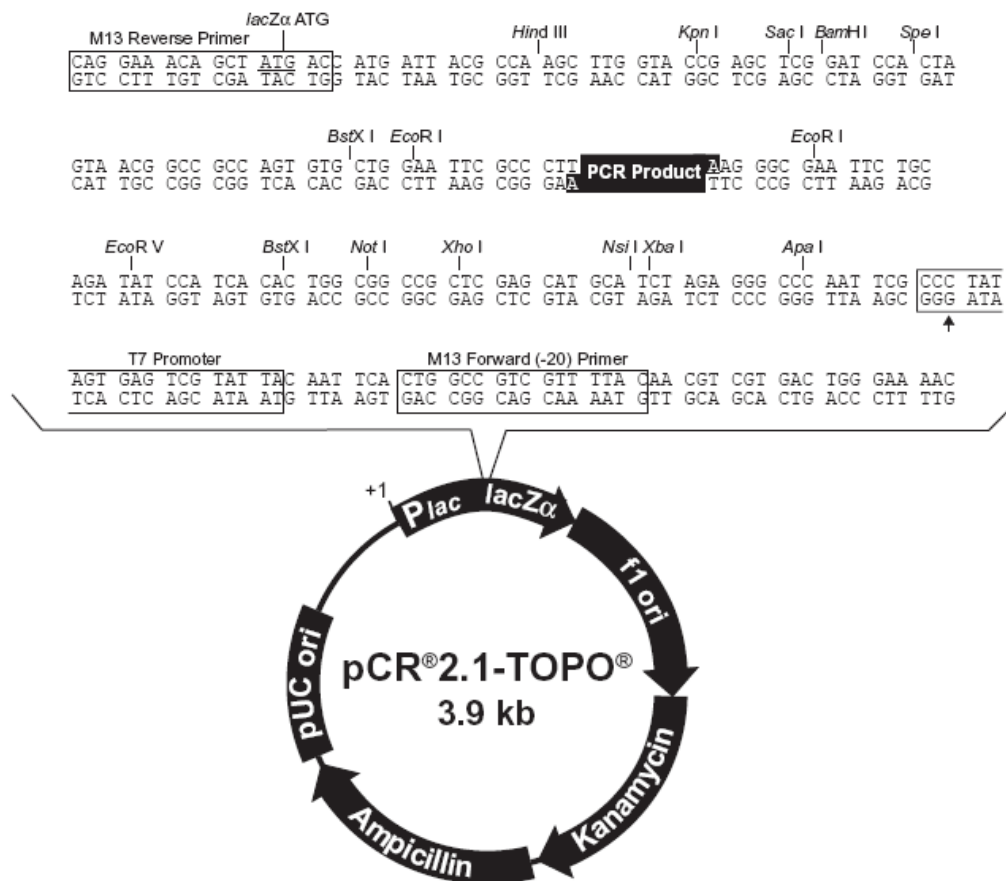
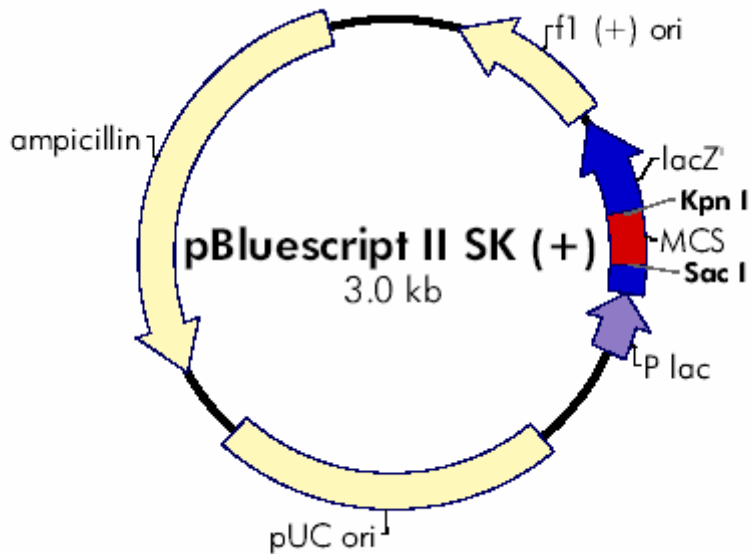


Figura 3.1. Mapa de vector de clonación pCR2.1 (*Invitrogen*). hAIF $\Delta$ 1-102 está insertada en el sitio de restricción *EcoRI*.

Se ha realizado un subclonaje en el vector pBluescript II SK (+) (pBSK) con el fin de realizar mutagénesis y clonar posteriormente el DNA de hAIF en el vector de expresión pET28a. Se realizó el subclonaje en pBSK para realizar las reacciones de mutagénesis de hAIF $\Delta$ 1-102, en lugar de realizarlas directamente en el vector pET28a, para no afectar la expresión del mismo, por la posibilidad de introducir una mutación involuntariamente durante el proceso, que obligaría a la secuenciación total de pET28a con el inserto para verificar la ausencia de mutaciones espontáneas no deseadas.

En la figura 3.2 se expresan las características del vector pBSK utilizado.



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region  
(sequence shown 598–826)**

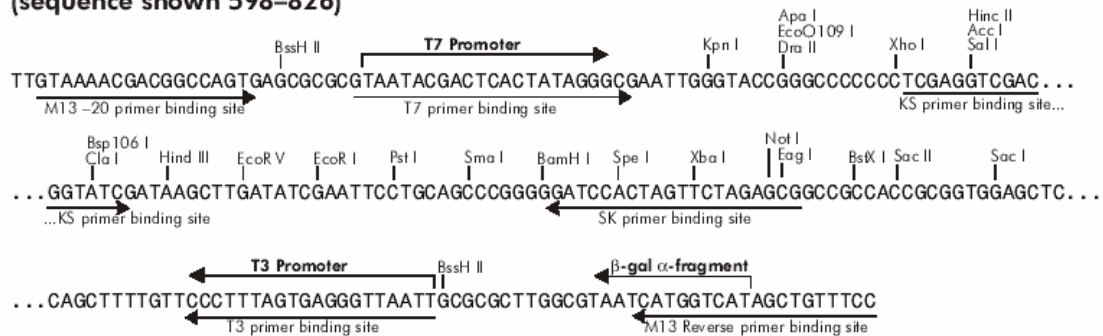


Figura 3.2. Mapa del vector de clonación pBluescript II SK (pBSK).

Para la clonación en este vector se han realizado los siguientes pasos:

- Defosforilación del fragmento hAIF.
- Ligación con pBSK.
- Transformación de células XL2 competentes.
- Cultivo de células, aislamiento de plásmido y análisis.

Antes de la ligación se desfosforila el fragmento hAIF para que no anille el mismo, ya que está entre dos sitios de restricción EcoRI.

a) *Defosforilación del fragmento hAIF.*

Este método se ha realizado según Maniatis *et al.* (1982).

El extremo cohesivo 5' es energéticamente mas favorable para religarse que para unirse a extremos de otro fragmento de DNA. Por ello, los extremos 5' fosfato del DNA linearizado se deben desfosforilar para prevenir su autoligacion. En presencia de otro fragmento de ADN fosforilado en los extremos 5' éste incorporará este fragmento.

Reacción de defosforilación

10 µl DNA  
2 µl tampón fosfatasa (10X)  
1 µl enzima fosfatasa alcalina  
7 µl dH<sub>2</sub>O

Se mezcla bien y se deja 15 minutos a temperatura ambiente. Se añade 1 µl fosfatasa alcalina y se mezcla. Se deja 15 minutos a temperatura ambiente. El ácido EDTA es quelante de cationes divalentes tales como el Mg<sup>2+</sup> el cual es un cofactor requerido por la fosfatasa alcalina, por tanto, la fosfatasa alcalina se inactiva añadiendo 1 µl 0.5M EDTA e incubando a 65°C durante 30 minutos.

b) *Ligación con pBSK.*

Ligación

1 µl pBSK  
5 µl hAIF desfosforilado  
1 µl buffer 10X  
2 µl H<sub>2</sub>O mQ  
1 µl T4 ligasa

Control

1 µl pBSK  
1 µl buffer 10X  
7 µl H<sub>2</sub>O  
1 µl T4 ligasa

Se deja 2 horas a temperatura ambiente.

c) *Transformación de células XL2 competentes.*

Se transforman células XL2 por el siguiente procedimiento:

Se realiza una mezcla con 5 µl de ligación, 125 µl células XL2 y 1 ml de medio LB. Esta mezcla con las células con el DNA de la ligación se deja 20' en hielo, tras lo cual se realiza un choque térmico de 50 segundos a 42°C en baño de agua. Se enfría 2' en hielo y finalmente se añade el LB sin ampicilina.

d) *Cultivo de células, aislamiento de plásmido y análisis.*

A continuación se siembra en 3 placas y 3 placas control, con 100, 300 y 600 µl respectivamente. Se deja un mínimo de 18 horas en estufa a 37 °C. Se cultivan en 10 ml de medio LB con ampicilina en el agitador orbital. Se aísla plásmido mediante el sistema descrito en Materiales y métodos, apartado 3.4.1.1. y se comprueba el aislamiento de plásmido en gel de agarosa al 1%. Se realizan dos digestiones con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para comprobar el clonaje de hAIFΔ1-102 y su direccionalidad.

Digestiones de pBSKhAIF

a)

2 µl DNA

1 µl Buffer H (10X)

6.5 µl H<sub>2</sub>O

0.5 µl *EcoRI*

b)

2 µl DNA

1 µl Buffer H (10X)

6.5 µl H<sub>2</sub>O

0.5 µl *BamHI*

### 3.4.3. MUTAGENESIS DIRIGIDA.

#### 3.4.3.1. Diseño de oligonucleótidos.

En el diseño de los oligonucleótidos para cada mutación se ha incorporado también una mutación silenciosa que crea un sitio de restricción específico. Comprobando la existencia de este sitio de restricción mediante digestión con la enzima correspondiente tendremos una gran probabilidad de haber incorporado también la mutación puntual buscada.

<u>Mutación introducida</u>	<u>Mutación silenciosa</u>	<u>Oligonucleótido empleado</u>
F310G	<i>Sac</i> -I	5'-ATTATCggTgggggCggCCTTggTAgCgAgCTCgCCTgTg-3' (directo) 5'-CACAggCgAgCTCgCTACCAAaggCCgCCCCACCGATAAT-3' (reverso)
W483G	<i>Cla</i> -I	5'-CTggCATCAATCgATgTTCgggAgTgATTTgggCCCCgATg-3' (directo) 5'-CATCggggCCCAAATCACTCCCgAACATCgATTgATgCCAg-3' (reverso)
K177W	<i>Sac</i> -I	5'-CCgTACATgCgACCTCCTCTTTCATgggAgCTCTggTTTTCAgATgACCC-3' (directo) 5'-gggTCATCTgAAAACCAgAgCTCCCATgAAAgAggAggTCgCATgTACgg-3' (reverso)
E314S	<i>Nhe</i> I	5'-gTgggggCTTCCTTggTAgCTcgCTAgCCTgTgCTCTTgg-3' (directo) 5'-CCAAgAgCACAggCTAgCgAgCTACCAAaggAAgCCCCAC-3' (reverso)
P173G	-	5'CCgTACATgCgAggTCCTCTTTCAAAAgAACTgTgg-3' (directo) 5'-CCAgAgCTCTTTTgAAAgAggACCTCgCATgTACgg-3' (reverso)

Los oligonucleótidos utilizados proceden del servicio de síntesis de oligonucleótidos de *Proligo* e *Invitrogen*.

### 3.4.3.2. Reacciones de mutagénesis dirigida.

El método utilizado en este trabajo para la mutagénesis dirigida de hAIF es la reacción de PCR:

a) Mutaciones F310G, W483G, K177W y E314S. Se han realizado utilizando el plásmido pBSK con el inserto hAIF. Se ha utilizado como enzima polimerasa PfuTurbo<sup>®</sup> DNA polimerasa (*Stratagene*), la cual es una enzima que asegura una alta fidelidad de copia en la reacción de PCR.

#### Reacción de PCR

5 µL tampón Pfu (10x)  
2 µL DNA (30-50 ng) (hAIF+pBSK)  
1 µL oligonucleótido directo  
1 µL oligonucleótido reverso  
1 µL dNTPs (100 µM)  
39 µL H<sub>2</sub>O  
1 µL Pfu (2.5 U)

El DNA y los oligonucleótidos se calientan previamente a 100°C y a continuación se dejan en hielo. El DNA es una dilución 1 :10 del obtenido en el aislamiento de plásmido.

#### Programa

95°C 2'  
95°C 30"  
55°C 30" (18 ciclos)  
68°C 10'  
68°C 15'  
12°C PAUSA

NOTA: El tiempo de la temperatura de hibridación es 2 minutos por kilobase de ADN. Como la longitud total del fragmento de DNA es 5kb (pBSK: 3 kb + inserto: 2kb), el tiempo programado es 10 minutos.

Tiempo aproximado: 4 horas

b) Mutación P173G: Se ha utilizado el plásmido pET28a con el inserto hAIF.

### Reacción de PCR

5 µL buffer Pfu (10x)  
2 µL ADN (30-50 ng) (hAIF+pET)  
1 µL oligonucleótido directo  
1 µL oligonucleótido reverso  
1 µL dNTPs (100 µM)  
39 µL H<sub>2</sub>O  
1 µL Pfu (2.5 U)

El DNA y los oligonucleótidos se calientan previamente a 100°C y a continuación se dejan en hielo.

### Programa

95°C 2'  
95°C 30''  
55°C 30'' (18 ciclos)  
68°C 14'  
68°C 15'  
12°C PAUSA

NOTA: El tiempo de la temperatura de hibridación es 2 minutos por kilobase de ADN. Como la longitud total del fragmento de DNA es 7kb (pET: 5 kb + inserto: 2kb), el tiempo programado es 14 minutos.

Tiempo aproximado: 4 horas

Se comprueba la amplificación del DNA en un gel de agarosa al 1%. Se añaden 5 µl marcador  $\lambda$ /*Hind*III a cada lado. Para cada muestra se añaden 5 µl producto de PCR y 1 µl tampón de carga para DNA (6X)

Se realiza una digestión con *Dpn*I 1 hora a 37°C. Este enzima corta el DNA plasmídico en sitios metilados, de forma que el DNA resultante será exclusivamente el generado en la reacción de PCR.

### Digestión

MgCl<sub>2</sub> 1M 0.5 µl (10mM final)  
DTT 50 mM 1 µl. Para una concentración final 1 mM  
1 µl *Dpn*I.



Al final se puede inactivar la *DpnI* incubando a 80°C durante 20 minutos.

#### 3.4.3.3. Comprobación de la mutagénesis.

Se transforman células supercompetentes XL2 (células competentes BL21(D3) en el caso de la mutación P173G) y se siembran en placas con antibiótico (ampicilina para XL2 y kanamicina para BL21(D3)). Se dejan crecer a 37°C toda la noche. Al día siguiente se siembran 5 colonias de cada placa en 5 ml de medio LB con antibiótico. Se dejan crecer a 37°C en agitación. Al día siguiente se aísla DNA plasmídico y se realiza una digestión con la enzima correspondiente al sitio de restricción introducido mediante mutagénesis (mutación silenciosa).

##### Digestión

1 µl DNA

1 µl tampón enzima (10X)

6.5 µl H<sub>2</sub>O

0.5 µl enzima

##### Mutantes

K177W con *SacI* (tampón A)

F310G con *SacI* (tampón A)

E314S con *NheI* (tampón M)

W483G con *ClaI* (tampón H)

P173G con *SacI* (tampón A)

Se deja 1 hora a 37°C. Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

##### Elaboración de un mapa de restricción

Se siembran las colonias de las mutaciones individuales en 8 ml de medio LB con ampicilina. Al día siguiente se aísla plasmido con el kit Wizard (ver apartado 3.4.1.1) de las mutaciones individuales. Se realiza un mapa de restricción para comprobar que no se han generado otras mutaciones durante la PCR utilizando la siguientes enzimas de restricción:

*Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Stu*I, *Xba*I, *Xho*I

Digestión

Se hace una mezcla para cada enzima para las cuatro mutaciones :

1 µl enzima

4 µl Buffer 10X

16 µl H<sub>2</sub>O

De esta mezcla cogemos 5 µl y añadimos 5 µl DNA (diluído ½).

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

**3.4.4. OBTENCION DEL MUTANTE DOBLE K177W/E314S.**

Este mutante se ha realizado mediante cortes con enzimas de restricción y ligación.

Se siembran los cuatro mutantes en 8 ml de medio LB con ampicilina. Al día siguiente se aísla plásmido mediante el kit Wizard y realizamos la siguiente digestión:

Digestión

1 µl enzima *Hind*III

5 µl DNA

2 µl tampón 10X

12 µl H<sub>2</sub>O

Se cortan las siguientes bandas de pBSK hAIF en los diferentes mutantes:

Fragmento de 1000 pb aproximadamente (K177W)

Fragmento de 4 kb aproximadamente (E314S)

El DNA de las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se purifica con el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*):

Se añade el primer tampón en una relación de 3 veces el peso. Cada columna de este kit tiene una capacidad máxima de 700 µl. Si se supera hay que hacerlo en dos veces. Se centrifuga 1 minuto si es de una vez y 30 segundos si se hacen varias veces. Antes de la ligación tenemos que desfosforilar el vector (fragmento de mayor tamaño) para que no anille el mismo (ver apartado 3.4.2).

Ligación

La relación entre vector e inserto es según el tamaño, a igual concentración. Como tienen la misma concentración lo hacemos en relación de tamaño.

- 4 µl hAIFΔ1-102 K177W *Hind*III
- 1 µl hAIFΔ1-102 K177W E314S *Hind*III
- 1 µl buffer 10X
- 3 µl H<sub>2</sub>O miliQ
- 1 µl T4 ligasa

Controles

- 1 µl hAIFΔ1-102 E314S *Hind*III
- 1 µl buffer 10X
- 7 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl T4 ligasa

Se transforman células supercompetentes XL2. Se añaden 2µl de β-mercaptoetanol (*Stratagene*) a cada tubo con 150 µl de células.

Se realiza para el mutante doble K177W/E314S y el control correspondiente.

Ligación

- 2 µl DNA ligación
- 30 µl células

Se deja 20 minutos en hielo y posteriormente se somete a choque térmico: 50 segundos a 42°C en baño de agua. Tras enfriar 2 minutos en hielo y se añaden 500 µl LB sin ampicilina. Se deja 1 hora a 37°C. A continuación se siembra en placas con ampicilina. Al día siguiente observamos que ha crecido una colonia para cada mutante doble. Se siembra esta colonia en 8 ml de medio LB con ampicilina. Al día siguiente aislamos plásmido y se hace una digestión para comprobar que tenemos la doble mutación K177W/E314S.

Digestión

- 5 µl DNA
- 1 µl *Sac*I
- 1 µl *Nhe*I
- 1 µl tampón enzimas restricción
- 2 µl H<sub>2</sub>O

### 3.4.5. CLONAJE EN pET DE hAIF SALVAJE Y SUS MUTANTES.

Los insertos correspondientes a hAIF $\Delta$ 1-102 y sus mutantes se clonaron en el vector de expresión pET28a (*Novagen*), Figuras 3.3 y 3.4. El sistema pET permite la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, en general de origen eucariótico. Los plásmidos pET presentan secuencias de reconocimiento de transcripción para el bacteriófago T7 y, opcionalmente, secuencias de unión al ribosoma con un alto grado de eficiencia para la transcripción. Además pueden contener secuencias que permiten la purificación posterior de la proteína recombinante que se expresa. En este caso el vector pET28a contiene una secuencia cuya expresión junto con el inserto produce una proteína de fusión con cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal (Figura 3.4). Este plásmido confiere resistencia a kanamicina, lo cual es recomendable cuando se subclonan genes a partir de vectores que confieren resistencia a ampicilina. Las células huésped empleadas para el vector pET28a son BL21(DE3), una cepa de *E. coli* que contiene una copia cromosómica del gen correspondiente a T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, el cual es inducible por isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

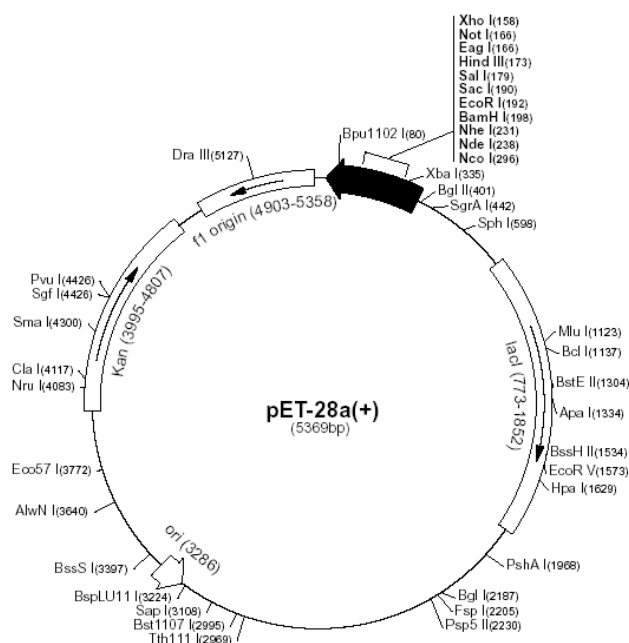


Figura 3.3. Mapa del vector pET28.



Figura 3.4. Secuencias del sitio de restricción múltiple del vector pET28.

### 3.4.5.1. Preparación de plásmido pET28a .

A partir de vector pET con inserto (mAIF 1-101) hacemos una restricción con *NdeI* y *NotI* para aislar pET cortado.

#### Digestión

- 100 µl DNA plasmidico (pET)
- 10.4 µl buffer H (10X)
- 2 µl *NdeI*
- 2 µl *NotI*

Se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% de agarosa fino. Una vez separados los diferentes fragmentos se corta una banda entre 5000 y 6000 pb que se corresponde con el pET cortado por *NdeI* y *NotI* (5300 pb).

### 3.4.5.2. PCR para crear sitio de restricción *NdeI*.

El oligonucleótido directo utilizado para crear sitio de restricción *NdeI* en pBSKhAIF y en los distintos mutantes es el siguiente:

5' ggAATTCCATATggggCTgACACCAgAACA 3'

Como oligonucleótido reverso se utiliza la secuencia del T3 terminador presente en el plásmido pBSK.

### Reacción de PCR

2.5 µL buffer Pfu (10x)  
1 µL DNA (30-50 ng) (hAIF+pBSK)  
1 µL oligonucleótido directo (10 µM)  
1 µL oligonucleótido reverso (T3)  
0.5 µL dNTPs (100 µM)  
18.5 µL H<sub>2</sub>O  
0.5 µL Pfu (2.5 U)

Se calienta el DNA y los oligonucleótidos a 100°C y a continuación se dejan en hielo. El DNA que añadimos es una dilución 1:10 del obtenido en el aislamiento de plásmido.

### Programa

95°C 2'  
95°C 30"  
55°C 30" (25 ciclos)  
68°C 5'  
68°C 15'  
12°C PAUSA  
Tiempo aproximado: 3 horas

### Digestión

2.6 µl buffer H  
0.5 µl *Nde*I  
0.5 µl *Not*I  
25 µl DNA (todo el producto de la PCR)

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0.5%. Se cortan las bandas correspondientes al WT y a cada mutante. Purificamos el DNA mediante el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*).

En un gel de agarosa al 0.5% se cuantifica 5 µl de ADN de hAIFWT y los mutantes con los sitios de restricción *NdeI* y *NotI*. Al lado se cuantifica pET cortado con *NdeI* y *NotI*.

#### Ligación

La relación entre vector e inserto es según el tamaño, a igual concentración.

Como tienen la misma concentración lo hacemos en relación de tamaño.

3 µl DNA mutante

1 µl pET

1 µl buffer 10X

4 µl H<sub>2</sub>O miliQ

1 µl T4 ligasa

#### Control

1 µl pET

1 µl buffer 10X

7 µl H<sub>2</sub>O

1 µl T4 ligasa

Normalmente se deja 2 horas a temperatura ambiente. En este caso, lo dejamos 20 horas a temperatura ambiente.

Se transforman células supercompetentes XL2. Se añaden 2 µl de β-mercaptoetanol (*Stratagene*) a cada tubo con 150 µl de células. Se mezclan 2 µl de DNA de ligación con 30 µl de células. Se deja 20' en hielo. Se somete a choque térmico (50 segundos a 42°C en baño de agua). A continuación se enfría 2' en hielo. Se añaden 500 µl de medio LB sin ampicilina. Se deja 1 hora a 37°C. Se siembra cada colonia en 8ml de medio LB con kanamicina. Al día siguiente aislamos plásmido y hacemos una digestión con *NdeI* y *NotI* para comprobar que están clonados en pET entre los sitios de elección.

#### Digestión

0.5 µl enzima *NdeI*

0.5 µl enzima *NotI*

5 µl DNA

2 µl buffer H

12 µl H<sub>2</sub>O

Como el vector pET se obtuvo a partir de pET con inserto mAIF , se comprobó que el inserto obtenido era hAIF y no mAIF. Para diferenciar hAIF de mAIF se hizo una restricción con *XhoI* (mAIF no tiene este sitio de restricción, solamente el plásmido pET). Se realizó la siguiente digestión :

### Digestión

5 µl DNA

3 µl H<sub>2</sub>O

1 µl buffer H 10x

1 µl *XhoI*

### **3.4.6. SECUENCIACION DE DNA.**

El DNA plasmídico obtenido a partir de la mutagénesis dirigida se secuenció con objeto de verificar la mutación introducida. Esta secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del CNIO (Madrid), mediante un secuenciador ABIPrism 3100 (*Applied Biosystems*).

## **3.5. TECNICAS ANALITICAS**

### **3.5.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

3.5.1.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

#### Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente tamiz molecular y permiten el control del tamaño de poro, utilizando concentraciones distintas de monómeros de partida, además de presentar una absorción despreciable del material proteico. Los compuestos utilizados para construir la matriz de poliacrilamida son acrilamida, N,N'-metilen-bis (acrilamida), tetrametilendiamina (Temed) y persulfato amónico (APS), obteniéndose una malla de cadenas de acrilamida.

En primer lugar se prepara el molde para el gel. Para ello se lavan los cristales con agua y etanol y secarlos sin poner los dedos y se montan los cristales, espaciadores, placa de oxido de aluminio y papel encerado sujetándolos con las



pinzas. Se prepara el gel de poliacrilamida donde correrán las muestras (gel separador) con guantes (cantidad para dos geles):

<u>Gel separador</u>	<u>% de entrecruzamiento del gel</u>	
	15%	12%
Agua destilada	4,7 ml	6.72 ml
Tris/HCl 1,5 M pH=8,8	5 ml	5.1 ml
Bisacrilamida/acrilamida (0.8/30%)	100 µl	80 µl
SDS 20 %	100 µl	100 µl
TEMED	7 µl	10 µl
APS 10 % (w/v)	200 µl	80 µl

APS es el último reactivo que se añade. Se vierte rápidamente en los cristales llenando 3/4 de la altura; se cubre con agua, para evitar la formación de meniscos. Se deja gelificar (puede dejarse 24 horas en la cámara fría a 4 °C). El gel de poliacrilamida donde se aplican las muestras (gel concentrador) se prepara con los siguientes reactivos (cantidad para dos geles):

<u>Gel concentrador</u>	
Agua destilada	5,7 ml
Tris/HCl 0,5 M pH=6,8	2,5 ml
acrilamida ( 1/30 % )	1,7 ml
SDS 20%	50 µl
APS 10%	100 µl
Temed	3,5 µl

Se quita el agua que cubre el gel separador y se añade la disolución recién preparada, se ponen los peines y se deja en la cámara fría a 4 °C, si no se utiliza inmediatamente.

#### *Preparación de las muestras*

Tras añadir un volumen igual de tampón de muestras a la muestra problema, se calientan durante 5 minutos a 100°C.

### Tampón de muestras :

Tris/HCl 0,5 M pH=6,8	5 ml
glicerol	2 ml
Azul de bromofenol	2 mg
agua	3 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	5%
SDS	2.5%

Se desmonta el molde y se separa el peine. Se colocan los cristales con el gel en la cubeta y sujetan con pinzas. Se llenan con tampón de electroforesis los depósitos superior e inferior de la cubeta. Durante la electroforesis se refrigera continuamente con agua.

### Tampón de electroforesis :

Tris 0,025 M
Glicina 0,2 M
SDS 0,0035 M

Se aplica 10  $\mu$ l de muestra en cada pocillo (5-10  $\mu$ g). Se conecta la fuente a 40 mA; mientras corren las muestras por el gel concentrador. En el gel separador se aumenta a 80 mA. Cuando el colorante ha llegado al final del gel se desconecta la fuente.

### *Determinación del peso molecular*

En electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se usaron patrones preteñidos (Benchmark Prestained Protein Ladder, de *Gibco*) indicadores de 10 bandas de peso molecular 241 kDa, 147 kDa, 99kDa, 69 kDa (banda orientativa coloreada en rosa), 57 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 23 kDa, 18 kDa y 9 kDa. Para una visualización óptima en la membrana de transferencia se usa de 5 a 10  $\mu$ l de la mezcla, según el tamaño del gel.

### Electroforesis con PhastSystem™ (*Pharmacia*)

#### *Sistema, geles y tampón de cubeta*

Normalmente se han utilizado geles con un gradiente en poliacrilamida del 10 al 15 % ó del 8 al 25 % con un 2 % de entrecruzamiento (*Pharmacia*). Los geles tienen

0,45 mm de espesor aproximadamente. El tampón de dichos geles es acetato 0,112 M y Tris 0,112, pH 6,4.

La composición del tampón en las tiras que ejercen la función de tampon de cubeta es, en el caso de las tiras de SDS (PhastGel SDS Buffer Strips, *Pharmacia*): tricina 0,20 M, Tris 0,20 M y 0,55 % en SDS, pH 8.1; y en el caso de las tiras sin SDS (PhastGel Native Buffer Strips, de *Pharmacia*): L-alanina 0,88 M y Tris 0,25 M, pH 8. Las tiras de tampón están fabricadas en agarosa al 2 %.

#### *Preparación de las muestras*

En el caso de las electroforesis en presencia de SDS (gel desnaturalizante) resulta preciso añadir a la muestra SDS al 2.5 % y b-mercaptoetanol al 5 %, calentar a 100 °C durante 5 minutos y añadir 0.01 % de azul de bromofenol. Si se trata de electroforesis sin SDS (nativas) las muestras se aplican directamente al gel.

Para cargar las muestras en el gel se utilizan peines proporcionados por *Pharmacia* capaces de cargar 1µl de cada muestra. El número de muestras que aplicamos en cada gel es de 8. Cuando la tinción del gel se lleva a cabo con azul de Coomassie, las muestras deben tener una concentración mínima de 20-30 ng de proteína por µl de muestra.

#### *Métodos de separación*

Los métodos utilizados son los recomendados por la casa comercial para los distintos de geles utilizados y que se hallan programados en el aparato. Su tiempo de duración depende del programa utilizado.

#### *Tinción del gel*

La tinción de los geles se realiza en el mismo aparato PhastSystem utilizando las siguientes soluciones:

##### Solución de teñido

Azul de Coomassie ( <i>Pharmacia</i> )	0.1 %
Metanol ( <i>Probus</i> )	30%
Acido acético ( <i>Probus</i> )	10%

### Solución de lavado

Metanol ( <i>Probus</i> )	30%
Acido acético ( <i>Probus</i> )	10%

### Solución preservadora ( para geles 8-25)

Glicerol ( <i>Probus</i> )	10%
Acido acético ( <i>Probus</i> )	10%

Tanto para la tinción de geles de electroforesis nativas como para los de electroforesis en presencia de SDS, se utilizan las mismas soluciones. Los programas de tinción son, sin embargo distintos y se han utilizado los recomendados por el comerciante.

Una vez terminado el proceso de tinción, el gel se deja secar al aire durante dos o tres días y una vez seco no precisa de ningún otro tratamiento especial para su conservación.

### *Determinación del peso molecular*

El peso molecular de las proteínas en este trabajo se ha calculado por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS utilizando como patrones indicadores de peso molecular fosforilasa b (94000 Da), seroalbúmina bovina (67000 Da), ovoalbúmina (43000 Da), anhidrasa carbónica (30000 Da), inhibidor de tripsina de soja (20100 Da) y a-lactoalbúmina (14400 Da), de *Pharmacia*.

#### 3.5.1.2. Isoelectroenfoque.

Se utilizaron geles PhastGel™ IEF 3-9 de *Pharmacia*. Son geles homogéneos de poliacrilamida (5% T, 3% C) que contienen unos anfolitos que generan un gradiente lineal de pH en el gel cuando la corriente eléctrica pasa a través de ellos. Las proteínas migran bajo el campo eléctrico aplicado hasta detenerse en el pH correspondiente a su punto isoeléctrico.

La muestra debe encontrarse disuelta en agua o en un tampón que no contenga una elevada concentración salina. Las muestras se aplican sobre el gel con la ayuda de unos peines que cargan 1 o 0.5 µl.

Después del isoelectroenfoque en las condiciones programadas en el PhastSystem la tinción del gel se realiza en la unidad reveladora con las siguientes disoluciones:

Solución de teñido:

Azul de Coomasie ( <i>Pharmacia</i> )	0.2% (p/v)
CuSO <sub>4</sub> ( <i>Panreac</i> )	0.1% (p/v)
Metanol ( <i>Probus</i> )	30%
Acido acético ( <i>Probus</i> )	10%

Solución de lavado:

Metanol ( <i>Probus</i> )	30%
Acido acético ( <i>Probus</i> )	10%

Solución fijadora:

Acido tricloroacético ( <i>Panreac</i> )	20%
--	-----

El gel se deja secar durante dos o tres días al aire. Una vez seco, no precisa ningún cuidado especial para su conservación.

Para la determinación del pI de las proteínas de este trabajo se utilizan los siguientes patrones indicadores del pI en el rango 3-9 (*Pharmacia Biotech*): aminoglucosidasa, inhibidor de la tripsina de soja,  $\beta$ -lactoglobulina A, anhidrasa carbónica B bovina, anhidrasa carbónica B humana, mioglobina de caballo, rojo de metilo (colorante), lectina lentil y tripsinógeno.

### **3.5.2. DETECCION DE PROTEINAS EN FILTROS DE NITROCELULOSA UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECIFICOS (Western blot).**

El procedimiento seguido tiene cuatro partes: separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa ó PVDF, tratamiento del filtro con anticuerpos específicos y detección de los inmunoprecipitados.

En primer lugar se realiza una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (ver 3.5.1).

**Transferencia de proteínas del gel a membranas**

Se ha utilizado el sistema de *Biorad*. Se toma una cubeta y en ella se coloca la pieza en forma de libro sobre su parte gris. Se empapan de tampón de transferencia los estropajos blancos y uno de ellos se coloca sobre la parte gris.

tampón de transferencia

Volumen: 3 l.

Tris 9,08 g.

Glicina 43,24 g.

SDS 3,0 g.

Metanol 600 ml

Agua destilada 2,4l

Se ajusta a pH 8.3 con NaOH.

Para realizar la transferencia, se necesita que el tampón esté frío, por lo tanto se guarda a 4 °C .

Se cortan cuatro trozos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño del gel y empapados en el tampón, colocamos dos de ellos sobre el estropajo. Encima se coloca el gel (sin los cristales) cortando la esquina superior de izquierda como referencia. El tipo de papel que se puede usar en la transferencia puede ser:

- PVDF (*Immobilon-P*). Se requiere su uso si la proteína va a ser secuenciada. Necesita un pretratamiento por ser extraordinariamente hidrofóbico:

- a) Sumergir la membrana en metanol del 100% durante 3 segundos.
- b) Cambiar y mantener la membrana en agua durante dos minutos.
- c) Equilibrar la membrana durante dos minutos en el tampón de transferencia.

- Nitrocelulosa (*Hybond-C extra*). El único pretratamiento consiste en:

- a) Mojar la membrana en agua destilada.
- b) Sumergir la membrana en tampón de transferencia.

Con guantes nuevos, se corta papel de nitrocelulosa o PVDF y se marca una esquina del mismo con un corte que haremos coincidir con la misma marca en el gel. Empapado en tampón se coloca sobre el gel. Todas las burbujas entre ambos deben ser eliminadas por completo mediante una pipeta de cristal. Los otros trozos de papel Whatman, empapados, se colocan encima, se pasa de nuevo la pipeta a modo de rodillo y se coloca el otro estropajo también empapado y la carpeta se cierra por su parte

transparente. Se echa el tampón en la cubeta de transferencia y se introduce la "carpetita" con la polaridad correcta :

Parte gris (donde está el gel) en el cátodo - (color negro)

Parte transparente (donde está el filtro) en el ánodo + (color rojo).

Se introduce la cubeta de transferencia en otra con hielo picado y se lleva a la cámara fría. Se conecta la fuente de alimentación a 100 V. El tiempo de transferencia depende del tipo de proteína que se quiere transferir. En este caso, el tiempo de transferencia utilizado para AIF ha sido de 1 hora y media.

#### **Tratamiento de la membrana**

Una vez que las proteínas se han fijado a la nitrocelulosa, se añade el primer anticuerpo específico que "reconoce" a una o varias secuencias de aminoácidos de la proteína con la que se obtuvieron. y se unen en un equilibrio. Posteriormente se añadimos un segundo anticuerpo, que por un lado tiene actividad anti-IgG de conejo, uniéndose a las proteínas de conejo que reconozca, y por otro lado tiene actividad peroxidasa, que se aprovecha para provocar una reacción de coloración en el punto donde se encuentra.

Se prepara una bolsa de polietileno donde se introduce el filtro. Las cantidades indicadas en los lavados y las incubaciones, son las adecuadas para el tratamiento de un filtro de dimensiones 8 x 5 cm y cuando el filtro se encuentra en el interior de una bolsa. Se lava el filtro con TBS (Tris buffered saline).

#### **Tampón Tris salino (TBS)**

Tris-HCl 50 mM

NaCl 150 mM

Se ajusta a pH 7,5 con HCl.

Se elimina el TBS y se añade dentro de la bolsa que contiene el filtro 12 ml de la disolución de bloqueo al 1% (peso/volumen) (se utilizó el reactivo suministrado por *Boehringer Mannheim*, también se puede utilizar albúmina bovina (*Sigma*) al 3% en TBS). Se deja una hora agitando o toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaba el filtro con el primer anticuerpo: 10 ml de disolución de bloqueo al 0,5% con 66 µl del anticuerpo anti-AIF de conejo (200:1), durante una hora con agitación. Tras la incubación se lava en primer lugar dos veces con TBST (TBS y el detergente Tween 20 (*Sigma*) diluido al 0,1%(V/V)) (dentro de la bolsa ponemos 10 ml) durante diez minutos y en segundo lugar dos veces con disolución de bloqueo al 0,5%, utilizando

10 ml cada vez, durante 10 minutos. A continuación se incuba con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo con actividad peroxidasa: GAR-PO) durante una hora. La concentración del anticuerpo debe de ser de 750 mU/ml. Finalmente se lava cuatro veces con TBST (40 ml/lavado) durante 15 minutos cada vez.

### **Detección de proteínas**

#### *Método colorimétrico*

La reacción que permite dar color a la zona donde se encuentra la proteína unida a los anticuerpos específicos y anticonejo es la provocada por la actividad peroxidasa ligada al segundo anticuerpo.

Se lava dos veces con tampón fosfocitrato.

#### Tampón fosfocitrato

ácido cítrico 0,1 M 24.3 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M 25.7 ml

Agua destilada 50 ml

pH 5,3

Se sumergen los filtros en la disolución de coloración.

#### Disolución de coloración:

Se disuelven 20 mg de TMB (3,3',5,5'tetrametil-bencidina, de *Sigma*) y 80 mg de DONS (dioctil sulfosuccinato, de *Sigma*) en 10 ml de etanol a 60°C (estos reactivos son sensibles a la luz). Una vez disueltos los reactivos se añade 30 ml de tampón fosfocitrato. Esta disolución se prepara en el momento de usarla.

Se añade 15 µl de peróxido de hidrógeno y se deja desarrollar color. La reacción es muy rápida y para pararla se lava el filtro con abundante agua. Se conserva el filtro seco y en oscuridad o fotografiar.

#### *Método por quimioluminiscencia.*

Se mezclan las soluciones de detección siguiendo las instrucciones del fabricante, con un volumen final suficiente para cubrir completamente la membrana. (0.125 ml/cm<sup>2</sup> membrana). Se seca el exceso de tampón de lavado de la membrana. Se añade el



reactivo de detección en el lado de la membrana con las proteínas, de forma que los reactivos están sujetos a tensión superficial sobre la superficie de la membrana, cubriendo completamente la membrana. Se incuba 1 minuto a temperatura ambiente sin agitación. A continuación se seca el exceso de reactivo de detección y se colocan las membranas, con el lado de las proteínas hacia arriba, en el cassette para el film. Es importante trabajar tan rápido como sea posible y minimizar el retraso entre la incubación de las membranas en el reactivo de detección y la exposición al film. Se apaga la luz y cuidadosamente se pone el film (Hyperfilm-ECL) sobre la membrana, se cierra el cassette y se expone durante 15 segundos. Tras este tiempo, se quita el film e inmediatamente se pone otro nuevo y se cierra el cassette. Según el resultado del primer film se estima el tiempo de exposición del segundo. Este puede variar desde 1 minuto a 1 hora, dependiendo de la cantidad de proteína en la membrana. Si el ruido de fondo es muy grande se puede volver a lavar la membrana durante 10 minutos en tampón de lavado y repetir el proceso, aunque con una significativa pérdida de sensibilidad.

### **3.5.3. EXPRESION DE AIF EN *E. Coli*.**

#### 3.5.3.1. Sistema de expresión de AIF en *E. Coli*.

El sistema pET (*Novagen*) permite la expresión de proteínas recombinantes de origen eucariótico en *E. coli*. Está basado en un sistema dirigido por el promotor T7, originariamente desarrollado por Studier y colaboradores (Moffatt et al, 1986, Rosenberg et al, 1987, Studier et al., 1990). Los genes clonados en los plásmidos de expresión pET se encuentran bajo el control de las señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7. El sistema de expresión se basa en la presencia de una copia cromosómica del gen T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5* en la célula huésped. En este caso se ha utilizado la cepa de *E. coli* BL21(DE3). La expresión se induce mediante la adición de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido), el cual induce T7 RNA polimerasa, que a su vez transcribe el gen inserto en el plásmido. Debido a la alta selectividad y actividad de la T7 RNA polimerasa prácticamente todo el metabolismo celular se utiliza para la expresión proteica del gen clonado.

Por otra parte los vectores de expresión pET pueden contener secuencias que permiten la purificación posterior de la proteína recombinante que se expresa. En este caso el vector pET28a contiene una secuencia cuya expresión junto con el inserto produce una proteína de fusión con cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal.

### 3.5.3.2. Prueba de expresión.

Se transforman células BL21(D3) con plásmido pET28a con inserto. Se siembra en placas Petri con kanamicina (30µg/ml) y se incuba a 37°C. Las colonias se siembran en tubos *Falcon* con 10 ml de LB (10 gr/l triptona, 5 gr/l cloruro sódico, 5 gr/l extracto de levadura) con kanamicina (concentración final 30µg/ml). Se incuban a 37°C y 1ml de estos se inocula a otros tubos Falcon, controlando la densidad óptica hasta 0.8-1. Se añade IPTG a una concentración final 1mM. Recogemos muestras de 50 o 100 µl, se centrifuga a 14000 rpm, y el residuo se resuspende en 10 µl de tampón de electroforesis. Realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida para visualizar la proteína recombinante. Como control negativo utilizamos células BL21(D3) sin plásmido. Como control de la inducción utilizamos células sin IPTG.

### 3.5.3.3. Inducción de la expresión a media escala

A partir de un cultivo en placa Petri se siembra un inóculo de células BL21(D3) con plásmido en un tubo *Falcon* con 10 ml de LB y kanamicina y se incuba en agitación a 37°C. Al día siguiente se inocula 1 ml de este cultivo en botellas con 200 ml de LB y kanamicina y se incuba en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 37°C. Al día siguiente se inoculan 50 microlitros de cultivo en matraces con 1l de LB con kanamicina. Se incuba en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 37°C hasta una densidad óptica entre 0.8 y 1. Se añade IPTG (Isopropil-β-D-galactopiranosido, de *Promega*) a una concentración final 1 mM y se incuba toda la noche en un incubador orbital con agitación a 160 rpm a 18°C.

Recogemos las células por centrifugación a 8000 rpm. Para lavar las células se resuspende el sedimento en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 20 mM y se vuelve a centrifugar a 8000 rpm. Se puede guardar congelado a -80°C.

### **3.5.4. PURIFICACION DE mAIFΔ1-120, mAIFΔ1-351, mAIFΔ1-101, hAIFΔ1-102 Y SUS MUTANTES.**

#### 3.5.4.1. Purificación de mAIFΔ1-120 y mAIFΔ1-351.

Estas proteínas se purificaron en el Amgen Institute and Ontario Cancer Institute de la Universidad de Toronto (Canada). Se expresaron utilizando el vector de expresión pET32 (*Novagen*) en *E. coli*. Las proteínas se guardaron en el siguiente tampón:

Tampón de conservación

Hepes 50 mM, pH 7.9

NaCl 100 mM

EDTA 2 mM

DTT 1 mM

Glicerol 10%

3.5.4.2 Purificación de mAIFΔ1-101, hAIFΔ1-102 y los mutantes hAIFΔ1-102 F310G, hAIFΔ1-102 W483G, hAIFΔ1-102 K177W, hAIFΔ1-102 E314S, hAIFΔ1-102 K177W/E314S y hAIFΔ1-102 P173G

Las proteínas mAIFΔ1-101, hAIFΔ1-102 y sus mutantes hAIFΔ1-102 F310G, hAIFΔ1-102 W483G, hAIFΔ1-102 K177W, hAIFΔ1-102 E314S, hAIFΔ1-102 K177W/E314S y hAIFΔ1-102 P173G se han purificado por cromatografía de afinidad a metales. Esta técnica, también conocida como cromatografía de adsorción a iones metálicos inmovilizados (IMAC, del inglés Immobilized Metal Ion Adsorption Chromatography), se basa en la afinidad que presentan las proteínas con residuos histidina, cisteína y triptófano, expuestos en la superficie, hacia complejos de iones metálicos. En este caso, las proteínas presentan una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal, que se ha añadido a su secuencia mediante el plásmido de expresión pET28a.

El procedimiento consiste en pasar un extracto crudo que contiene la proteína que se quiere purificar a través de una columna rellena con una resina de ácido iminodiacético (grupo quelante) acoplado a sepharosa (matriz), que se ha cargado con un metal de transición formando un quelato. La fuerza de unión de la proteína al complejo depende, principalmente, de la clase de ion metálico utilizado y el pH de los tampones. Los iones metálicos están fuertemente unidos a la matriz y la proteína adsorbida se puede eluir competitivamente, disminuyendo el pH o bien, mediante una molécula que compita por su unión, como el imidazol o la propia histidina.

La purificación se ha realizado según lo detallado a continuación:

Se resuspende el sedimento de células en el siguiente tampón:

Tampón de resuspensión:

Tris 50 mM pH 8 glicerol 10% : 2.4 ml/g células

PMSF 100 mM: 10\*volumen buffer (μl)

Pepstatina A 1 mg/ml: volumen buffer (μl)

Benzamidina 300 mM: 100μl/13g

Leupeptina 0.6 mg/ml: 100μl/13g

FAD, concentración final 1 mM

Se somete a ultrasonicación (ultrasonador MSE-150 de *Branson*) en 5 pulsos de 40W y 45 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos. El extracto obtenido se clarifica por centrifugación dos veces, a 19000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

En este caso, la columna tiene unas dimensiones de 17 x 1.8 cm, con un volumen aproximado de 30 ml. Se rellena con una resina de afinidad a metales (Chelating Sepharose Fast Flow, de *Amersham Biosciences*). Esta resina tiene una capacidad de unión de 12 mg de proteína con cola de histidinas (His6x) de peso molecular 27600 Da, por mililitro de gel.

La resina se prepara mediante el paso a través de la columna de las siguientes disoluciones en el orden indicado:

1º) 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.

2º) 3 volúmenes de ZnSO<sub>4</sub> 0.25 M.

3º) 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.

4º) 10 volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%, KCl 0.4 M.

Se introduce el extracto crudo en la columna, tras lo cual se realizan los siguientes lavados:

1º) 5 volúmenes de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.5M en Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%.

En la purificación de los mutantes de hAIFΔ1-102 es necesario la adición durante este paso de 1 ml de FAD 2 mM, para mantener la máxima unión del grupo prostético.

2º) 3 volúmenes de glicina en Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%.

La elución de la proteína retenida se realiza a través de un gradiente de imidazol entre 0 y 1M en Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%, con el paso de 5 volúmenes de columna.

La columna se regenera mediante el paso de los siguientes reactivos:

- 1º) 5 volúmenes de imidazol 1.5 M.
- 2º) 5 volúmenes de cloruro sódico 0.5 M.
- 3º) 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O.

Se vacía la columna a temperatura ambiente, se deja equilibrar el lecho a temperatura ambiente y se vuelve a rellenar la columna con la resina, de forma que siempre haya partículas en suspensión. Finalmente se pasa a través de la columna H<sub>2</sub>O destilada y 10 volúmenes de etanol 20%.

### 3.5.5. ELIMINACION DE LA COLA DE HISTIDINAS DE mAIFΔ1-101.

El plásmido de expresión pET28a introduce en la secuencia de la proteína, junto con la cola de seis histidinas, una secuencia de reconocimiento para corte proteolítico con trombina. Para la eliminación de la secuencia de histidinas en mAIFΔ1-101 se han utilizado dos métodos:

a) Sistema de adsorción a columna de afinidad de metales (HiTrap Chelating HP de 1ml, de *Amersham Biosciences*) y corte proteolítico de la proteína con trombina (E.C. 3.4.21.5, de plasma bovino, de *Sigma*).

El procedimiento ha sido el siguiente:

La columna (de 1ml) se prepara mediante el paso de las siguientes disoluciones filtradas:

- 1º) 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.
- 2º) 3 volúmenes de ZnSO<sub>4</sub> 0.25 M.
- 3º) 10 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.
- 4º) 10 volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%, KCl 0.4 M.

Se cargan 3 ml de mAIFΔ1-101 (μM). Se lava con 10 volúmenes de Tris-HCl 50 mM pH 8, glicerol 10%. Con una jeringa se inyecta una disolución de trombina (1ml, 20 U/ml). Se incuba 2 horas a temperatura ambiente. Se eluye con Tris-HCl 50mM pH8, glicerol 10%.

Este sistema permite la separación de la proteína proteolizada (eluída) de la proteína que queda sin proteolizar (retenida). La trombina eluye también de la columna, pero como los tiempos de elución son distintos, se separa de la proteína que nos interesa.

Se eluyeron 22 ml, recogiendo en fracciones de 1 ml. La trombina eluye en las primeras fracciones, mientras que AIF eluyó en las fracciones 11-15, conservando unido el grupo prostético FAD.

b) Método de cromatografía líquida FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con columna de filtración en gel Superosa 12.

Con este procedimiento se ha preparado con éxito apoAIF $\Delta$ 1-101 sin cola de histidinas. Se incubaron 300  $\mu$ l de mAIF $\Delta$ 1-101 con una solución de trombina (*Sigma*) 1.25 U/ml, durante una hora a temperatura ambiente. Se inyecta en la columna de filtración en gel Superosa 12 (*Pharmacia*) 200  $\mu$ l de esta solución con mAIF $\Delta$ 1-101. Se establece un flujo de 0.5 ml/minuto para un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8. La trombina eluye en las primeras fracciones, mientras que la proteína, que en estas condiciones pierde el grupo prostético, eluye en el minuto 13.

Se concentraron las fracciones mediante concentradores de 10 KDa de corte (Centricon 10 K, de *Pall*) y se comprobó la ausencia de actividad trombina en la disolución de proteína obtenida.

### **3.5.6. ANALISIS DEL GRUPO PROSTETICO DE AIF POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC )**

La identificación y cuantificación del grupo prostético FAD de AIF se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución usando una columna Vydac C<sub>18</sub>. Se estableció un gradiente lineal 0-100% de acetato amónico 0.1 M, pH 6 y metanol en 40 minutos, con un flujo de 1 ml/min. Se usaron como estándares FMN, riboflavina y FAD. Se obtuvieron sobrenadantes con el grupo prostético de AIF mediante calentamiento a 90°C durante 10 minutos de una muestra de mAIF $\Delta$ 1-120 (1 mg/ml) en Tris-HCl 50 mM a pH 8, mantenida en oscuridad y posterior centrifugación para separar la apoproteína. Se inyectaron en la columna de HPLC diversas alícuotas de estos sobrenadantes. Las flavinas se detectaron a 445 nm.

### **3.5.7. PREPARACION DE APOPROTEINAS Y RECONSTITUCION DE LAS HOLOPROTEINAS**

Las apoproteínas de este trabajo se han preparado mediante dos métodos.

#### 3.5.7.1. Método de diálisis con CaCl<sub>2</sub>

ApoAIFΔ1-120 se preparó según este procedimiento, descrito por Chapman y Reid (Zanetti *et al.*, 1982). Consiste en una diálisis exhaustiva de la proteína, en sucesivos tampones. En primer lugar se utilizó:

Tampón de primera diálisis

Hepes 0.1 M

CaCl<sub>2</sub> 2.5 M

DTT 1 mM

EDTA 0.1 mM

cloruro de guanidinio 0.1 M

glicerol 17% (v/v)

pH 7.5

Tras esta diálisis se concentra la proteína con concentradores Centricon 30 K (*Amicon*) y se somete a una segunda diálisis:

Tampón de segunda diálisis

Hepes 50mM

NaCl 100mM

EDTA 2mM

DTT 1mM

Glicerol 10%

pH 7.9

El rendimiento de esta preparación fue, aproximadamente, un 15%.

#### 3.5.7.2. Método de cromatografía líquida FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) con columna de filtración en gel Superosa 12.

Con este procedimiento se ha preparado con éxito apoAIFΔ1-101. Se inyecta en la columna de filtración en gel Superosa 12 (*Pharmacia*) 200 μl de mAIFΔ1-101. Se establece un flujo de 0.5 ml/minuto para un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8. La proteína, que en estas condiciones pierde el grupo prostético, eluye en el minuto 13.

*Reconstitución de holoAIF*

La reconstitución de la holoproteína se ha llevado a cabo por incubación de la proteína con un exceso de FAD (Flavín-adenín-dinucleótido) (relación molar 1:1000),

posterior precipitación con acetona, resuspensión en Tris-HCl 50 mM pH 8 y repetida ultracentrifugación en membranas de punto de corte 10 K (*Pall*) para eliminar el FAD no unido.

### **3.5.8. ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEINA-PROTEINA DE AIF Y POLIPEPTIDOS MITOCONDRIALES.**

#### **Detección de la interacción proteína-proteína mediante columna de afinidad.**

En primer lugar se abordó este problema mediante la siguiente estrategia:

Unas condiciones de recuperación de las proteínas que interaccionan con AIF consiste en utilizar AIF unida a cola de histidinas, para que quede inmovilizada en una columna de afinidad a metales. Este es el sistema de expresión que se ha utilizado para obtener la proteína recombinante, por lo que se ha utilizado mAIF $\Delta$ 1-101 para tratar de unir a sus parejas redox. Para ello se ha utilizado el sistema *Profound pull-down polyHis protein:protein interaction kit* (*Pierce*), incubando AIF durante una hora en la columna de afinidad junto con distintos extractos mitocondriales: espacio intermembrana (apartado 3.3.3) y extracto mitocondrial total (apartado 3.3.4). Tras sucesivos lavados se eluye con una concentración 1M de imidazol y se analizan las distintas fracciones por electroforesis desnaturante al 10% y Western blot. En este análisis se utiliza proteína sin incubación con extracto mitocondrial como control positivo de la elución y extracto mitocondrial sin incubar con AIF como control negativo.

#### **Detección de la interacción proteína-proteína mediante entrecruzamiento químico.**

En segundo lugar se trató de realizar un entrecruzamiento (del inglés “crosslinking”) químico en soluciones concentradas de extracto mitocondrial total. Se utilizaron dos agentes para el entrecruzamiento: iodoacetamida y EDC (N-etil-N-[dimetilaminopropil]carbodiimida) 8 mM durante 24 horas a 4°C.



### 3.5.9. ESPECTROFOTOMETRIA MOLECULAR UV-VISIBLE.

Se utilizaron los espectrofotómetros Uvikon 860 y 942 de *Kontron Instruments*.

La concentración de proteínas se calcula aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$\text{absorbancia} = l \cdot \epsilon \cdot c$$

donde  $l$  es la distancia que atraviesa la luz en la cubeta (cm),  $\epsilon$  el coeficiente de extinción a la longitud de onda en la que se mide la absorbancia ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) y  $c$  la concentración (mM).

#### 3.5.9.1. Determinación de tioles libres (L-cisteína) y contenido total de grupos tiol.

Para la determinación del contenido de grupos sulfidrilo libres en la proteína se ha empleado el método de Ellman (Ellman GL, 1959), que mide el nitrotiobenzoato (NTB) producto de la reacción de un tiol con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato-Nbs2) (DTNB). El anión NTB presenta un coeficiente de extinción molar a 412 nm de  $13.88 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

En este método se ha utilizado una concentración de AIF  $1.17 \mu\text{M}$  en el siguiente tampón a pH 8:

#### Tampón de reacción

Tris/HCl 0.1 M

EDTA 0.01 M

cloruro de guanidinio 6 M

En lugar de cloruro de guanidinio 6 M en el tampón de reacción se puede usar urea 8M o dodecilsulfato sódico (SDS) 1%. En este caso se utilizó cloruro de guanidinio 6M por obtener mejor resultado.

El reactivo de Ellman se prepara con DTNB 0.01 M en tampón fosfato sódico 0.05 M a pH 7. En el espectrofotómetro se mide el cambio de absorbancia a 412 nm tras añadir 10  $\mu\text{l}$  de reactivo DTNB a la mezcla de reacción (400  $\mu\text{l}$ ). El cálculo del n° de tioles libres en la proteína, dado que cada mol de DTNB que reacciona produce un mol de NTB, se realiza según la siguiente expresión:

$$[\text{DTNB}]_{\text{consumido}}/[\text{AIF}] = n^{\circ} \text{ tioles libres}$$

El contenido total de grupos tiol se confirmó en condiciones desnaturalizantes y reductoras, según el método de Cavallini *et al.* (1966).

### 3.5.9.2. Determinación del coeficiente de extinción de Flavoproteínas.

Se realiza mediante la valoración precisa de los grupos prostéticos liberados. Esta cuantificación suele hacerse mediante el uso de coeficientes de extinción conocidos de los grupos prostéticos, y con el conocimiento previo de la estequiometría apoproteína:grupo prostético.

Se mide con precisión el espectro de absorción en el visible de la muestra de proteína. En un vial de 1.5 ml de cierre ajustado y cubierto con papel de aluminio, se calienta la muestra de AIF en Tris-HCl 50 mM pH 8 a 90°C durante 5 minutos con baño de agua. Se centrifuga a temperatura ambiente para separar la apoproteína que precipita del cofactor que queda en el sobrenadante. El grupo prostético se valora por espectrofotometría, una vez fría la muestra. Como la concentración es la misma, la razón de absorbancias de los máximos de mayor absorción en el visible de la proteína y de su grupo prostético es igual, por la ley de Beer-Lambert, a la de sus coeficientes de extinción, según la expresión:

$$\frac{\Delta A_{proteína}}{\epsilon_{proteína}} = \frac{\Delta A_{g.p.}}{\epsilon_{g.p.}}$$

de esta relación se puede conocer el valor de  $\epsilon_{proteína}$  considerando el valor de  $\epsilon_{450}$  de FAD 11.3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Whitby, 1953), en el tampón utilizado.

### 3.5.10. ESPECTROS DE EMISION DE FLUORESCENCIA.

Para realizar los espectros de emisión de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro SMF 25 de *Kontron Instruments* termostatizado con un baño circulante Frigiterm 6000382 de *Selecta*. Los espectros se registran con una velocidad de barrido 50 nm/min. Las medidas de emisión de fluorescencia se han realizado con una concentración de proteína que oscilan entre 6 y 22 μM y en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.

Las cubetas, con las cuatro caras transparentes, tienen 1 cm de paso de luz. El espectro de la cubeta con el tampón se restó electrónicamente del espectro de la muestra.

Las condiciones de los espectros realizados en este trabajo son:

Longitud de onda de excitación (nm)	Rango del espectro de emisión (nm)	Voltaje aplicado (mV)
280	300-400	300
450	480-580	600

### 3.5.11. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR.

Los espectros de dicroísmo circular de las proteínas se han registrado en los espectropolarímetros Lasco 710 y Aviv 62A DS, a temperatura ambiente y en una cubeta circular de 1 cm de paso de luz.

### 3.5.12. ESPECTROSCOPIA DE MASAS.

La masa molecular de mAIFΔ1-120 se midió mediante un sistema de de ionización por laser MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization system) de *Applied Biosystems* en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. Se usó ácido sinapínico como matriz y albúmina bovina como proteína estándar. Para el análisis experimental se mezcló mAIFΔ1-120 (1.8 mg/ml) con ácido sinapínico (10 mg/ml en H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 1:1 + 0.3% ácido trifluoroacético), usando una relación 1:6.

### 3.5.13. ANALISIS DE ELEMENTOS POR ICP-MS.

El análisis de metales en mAIFΔ1-120 se llevó a cabo en la Sección de Análisis Elemental y Molecular de los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona, por la técnica de plasma de inducción acoplado con un espectrómetro de masas (ICP-MS) Perkin Elmer ELAN 6000 (*PerkinElmer Life Sciences*), en condiciones estándar. Calibrado con seis patrones preparados con HNO<sub>3</sub> 1%, utilizando rodio como patrón interno. La determinación semicuantitativa de calcio se llevó a cabo en un analizador multicanal Thermo Jarred Ash 61E Polyscan según los protocolos estándar.

### 3.5.14. DETERMINACION DE LOS POTENCIALES DE OXIDACION-REDUCCION.

Determinación por medición potenciométrica con un potenciómetro digital *Crison 2002*. Las titulaciones redox en el visible se realizaron en condiciones anaeróbicas. Se realizaron distintas adiciones a la solución proteica (10  $\mu$ M) de varios mediadores que cubren un rango de potencial de +11 mV a -450 mV (1mM) (Bes *et al.*, 1999) en 50 mM Bis-Tris para pH 6.5 o 100mM Tris-HCl para pH 7.5 y 9. La proteína se reduce mediante la inyección de pequeños volúmenes de ditionito sódico en condiciones anaerobicas. Se realizaron los espectros en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-260*. El potencial de reducción se determinó siguiendo los cambios de absorbancia a 450 nm. La determinación se llevó a cabo en el Instituto de Tecnología Química e Biológica (Portugal), bajo la dirección de la Dra. Ligia Teixeira.

## 3.6. MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA.

### 3.6.1. MEDIDA DE CINETICAS EN ESTADO ESTACIONARIO

La Unidad Internacional de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima capaz de transformar un micromol de sustrato en un minuto.

Se llama actividad específica a la actividad enzimática por miligramo de proteína. El número de recambio de un enzima se define como los moles de sustrato transformados por cada mol de enzima en un minuto.

Las actividades enzimáticas estudiadas en este apartado transcurren en dos etapas. En la primera etapa se forma rápidamente el complejo enzima-sustrato (ES) y en la segunda etapa, paso limitante de la velocidad de reacción, el complejo se transforma lentamente en producto. El esquema cinético es:

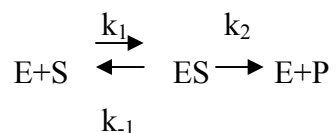


Figura 2.5. Esquema cinético de las reacciones enzimáticas en función de las constantes cinéticas individuales de cada etapa donde  $k_1$  es la velocidad de formación del complejo ES;  $k_{-1}$  es la velocidad de su disociación y  $k_2$  es la velocidad de conversión del complejo ES en producto.

Estas reacciones cumplen la hipótesis del estado estacionario que se produce cuando la velocidad de conversión del complejo enzima-sustrato en producto ( $k_2$ ) es comparable a la velocidad de su disociación ( $k_{-1}$ ) y por tanto, la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante durante el experimento.

Las actividades enzimáticas se pueden expresar a través de diferentes constantes:

Constante de Michaelis-Menten: ( $K_m$ )

Es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima y se define por el cociente:

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Constante catalítica: ( $k_{cat}$ )

Se define como los moles de sustrato transformados por cada mol de enzima en un minuto a saturación de sustratos.

Eficiencia catalítica:

Constante aparente de velocidad de segundo orden que se define como el cociente de los anteriores parámetros cinéticos ( $k_{cat} / K_m$ )

### **Cálculo de los parámetros cinéticos para las actividades en estado estacionario**

Los valores de la variación de la absorbancia se representan frente a los valores crecientes de concentración de sustrato. Los datos se ajustan a la ecuación:

$$v = v_{max} [S] / K_m + [S]$$

con el programa KaleidaGraph 3.0, donde  $v$  es el valor de la variación de absorbancia en un minuto a cada concentración de sustrato ( $[S]$ ). Del ajuste de datos cinéticos se obtienen los valores de  $v_{max}$ , con el que se calcula la  $k_{cat}$  de la enzima ( $k_{cat} = v_{max} / [E]_t$ ; donde  $[E]_t$  es la concentración total de la enzima en la cubeta) y el valor de  $K_m$ .

### 3.6.1.1. Actividad diaforasa

Se denomina actividad diaforasa a la capacidad que tienen las enzimas para reducir sustratos artificiales *in vitro* en presencia de  $\beta$ -NADH o  $\beta$ -NADPH. Los compuestos más utilizados son el DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) para la transferencia de dos electrones y el ferricianuro y las sales de tetrazolio para transferencias de un electrón. En la mayoría de las enzimas con FAD la transferencia de electrones tiene lugar en dos etapas: del NAD(P)H a la enzima y de esta al aceptor.

#### 3.6.1.1.1. Medida con DCPIP.

Cuando se utiliza el 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) (Figura 3.6) como aceptor de electrones de la actividad diaforasa, el color azul del DCPIP oxidado desaparece al reducirse. Se emplea la disminución de absorbancia a 620 nm para cuantificar dicha reducción. El coeficiente de extinción molar del DCPIP oxidado a dicha longitud de onda es  $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , mientras que la forma reducida no absorbe.

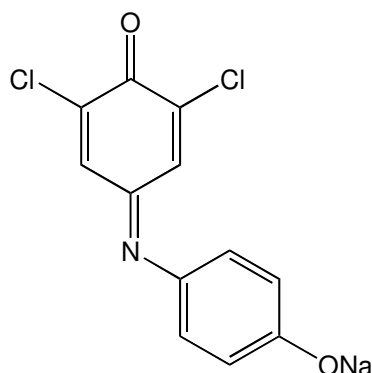
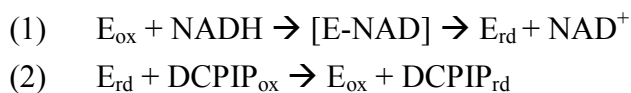


Figura 3.6. Estructura química del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP).

La reacción que se produce, en el caso de aceptores de dos electrones como el DCPIP, corresponde al siguiente esquema simplificado:



Reactivos	cubeta muestra ( $\mu$ l)	cubeta referencia ( $\mu$ l)
DCPIP 0.19 mM	500	500
NAD(P)H 2 mM ( <i>Sigma</i> )	100	100
Tris-acetato 50 mM pH 8	375	400
Muestra enzimática (~20 $\mu$ M)	25	-

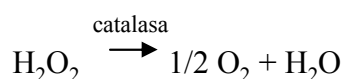
## 3.6.1.1.2. Medida con NBT

La actividad oxidoreductasa de AIF recombinante (AIF  $\Delta$ 1-120) se ha determinado mediante el método espectrofotométrico de reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT= 2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'[3,3'-dimetoxi-4,4'difenilén] cloruro de ditetrazolio, *Sigma*) (Pez-Huertas et al., 1999) midiendo un aumento de la absorbancia a 560 nm. Las condiciones del ensayo han sido las siguientes, en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 2 mM NBT, 20-40  $\mu$ M de proteína recombinante o cantidades variables de muestra, en el caso de los sobrenadantes de mitocondrias. Para comenzar la reacción se añade 1 mM de NADH. La actividad de AIF es proporcional al incremento de absorbancia a 560 nm durante el primer minuto. Como control se ha utilizado la enzima L-malato deshidrogenasa. Se ha estudiado la actividad NBT reductasa presente en muestras obtenidas tras la apertura del poro de transición de permeabilidad con diferentes inductores: ion calcio e ion arsenito. También se ha determinado en muestras procedentes de la inhibición de apertura del poro con ciclosporina A, en muestras obtenidas por shock osmótico en Tris-HCl (50 mM) a pH 8 y en muestras control sin inductor.

Condiciones de reacción (según orden de adición de los reactivos):

Reactivos	cubeta muestra ( $\mu$ l)	cubeta referencia ( $\mu$ l)
Tris/HCl 50 mM pH 8	100-x	100
NBT (50 mg/ml)	3.2	-
AIF (20-40 nmol/ml)	x	-
NADH (23.8 mM)	4.1	-

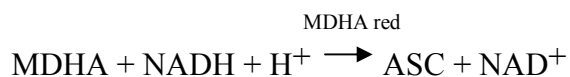
Esta reacción se ha estudiado en presencia de cantidades variables de superóxido dismutasa (SOD, *Sigma*), ya que la inhibición de esta reacción en presencia de esta enzima representa una evidencia de que transcurre a través de radicales superóxido (Picker S.D. y Fridovich, 1984; Perez-Huertas *et al.*, 1999) y la combinación de SOD y catalasa. La eliminación de radical superóxido por la superóxido dismutasa es una reacción reversible en ciertas condiciones. La reacción inversa se elimina mediante la catalasa, ya que cataliza la siguiente reacción:



por tanto, la combinación de ambas enzimas representa un método de eliminación total del radical superóxido del medio.

### 3.6.1.2. Actividad monodehidroascorbato reductasa

La actividad monodehidroascorbato reductasa se determina espectrofotométricamente por el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH por el monodehidroascorbato (MDHA):



El MDHA puede ser generado por diferentes sistemas: a) ascorbato oxidasa y 2.5 mM ascorbato, b) sistema generador de superóxido (0.1 mM xantina y xantina oxidasa) y 2.5 mM ascorbato y catalasa, c) 0.1 mM peróxido de hidrógeno, 2.5 mM ascorbato y ascorbato peroxidasa de espinaca y d) una mezcla de 7.5 mM ascorbato y 7.5 mM dehidroascorbato.

Para este ensayo se ha elegido como sistema generador de MDHA el d) (Lumper *et al.*, 1967), con algunas modificaciones.

Condiciones de reacción:

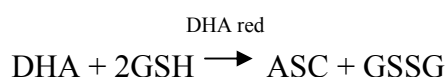
Para un volumen final de 400  $\mu\text{l}$ :



Tris-HCl 50 mM 10% glicerol 1mM EDTA pH 7.5	248 $\mu$ l
Ascorbato 60 mM	50 $\mu$ l
Dehidroascorbato 60 mM	50 $\mu$ l
extracto enzimático ( AIF 18-20 $\mu$ M)	2 $\mu$ l

Tras 2 minutos de incubación se añade NADH 0.8 mM (50  $\mu$ l) y se mide el descenso de absorbancia a 340 nm.

El MDHA puede desproporcionar espontáneamente a dehidroascorbato (DHA) y ascorbato (ASC). El DHA se convierte en ASC en una reacción catalizada por DHA reductasa:



Donde GSH es la glutatona reducida y GSSG es su forma oxidada con formación de un puente disulfuro.

### 3.6.1.3. Actividad oxidasa.

Se denomina actividad oxidasa a la capacidad que tiene AIF de reducir al oxígeno molecular en presencia de NAD(P)H. Se mide espectrofotométricamente por el descenso de absorbancia a 340 nm. cuando el NAD(P)H se oxida a NAD(P)<sup>+</sup>. El coeficiente de extinción del NAD(P)H a 340 nm es 6.22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Las condiciones finales del ensayo son:

Volumen final: 400 microlitros. En la mezcla de reacción:

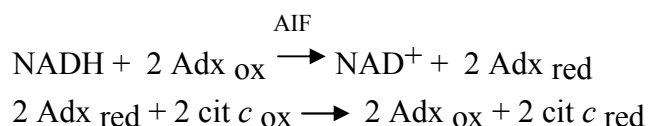
Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
Tris/HCl 50 mM, pH 8	400-x
NAD(P)H (24 $\mu$ M)	x
AIF (75 $\mu$ M)	3

En aquellos casos en los que se estudia la producción de  $O_2^-$ , el proceso se analiza en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), añadiendo cantidades variables de la misma.

La producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en función del tiempo por incubación de una solución de AIF con NADH (0.6 mM) a 20 °C, se determina utilizando el ensayo de la peroxidasa con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y dioctilsulfosuccinato.

#### 3.6.1.4. Actividad adrenodoxina reductasa.

Se ha observado que existe una pequeña transferencia electrónica entre AIF y la adrenodoxina (Adx). No se observa transferencia electrónica con ferredoxina.



La reacción general es la siguiente:



Condiciones de reacción:

Reactivos	cubeta muestra ( $\mu\text{l}$ )	cubeta referencia ( $\mu\text{l}$ )
Tris/HCl 50 mM pH 8	400-x	400
citocromo <i>c</i> 7.5 mg/ml	50	50
NADH (30 mM)	50	50
AIF (18-20 nmol/ml)	2	-
Adx (1.1 mmol/ml)	x	-

#### 3.6.1.5. Actividad citocromo *c* reductasa.

La actividad citocromo *c* reductasa de AIF se refiere a la capacidad de AIF de reducir citocromos de tipo *c*.

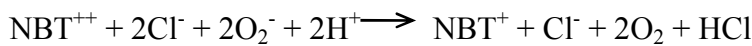
La reducción del citocromo *c* se sigue espectrofotométricamente por el aumento de absorción a 550 nm. Se utiliza como coeficiente de extinción la diferencia entre los coeficientes del citocromo *c* reducido y oxidado,  $20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Massey, 1959)

Reactivos	cubeta muestra ( $\mu\text{l}$ )	cubeta referencia ( $\mu\text{l}$ )
Tris-HCl 50 mM, pH 8	798-x	900
citocromo <i>c</i> (7.5mg/ml)	100	100
NADH 2mM	x	-
AIF (18-20 $\mu\text{M}$ )	2	-

### 3.6.1.6. Actividad de producción de superóxido.

Se ha calculado según lo descrito por Auclair y Voisin (1986).

En soluciones acuosas, las reacciones que generan  $\text{O}_2^-$  producen la reducción de NBT a monoformazan de acuerdo con la siguiente ecuación:



La reducción del NBT compite con la dismutación de  $\text{O}_2^-$  de la siguiente forma:

$$v_1 = k_1 [\text{O}_2^-]^2$$

$$v_2 = k_2 [\text{O}_2^-] [\text{NBT}]$$

El fuerte incremento en la reducción de NBT a pH alto proviene del descenso en la constante de dismutación de  $\text{O}_2^-$  ( $k_1$ ) para la reacción (1), mientras que la constante ( $k_2$ ) para la reacción (2) solo está ligeramente afectada.

La concentración de  $\text{O}_2^-$  en un sistema puede ser estimado a partir de la concentración de NBT reducido según la siguiente ecuación:

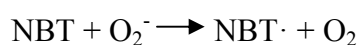
$$[\text{O}_2^-] = 1/((1/(2 \times [\text{NBT}]_r)) - (K \times [\text{NBT}]_t))$$

siendo  $[\text{NBT}]_r$  la concentración de NBT reducido,  $[\text{NBT}]_t$  la concentración de NBT total presente en la mezcla de reacción y  $K$  el cociente entre  $k_1$  y  $k_2$ . Esta ecuación solamente es válida cuando la reducción de NBT compite con la dismutación de  $\text{O}_2^-$ .

En este caso, a pH 8 la K se ha calculado por interpolación de los valores de  $k_1$  y  $k_2$  a partir de la tabla1 del citado artículo, resultando  $K= 1.828$ , siendo  $k_1= 80000$  y  $k_2= 43750$ . La  $[NBT]_t$  en la mezcla de reacción en este caso ha sido 1.957 mM.

En soluciones acuosas tamponadas a pH cercano al neutro, el coeficiente de extinción molar en el rango sobre los 550 nm es  $15000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el monoformazán y  $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el diformazán, el cual es relativamente insoluble en soluciones acuosas.

El paso inicial para la formación de monoformazan vía reducción de NBT por  $O_2^-$  ocurre a través de un proceso de transferencia de un electrón de acuerdo con la siguiente ecuación:



### 3.6.1.7. Actividad DTNB reductasa.

Este ensayo se ha utilizado para estudiar la implicación de residuos de cisteína como posibles centros redox implicados en transferencia electronica. Se ha llevado a cabo según Ohnisi *et al.*,1994 en condiciones anaerobicas a 25°C en una cubeta con un volumen de 1 ml.

Reactivos
Fosfato sódico 50 mM pH 7
EDTA 0.5 mM
0.5 mM NADH
0.02% BSA
DTNB 0.4 mM
AIF 18 $\mu$ M

Se sigue el incremento de absorbancia a 412 nm, correspondiente a la producción de anión nitrobenzoato, cuyo coeficiente de extinción a esta longitud de onda es  $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.6.1.8. Estudio de la actividad redox de AIF en presencia de Hsp70.

Se ha estudiado la actividad redox de AIF para la transferencia de un electrón y de dos electrones (véase Materiales y métodos 2.6.1.1), mediante los ensayos con NBT y DCPIP, en presencia de Hsp70, una proteína de choque térmico que inhibe la

capacidad apoptogénica de AIF (Ravagnan *et al.*, 2001). Se utilizó la proteína Hsp27 como control, ya que esta proteína no afecta a la actividad apoptogénica de AIF. Se estudiaron las siguientes relaciones molares AIF:Hsp70/27: 1:1, 1:2.5 y 1:5.

### 3.6.2. MEDIDA DE CINÉTICAS RÁPIDAS.

#### 3.6.2.1. Cinéticas de mezcla rápida con flujo detenido (Stopped-Flow).

La técnica de flujo detenido fue desarrollada a partir del método de flujo continuo y el sistema empleado se basa en el descrito por Gibson (Gibson, 1969).

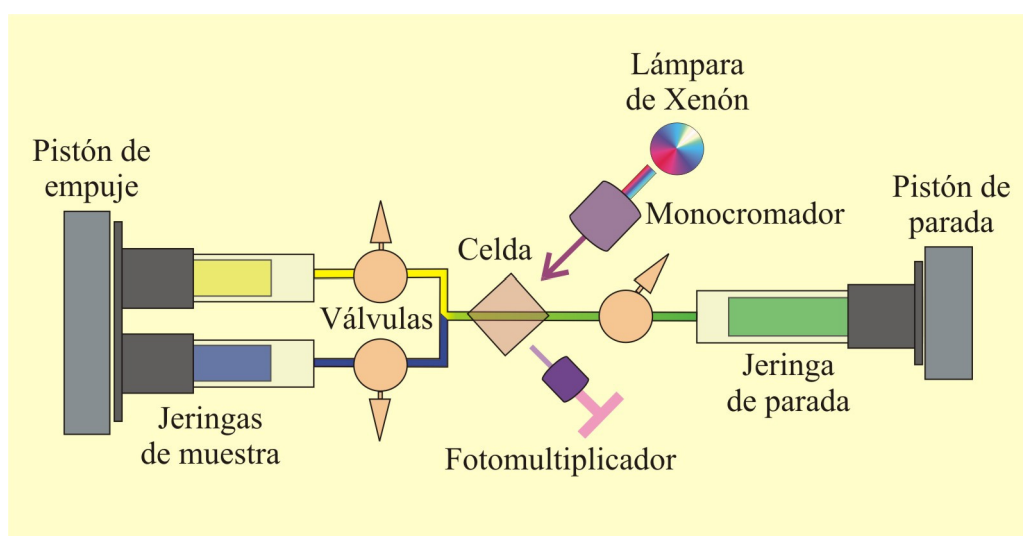


Figura 2.7. Esquema del aparato de flujo detenido.

Las medidas de velocidad de transferencia de electrones entre AIF y NADH se realizaron en anaerobiosis en un aparato de mezcla rápida con flujo detenido modelo SX.17MV de *Applied Photophysics Ltd.* conectado a un ordenador *5000Acorn*. Los reactivos pasan en un momento dado de las jeringas a la cámara de mezcla, donde está el punto de observación. La mezcla empuja el émbolo de una tercera jeringa que está provista de un freno rígido que detiene bruscamente el flujo y que acciona también el aparato de registro. En este momento el detector mide las variaciones producidas en la mezcla estacionaria, durante cierto período de tiempo, en el punto de observación (Figura 2.7).

Es muy importante que el tiempo de mezcla y la llegada de la mezcla al punto de observación sea extremadamente corto en relación con el tiempo en que transcurre la

reacción que se investiga, ya que de otra forma la parte inicial de la reacción se perdería en el tiempo muerto de medida del aparato. Esto implica un rápido flujo de los reactivos desde las jeringas impulsadas por aire comprimido. Además, el método requiere de un medio de detección con un tiempo de respuesta muy corto por lo que se utilizan normalmente métodos espectrofotométricos (detectores UV-vis, de polarización y fluorescencia).

El tiempo de medida varía en función de la velocidad del proceso, registrándose la señal durante un tiempo superior en al menos cuatro veces al de la vida media del proceso.

### Preparación de muestras en anaerobiosis

Se utiliza un tren anaeróbico conectado a una bomba de vacío y a una botella de gas argón libre de oxígeno que fluye a través de una columna de catalizador para eliminar las trazas de oxígeno.

Las muestras se preparan en unos tubos especiales de vidrio, diseñados para tal fin, que disponen de una llave de paso en cada extremo, denominados tonómetros. Dichos recipientes tienen un extremo inferior que se adapta a la entrada de las jeringuillas del aparato con flujo detenido y un extremo superior que se conecta al tren de anaerobiosis. Por medio de ciclos sucesivos de argón y de vacío se consiguen condiciones anaeróbicas en el interior de dichos tonómetros en los que se encuentran las muestras.

### Medida de las reacciones

Al principio de cada experimento, las jeringuillas del aparato de mezcla rápida con flujo detenido se llenan con una disolución de ditionito sódico saturada, en anaerobiosis, y se vacían, mediante disparos, hasta tres veces sucesivas, para eliminar las trazas de oxígeno. Después se limpian, también tres veces, con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8 anaeróbico para eliminar el ditionito. A continuación se llenan con las muestras.

La reacción entre AIF oxidada y NADH se estudia mediante la disminución de absorbancia a 450 nm debida a la reducción de AIF.

### Ajuste y obtención de los parámetros cinéticos

Los datos cinéticos que se obtienen en cada experimento, a unas determinadas concentraciones de las especies en la mezcla, se analizan mediante el programa SX.18MV software de *Applied Photophysics* en un ordenador *Arcon 5000* ajustándose a ecuaciones mono- o bi-exponenciales, dependiendo de las fases que contenga, de la forma:

$$y = A \cdot e^{-kt} + C \quad \text{ó} \quad y = A_1 \cdot e^{-k_1t} + A_2 \cdot e^{-k_2t} + C$$

De esta manera se obtienen los valores de una o varias constantes de pseudo-primer orden denominadas constantes observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) que pueden englobar procesos de asociación y/o transferencia de electrones en la pareja redox y cuyas unidades vienen dadas en  $s^{-1}$ . Es necesario señalar que no necesariamente corresponden a las constantes cinéticas de los procesos moleculares, pero dada la dificultad del cálculo de éstas, son los valores comúnmente utilizados.

#### **3.6.3. FOTORREDUCCION MEDIANTE DEAZARIBOFLAVINA.**

El donador de electrones utilizado fue el sistema 5-deazariboflavina (5-RfH)/EDTA con el fin de reducir a AIF mediante fotorreducción controlada.

El poder reductor del sistema se consigue mediante un haz de luz halógena incidente sobre la cubeta que produce la excitación de la 5-deazariboflavina hasta su estado triplete ( $^3\%$ -dRf), el cual es extinguido por un donador de electrones o átomos de hidrógeno (en nuestro caso EDTA, aunque se pueden utilizar otros agentes reductores como metionina o semicarbácida). Se produce así el estado reducido de un solo electrón (semiquinona) de la 5-deazariboflavina (5-dRfH•) y una especie radical en menos de 1  $\mu$ s. En el caso del EDTA, este radical es inestable y en menos de 1 ms sufre una serie de reacciones incluyendo la descarboxilación y fragmentación hasta generar productos estables y que no afectan a la reacción que queremos medir.

El procedimiento consiste en añadir a una cubeta especial para anaerobiosis 5  $\mu$ l de dRfH, 150  $\mu$ l de EDTA 1mM y 850  $\mu$ l de AIF 30  $\mu$ M. A continuación se realizan 6 ciclos de vacío-argón para que el sistema sea anaeróbico. En el detector de diodos se realiza el primer espectro entre 340-750 nm, que corresponde a la proteína en su estado oxidado. Después se ilumina la cubeta durante 30 segundos y se realiza otro espectro.

Este último paso se llevará a cabo hasta que el espectro no cambie. Este último espectro corresponde al estado reducido de la proteína.

Con los datos obtenidos se representan los valores para cada espectro realizado a 462 vs. 590 nm, obteniéndose dos rectas cuyo punto de corte representa el 100% de estado semiquinona de la proteína. Esto nos permite calcular qué porcentaje de semiquinona tiene la proteína.



## *4. RESULTADOS*



**4.1 CARACTERIZACION  
REDOX DE AIF (APOPTOSIS  
INDUCING FACTOR) DE  
RATON.**

## **4.1 CARACTERIZACION REDOX DE AIF (APOPTOSIS-INDUCING FACTOR) DE RATON.**

La gran mayoría de las flavoproteínas descritas hasta el momento son enzimas (flavoenzimas). Dentro del grupo de las flavoenzimas más del 95% han sido clasificadas como óxido-reductasas, y son de extrema importancia en el metabolismo de cualquier organismo vivo. El porcentaje restante de flavoproteínas que no son enzimas corresponde a las proteínas transportadoras de electrones, tales como las flavodoxinas, y a las flavoproteínas sensoras, cuyo estado redox viene regulado por factores ambientales (luz, oxígeno, voltaje)

La proteína mAIF  $\Delta$ 1-120 se purificó según se describe en el apartado 3.5.4.1., y con ella se llevó a cabo el trabajo de caracterización.

### **4.1.1. MASA MOLECULAR DE mAIF $\Delta$ 1-120.**

Se calculó la masa molecular de mAIF $\Delta$ 1-120 mediante cromatografía de filtración en gel, resultado un peso molecular de 57 kDa, la cual corresponde con la masa molecular teórica (57046 Da), indicando que, a concentración salina cercana a las fisiológica (200 mM NaCl) mAIF $\Delta$ 1-120 es un monómero. Este resultado se confirmó por análisis de espectroscopia de masas (ver Materiales y métodos, apartado 2.5.12). En cambio, el peso molecular aparente determinado por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (ver Materiales y métodos, apartado 3.5.1.1) es 67.5kDa, aproximadamente 10kDa mas de lo esperado. Este comportamiento migratorio ha sido descrito para otras proteínas, entre las cuales se encuentran las ferredoxinas (Böhme y Schrautemeier, 1987).

### **4.1.2. ANALISIS DEL CONTENIDO DE METALES.**

El contenido en metales de mAIF $\Delta$ 1-120 se estudió mediante espectroscopía de masas por plasma de inducción acoplado (MS-ICP) (ver apartado 3.5.13). No se encontraron cantidades significativas de metales, habiendose determinado  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

#### **4.1.3. UNIÓN A GRUPO PROSTÉTICO.**

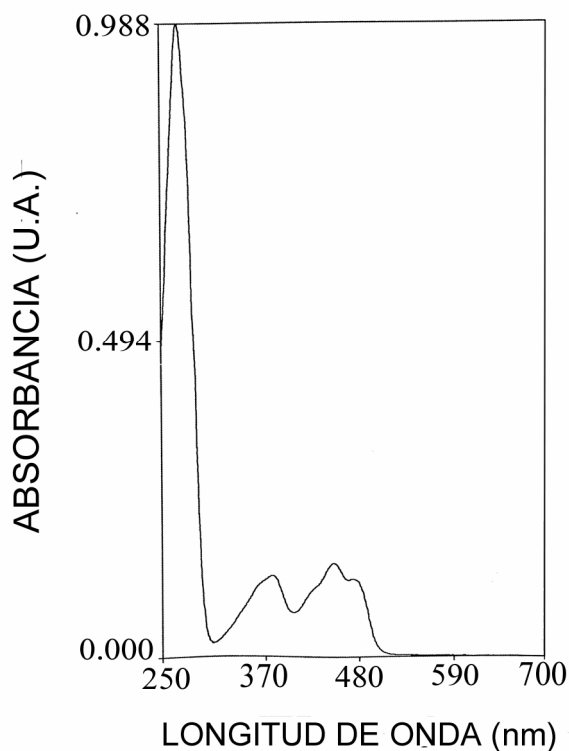
Se ha identificado la presencia de FAD (Flavin-adenín-dinucleótido) como único grupo prostético presente en mAIF $\Delta$ 1-120, con unión no covalente y con una relación molar 1:1, mediante HPLC (ver apartado 3.5.6)

#### **4.1.4. CONTENIDO DE GRUPOS TIOL ACCESIBLES.**

mAIF $\Delta$ 1-120 tiene 3 cisteínas en su secuencia (ver apartado 1.3.2), y se determinó el contenido de 3.2 grupos tiol accesibles por molécula por derivatización con el reactivo de Ellman (ver apartado 3.5.9.1). El contenido total de grupos tiol se confirmó tras el desplegamiento con 8 M de urea (condiciones desnaturalizantes) y en presencia de BH<sub>3</sub> (condiciones reductoras) (ver apartado 3.5.9.1). Este resultado sugiere que ninguna de estas cisteínas contenidas en la secuencia aminoacídica de AIF forma puentes disulfuro.

#### **4.1.5. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS.**

El espectro de absorción UV-VIS de AIF (Figura 4.1) muestra las características típicas de un espectro oxidado de flavoproteína con FAD, con máximos en el visible a 378 nm y 450 nm y un hombro a 467 nm.

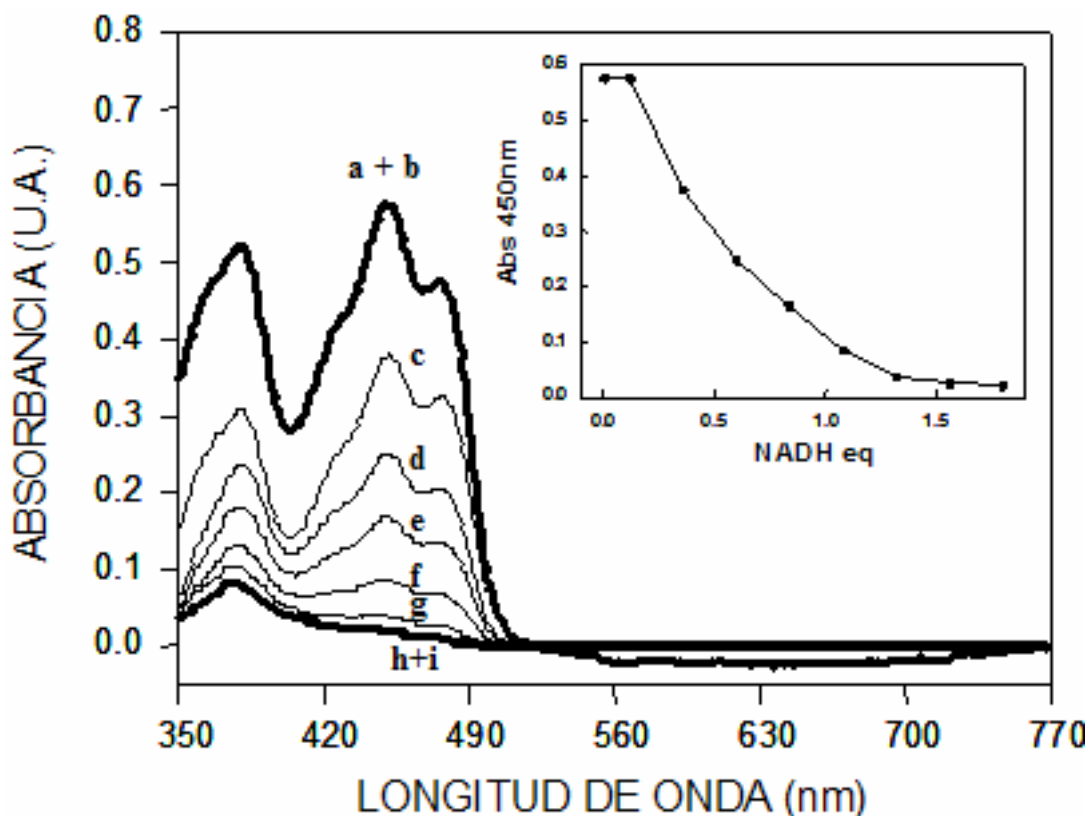


**Figura 4.1.** Espectro de absorción de mAIFΔ1-120. La concentración de proteína es 13μM.

La relación  $A_{270 \text{ nm}}/A_{450 \text{ nm}}$  es 7 en las preparaciones puras. Se calculó el coeficiente de extinción para AIF oxidada a 450 nm resultando  $12.12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (ver Materiales y métodos, apartado 2.5.9.2)

#### **4.1.6. REACCIONES DE TRANSFERENCIA ELECTRONICA ENTRE NAD(P)H y AIF.**

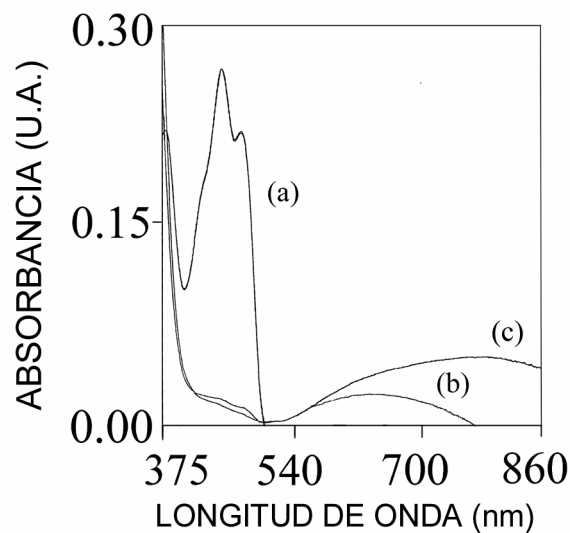
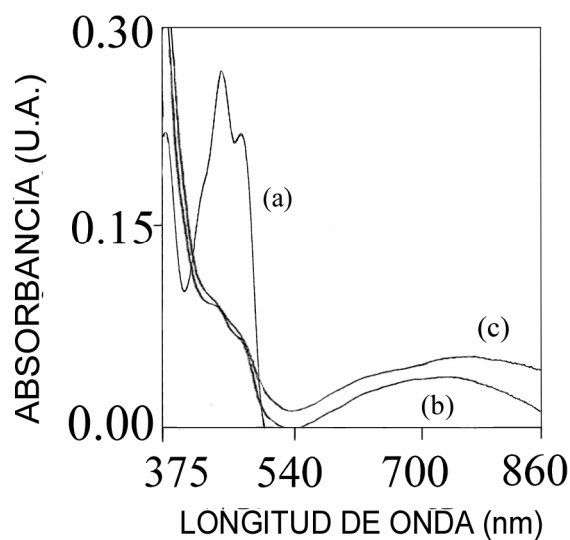
La adición de una cantidad equimolecular de NADH a mAIFΔ1-120 en condiciones anaerobicas (ver apartado 3.6.2.1) produce la reducción completa de la flavina sin detectar, en las condiciones del estudio, formación del intermediario semiquinona (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Titulación anaeróbica de mAIFΔ1-120 con NADH. La línea superior (a) muestra el espectro del enzima oxidado (47  $\mu$ M) antes de la adición de 0.12 (b), 0.35 (c), 0.59 (d), 0.83 (e), 1.07 (f), 1.31 (g), 1.57 (h) y 1.79 (i) equivalentes de NADH/FAD. El gráfico insertado muestra la absorbancia a 450 nm frente a los equivalentes de NADH añadidos.

Cuando se realiza esta misma reducción con NADPH se obtienen curvas de titulación similares. En ambos casos, los cambios espectrales son similares a la reducción de mAIFΔ1-120 con ditionito. La forma reducida de AIF es estable durante varias horas, y la exposición de la muestra al aire no conduce a la aparición inmediata del espectro de AIF oxidada.

Tras la adición a mAIFΔ1-120 de un exceso molar creciente de NADH o NADPH se ha observado la aparición de bandas a longitudes de onda larga (Figura 4.3). Estas absorbancias a longitudes de onda larga exhiben el color azul y verde descritos para complejos de transferencia de carga en otras proteínas (Ahmed y Claiborne, 1989) y se muestran también estables a 25°C durante varias horas, incluso en contacto con el oxígeno del aire. Por analogía con otras flavoproteínas (Ahmed y Claiborne, 1989) estas absorbancias a longitudes de onda larga corresponden probablemente a complejos de transferencia de carga entre FAD reducido y el nucleótido  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NAD(P)}^+$  fuertemente unido a la proteína.

**A****B**

**Figura 4.3.** Titulación anaeróbica de mAIFΔ1-120 con un exceso de NAD(P)H. A: Cambios observados a longitudes de onda larga entre AIFΔ1-120 (22 μM) oxidada (a) y después de la adición de NADH (b y c; exceso molar NADH/AIF 3:1 (b) y exceso molar 6:1 (c), con máximos a 637 nm y 774 nm, respectivamente). B, análoga a A, usando NADPH en lugar de NADH, con aparición de máximos a 740 nm (b, exceso molar NADPH/AIF, 3:1) y 769 nm (c, exceso molar 6:1).

En las flavoproteínas los complejos de transferencia de carga se producen como resultado de las interacciones de transferencia de carga  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo de

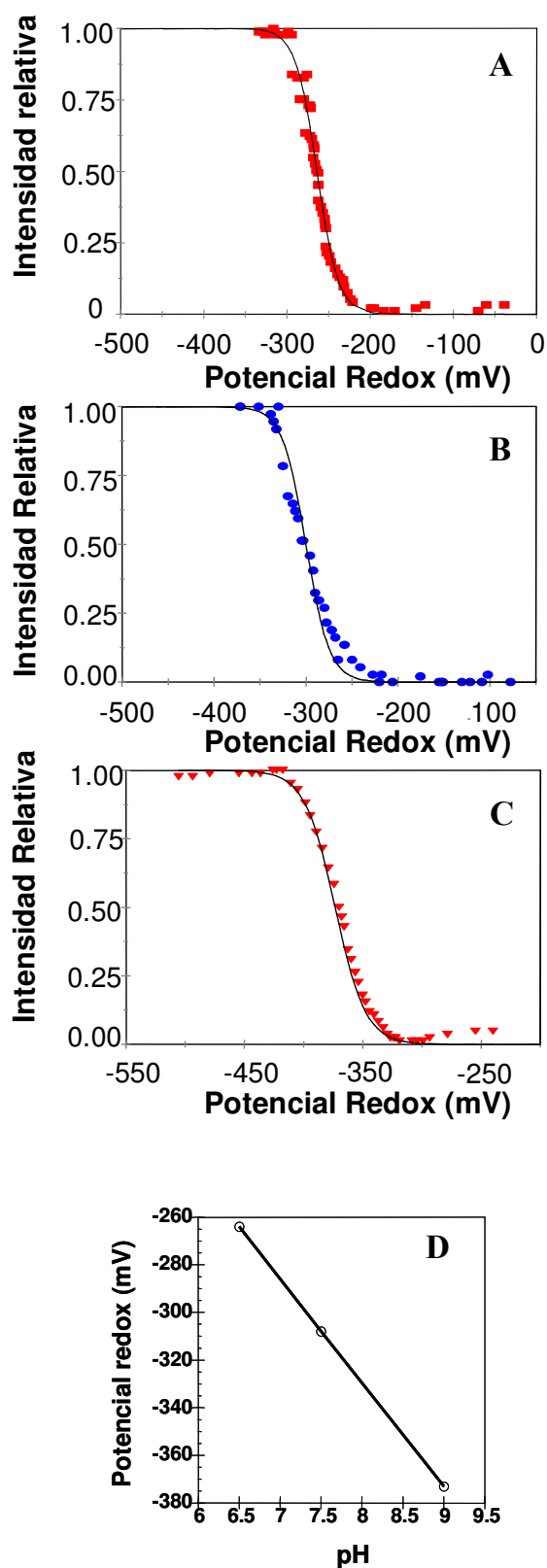


isoaloxacina de la flavina reducida (donador) y el anillo de nicotinamida del NAD(P) (aceptor) y absorben a longitudes de onda largas, donde la posición del máximo de absorción refleja la afinidad del complejo. Cuanto mayor interacción existe entre los anillos de estas moléculas mayor es la longitud de onda de los complejos de transferencia de carga (Sakurai y Hosoya, 1966).

#### **4.1.7. POTENCIAL REDOX DE AIF.**

La determinación del potencial redox se llevó a cabo en el Instituto de Tecnología Química e Biológica (Portugal), bajo la dirección de la Dra. Ligia Teixeira.

La titulación espectral de mAIF $\Delta$ 1-120 con ditionito (ver apartado 3.5.14) revela que el potencial redox está fuertemente influenciado por el pH (Figura 4.4). Se han determinado los potenciales redox, asumiendo un paso de reducción de dos electrones, a diferentes pHs:  $-264 \pm 12$  mV a pH 6.5 (Figura 4.4A),  $-308 \pm 15$  mV a pH 7.5 (Figura 4.4B) y  $-373 \pm 15$  mV a pH 9 (Figura 4.4C)



**Figura 4.4.** Efecto del pH sobre el potencial redox de AIF $\Delta$ 1-120. Curvas de titulación obtenidas por el seguimiento de variaciones de absorbancia a 450 nm de AIF $\Delta$ 1-120 (10  $\mu$ M) en la adición de ditionito. Las curvas con línea continua se han calculado a partir de una ecuación de Nerst dielectrónica. A: curva obtenida a pH 6.5; B: curva obtenida a pH 7.5; C: curva obtenida a pH 9; D: Potencial redox frente al pH.

Durante la reducción con ditionito no se detectó formación de semiquinona ni bandas de absorción a mayores longitudes de onda. La recta calculada a partir de la representación del potencial redox FAD/FADH<sub>2</sub> frente al pH presenta una pendiente de -44 mV. Esta pendiente muestra una desviación respecto a la esperada para una reducción de dos electrones con dos protones implicados (58 mV/unidad de pH) o un protón (29 mV/unidad de pH). La desviación de los valores teóricos indica la posible presencia de otros grupos disociables cuyos valores de p*K<sub>a</sub>* están unidos al estado redox del enzima.

A pesar de que las titulaciones con ditionito y NAD(P)H muestran una transferencia de dos electrones, se consideró importante descartar la implicación de los residuos de cisteína como centros redox activos. Para ello se llevó a cabo el ensayo de actividad NADH:DTNB oxidoreductasa (ver apartado 3.6.1.7), sin observarse ninguna participación de residuos de cisteína en la transferencia electrónica, como cabía esperar dada su localización en la secuencia y en la estructura tridimensional (Maté *et al.*, 2002). Por tanto, la ausencia de residuos de cisteína como centros redox activos para formar puentes disulfuro parece indicar que AIF no pertenece a la familia de la glutathion reductasa (GR), a pesar de su gran homología estructural.

#### 4.1.8. ACTIVIDADES REDOX DE AIFΔ1-120 *IN VITRO*.

Se han estudiado *in vitro* varias actividades enzimáticas con AIFΔ1-120 con el fin de caracterizar su actividad redox. Las reacciones enzimáticas estudiadas con AIFΔ1-120 como enzima catalizadora son la actividad NAD(P)H oxidasa, actividad diaforasa (NBT reductasa para la transferencia de un electrón y DCPIP reductasa para la transferencia de dos electrones), producción de superóxido, producción de peróxido de hidrógeno, actividad monodehidroascorbato reductasa, actividad citocromo *c* reductasa y actividad adrenodoxina reductasa.

##### *Actividad NAD(P)H oxidasa.*

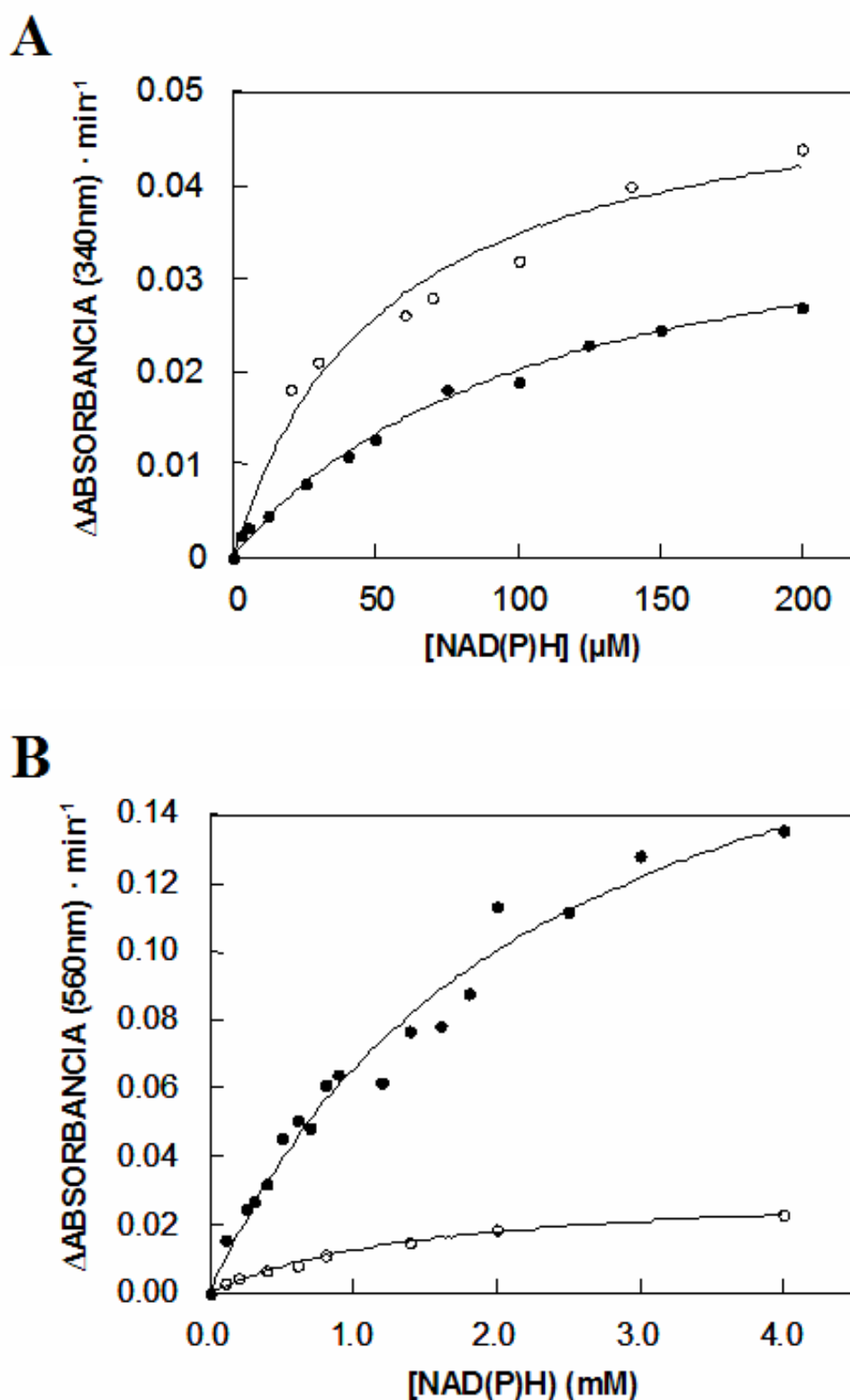
AIFΔ1-120 exhibe actividades NADH y NADPH oxidasa (Figura 4.5A). La oxidación de NAD(P)H en presencia de AIF se midió mediante seguimiento a 340 nm de las velocidades iniciales (apartado 3.6.1.3). La *K<sub>m</sub>* aparente obtenida para NADH es 99.4 ± 10 μM y el número de recambio 2.09 min<sup>-1</sup>. Cuando se usa NADPH como donador de electrones la *K<sub>m</sub>* aparente resultante es 52.9 ± 12 μM y el número de

recambio  $2.8 \text{ min}^{-1}$  (Tabla 4.1). Estos parámetros cinéticos son similares a valores previamente descritos para otras NADH oxidasas (Glass, 1986), y los datos cinéticos del estado estacionario deben ser interpretados teniendo en cuenta la posible formación de complejos de transferencia de carga relativamente estables. La adición de FAD exógeno no estimula la actividad NADH oxidasa de AIF $\Delta$ 1-120, a diferencia de lo descrito para diversas NADH oxidasas bacterianas (Ohnisni, 1994; Arcari, 2000, Niimura, 1994, Toomey, 1998).

##### *Actividad diaforasa*

Por otra parte AIF $\Delta$ 1-120 presenta actividad diaforasa. Cuando se reduce AIF con NADH o NADPH, AIF cataliza la reducción de aceptores artificiales de electrones, bien a través de la transferencia de un electrón, como las sales de tetrazolio (NBT) (Figura 4.5B) como de dos electrones, en el caso del DCPIP, aceptor típico de NAD(P)H deshidrogenasas

La reducción de la sal de tetrazolio NBT está mediada por iones superóxido, ya que se inhibió completamente por la adición de superóxido dismutasa (SOD, 40 U/ml), y catalasa (20 U/ml). Las constantes cinéticas calculadas se encuentran reflejadas en la tabla 4.1.



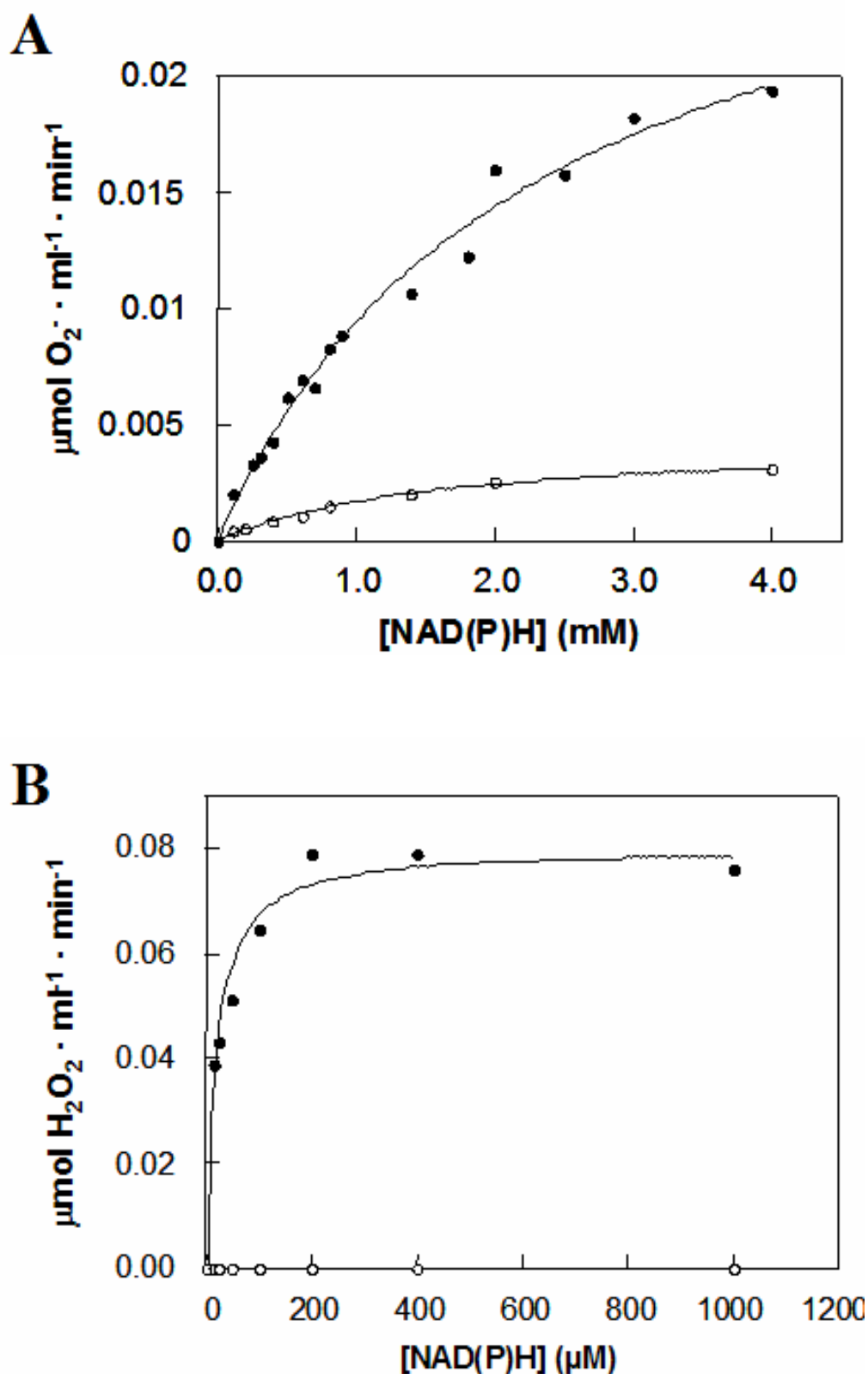
**Figura 4.5.** NAD(P) oxidación por AIF $\Delta$ 1-120. A: Oxidación de NADH (●) y NADPH (○) medida por seguimiento del cambio de absorbancia a 340 nm, tras la adición de diferentes cantidades de NAD(P)H. AIF se utilizó a una concentración 3  $\mu$ M. B: Reducción de NBT mediada por AIF con NADH (●) y NADPH (○) como donadores electrónicos. AIF se utilizó a una concentración 95 nM.

La actividad NBT reductasa se sigue por incremento de absorbancia a 560nm (ver apartado 3.6.1.1.2.). Los valores cinéticos para el estado estacionario de la actividad NBT reductasa se muestran en la tabla 4.1. La reducción del NBT se inhibe completamente por la adición de superóxido dismutasa (SOD, 40U/ml), lo cual indica la producción de ión superóxido a través de la reducción de  $O_2$  a  $O_2^-$  mediada por AIF(FADH<sub>2</sub>) (Figura 4.6A).

La actividad diaforasa de AIFΔ1-120 para una transferencia de dos electrones se muestra, respecto al DCPIP en la Tabla 4.1 (ver apartado 3.6.1.1.1). Esta reacción no es inhibida por SOD, indicando que la actividad diaforasa de AIF para el DCPIP no está mediada por el anión superóxido.

#### *Producción de ión superóxido y peróxido de hidrógeno.*

AIFΔ1-120 no presenta actividad peroxidasa. Sin embargo se produce peróxido de hidrógeno a partir del anión superóxido formado en la reacción NAD(P)H oxidasa. La formación de peróxido de hidrógeno debido a la formación de anión superóxido se midió de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.6.1.6 (Figura 6B). No se observa formación de peróxido de hidrógeno cuando el donador es NADPH. Las constantes cinéticas calculadas para el estado estacionario se detallan en la Tabla 4.1.



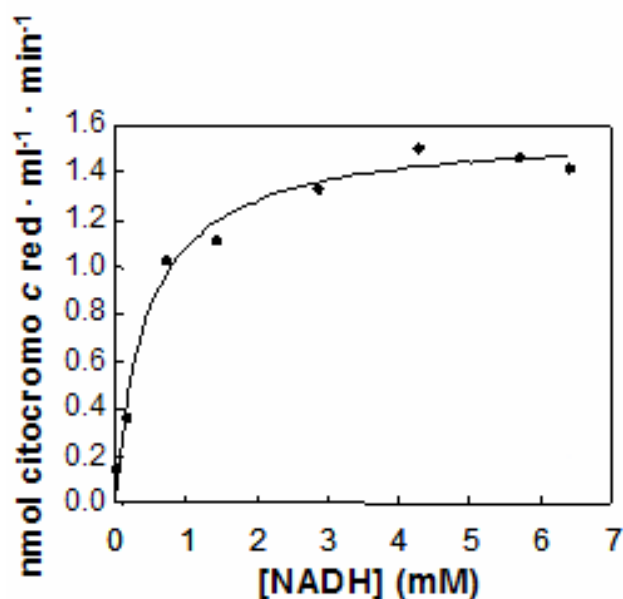
**Figura 4.6.** Actividades NADH (●) y NADPH (○) oxidasa de AIF que producen la generación de anión superóxido (A) y peróxido de hidrógeno (B). La concentración de AIF en el ensayo fue 95 nM en A y 3  $\mu\text{M}$  en B.

*Actividad monodehidroascorbato reductasa*

Debido a la gran homología de secuencia que presenta esta proteína con monodehidroascorbato reductasas (Lorenzo *et al.*, 1999) se estudió también la actividad monodehidroascorbato reductasa de AIF $\Delta$ 1-120 (ver Materiales y métodos, apartado 2.6.1.2). Se obtuvo una actividad específica de 8.8U/mg y  $k_{\text{cat}}$  0.505 min<sup>-1</sup>, análogas a descritas en proteínas homólogas a AIF en plantas (Lorenzo *et al.*, 1999). Esta actividad monodehidroascorbato reductasa en AIF se inhibe por SOD, lo cual indica que la reacción ocurre a través de radicales superóxido.

*Actividad citocromo c reductasa y adrenodoxina reductasa*

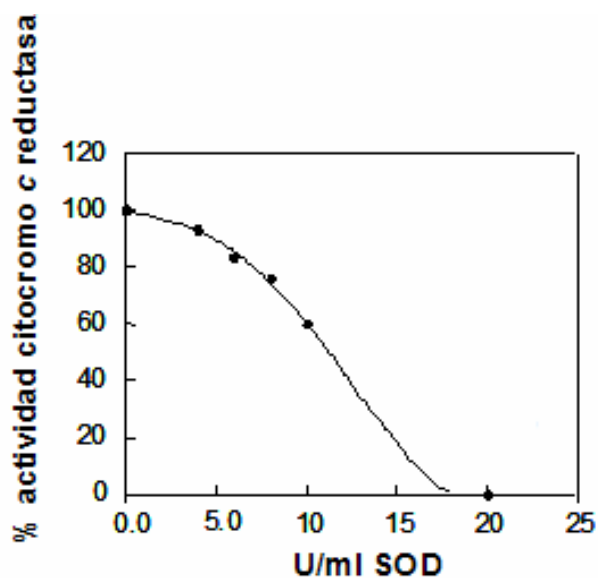
La actividad citocromo *c* reductasa se midió de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.6.1.5. Los resultados obtenidos se encuentran reflejados en la Figura 4.7. Las constantes cinéticas obtenidas para el estado estacionario son:  $K_m$  aparente 0.46 mM para NADH y  $k_{\text{cat}}$  21.76 min<sup>-1</sup>.



**Figura 4.7.** Reducción del citocromo *c* por AIF $\Delta$ 1-120 mediada por el anión superóxido, usando NADH como donador de electrones. La concentración de AIF en la reacción fue 72 nM y se utilizaron concentraciones crecientes de NADH, tal como se indica en la gráfica.

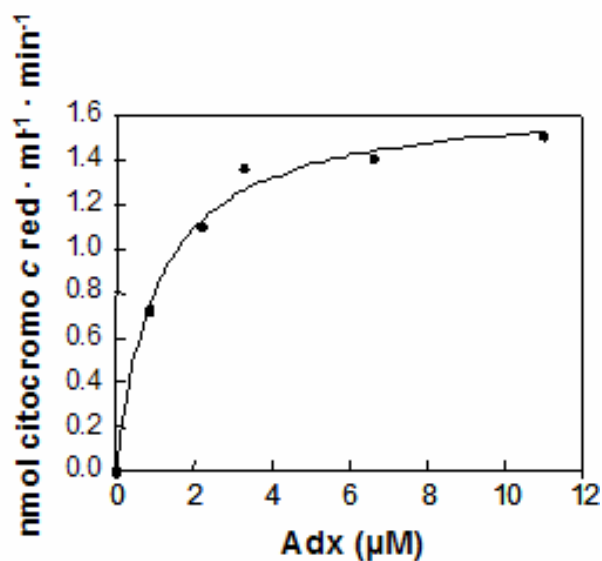


Nuevamente, la SOD inhibe la actividad citocromo *c* reductasa con  $IC_{50} \sim 10$  U/ml, lo cual indica que la reducción de citocromo *c* catalizada por AIF ocurre vía radicales  $O_2^-$  (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Inhibición específica de la actividad citocromo *c* reductasa por SOD. La concentración de AIF en la reacción fue 72 nM y la concentración de NADH 3.4 mM.

Cuando se usó ferredoxina como mediador (NADH-AIF-ferredoxina-citocromo *c*) no se modificó la velocidad de reducción del citocromo *c*. Sin embargo, cuando se usa adrenodoxina como mediador (NADH-AIF-adrenodoxina-citocromo *c*) (ver apartado 3.6.1.4), se incrementó la velocidad de reducción del citocromo *c* (Figura 4.9). Los parámetros cinéticos calculados son:  $K_m$  aparente para adrenodoxina 1.08  $\mu$ M con  $k_{cat}$  18.58  $min^{-1}$ .



**Figura 4.9.** Implicación de la adrenodoxina como mediador de la actividad citocromo *c* reductasa. La concentración de AIF en la reacción fue 90nM y la concentración de NADH 3.4 mM.

También se realizó el ensayo para detectar la reducción del ferricianuro, otro aceptor electrónico típico de NAD(P)H dehidrogenasas, con transferencia de un electrón. En este caso, la velocidad de transferencia electrónica resultó muy baja, con una eficiencia catalítica reducida para el NADH a aproximadamente la mitad.

**Tabla 4.1.** Parámetros cinéticos del estado estacionario de mAIFΔ1-120.**ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA**

	Actividad específica (UI/mg)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
NADH	0.036	2.09	$99.4 \pm 10$	0.021
NADPH	0.098	2.84	$52.9 \pm 12$	0.054

**ACTIVIDAD NBT REDUCTASA**

	Actividad específica (UI/mg)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
NADH	38.733	2244.2	$2.2 \pm 0.3$	1020
NADPH	0.383	22.1	$1.5 \pm 0.1$	14.8

**PRODUCCION DE SUPEROXIDO**

	Actividad específica (UI/mg)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
NADH	5.559	322.1	$2.2 \pm 0.2$	146.4
NADPH	0.79	45.6	$1.5 \pm 0.1$	30.4

**PRODUCCION DE PEROXIDO**

	Actividad específica (UI/mg)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
NADH	0.462	26.7	$19 \pm 3$	1.4
NADPH	n.d.	n.d.	n.d.	

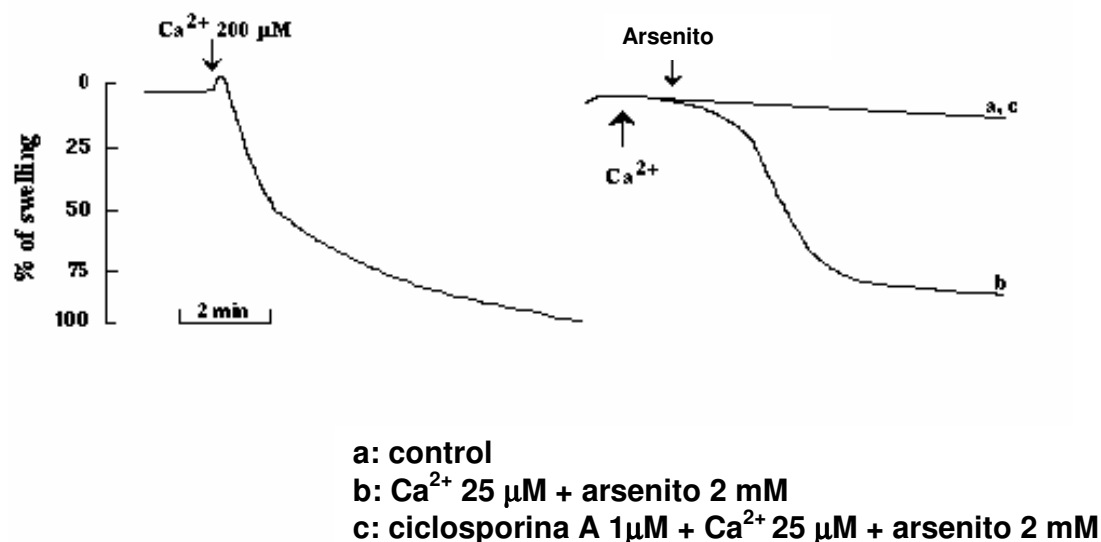
**ACTIVIDAD DIAFORASA (DCPIP)**

	Actividad específica (UI/mg)	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (Mm)	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
NADH	0.375	21.6	$3.4 \pm 0.4$	6.3
NADPH	n.d.	n.d.	n.d.	

En resumen, los datos cinéticos obtenidos se encuentran reflejados en conjunto en la tabla 4.1. AIF exhibe claramente una actividad NADH oxidasa, siendo capaz de transferir un electrón al oxígeno molecular. Por otra parte, la actividad diaforasa indica que también puede transferir dos electrones al DCPIP.

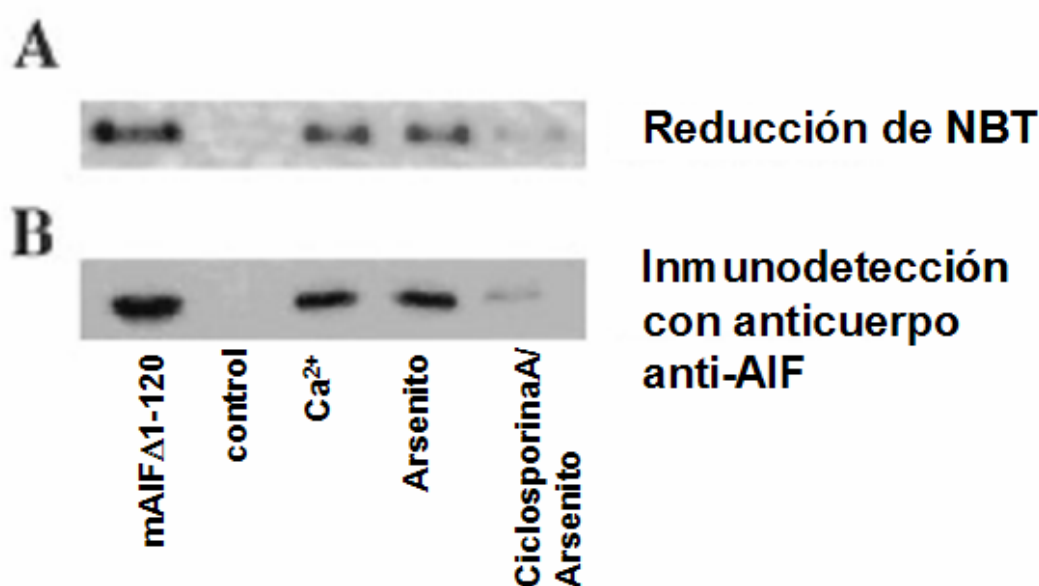
#### 4.1.9. ACTIVIDAD REDOX DE AIF *IN VIVO*: ACTIVIDAD NADH OXIDASA DE AIF DE HEPATOCITOS DE RATON.

Las mitocondrias purificadas pueden ser inducidas para llevar a cabo la llamada “transición de permeabilidad”, una manipulación que conduce al hinchamiento osmótico de la matriz y la ruptura física de la membrana externa, produciendo la salida de proteínas solubles del espacio intermembrana (Patterson, 2000). Bajo inducción de la transición de permeabilidad con  $\text{Ca}^{2+}$  o arsenito se puede detectar AIF en el sobrenadante mitocondrial con técnicas inmunoquímicas. Esta salida de AIF se inhibe con ciclosporina A, un inhibidor específico del poro de transición de permeabilidad (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Salida de proteínas del espacio intermembrana tras la inducción de la transición de permeabilidad, medida por espectroscopia de fluorescencia. La inducción se ha realizado mediante la adición de 200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (4.10A) y 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  + 2 mM arsenito (4.10B, curva *b*). Como control negativo se ha utilizado ciclosporina A, inhibidor específico de la apertura del poro de transición de permeabilidad.

La separación de proteínas por electroforesis de poliacrilamida en condiciones nativas, seguida de detección *in situ* de actividad NADH oxidasa NBT reductasa (apartado 3.6.1.1.2.), produce una banda única azul (Figura 4.11A). Esta banda también reacciona con un anticuerpo específico anti-AIF y migra de igual forma que AIF $\Delta$ 1-120 recombinante (Figura 4.11B).



**Figura 4.11.** Actividad redox de AIF nativa de hepatocitos de ratón. A: AIF es la principal NADH oxidasa eliminada de la mitocondria durante la transición de permeabilidad, inducida por 100  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> y 2 mM arsenito sódico. AIF se ha detectado *in situ* mediante la actividad NBT reductasa. B: Inmunodetección de AIF tras electroforesis en gel de poliacrilamida 10% de la fracción de espacio intermembrana obtenido en las condiciones descritas en A. Como control de la inducción de transición de permeabilidad se llevó a cabo un pretratamiento de las mitocondrias con 1  $\mu$ M ciclosporina A para inhibir la salida de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial. AIF $\Delta$ 1-120 presenta una migración igual a AIF nativa.

Estos datos sugieren que AIF nativa mitocondrial posee una actividad NADH oxidasa/NBT reductasa igual a la proteína recombinante e indican que AIF es, cuantitativamente, la NADH oxidasa/NBT reductasa mayoritaria del espacio intermembrana mitocondrial.

#### 4.1.10. ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEINA-PROTEINA DE AIF Y POLIPEPTIDOS MITOCONDRIALES.

Con objeto de determinar posibles componentes de la cadena de transporte redox en la que AIF participa en la mitocondria, u otras proteínas mitocondriales con las que puede interactuar “*in vivo*” se llevaron a cabo distintos experimentos. El resultado obtenido mediante el sistema de Profound pull-down polyHis protein:protein interaction kit (*Pierce*) fue negativo, es decir, no se observó ninguna proteína que eluyera de la columna de afinidad de este sistema conjuntamente con mAIFΔ1-101.

En segundo lugar se trató de realizar un entrecruzamiento químico en soluciones concentradas de extracto mitocondrial total (apartado 3.3.4). Se trataron soluciones de extracto mitocondrial total (EM) con dos agentes que originan entrecruzamiento: iodoacetamida y EDC (N-etil-N-[dimetilaminopropil]carbodiimida) 8mM durante 20 horas a 4°C. Posteriormente se realizó una separación de las proteínas por electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida y análisis por Western Blot

El entrecruzamiento con iodoacetamida no dio ningún resultado, sin embargo una incubación de 20 horas a 4°C de extracto mitocondrial total con 8mM EDC produjo una serie de proteínas unidas covalentemente a AIF por entrecruzamiento químico en el análisis por electroforesis en gel desnaturizante y Western Blot.

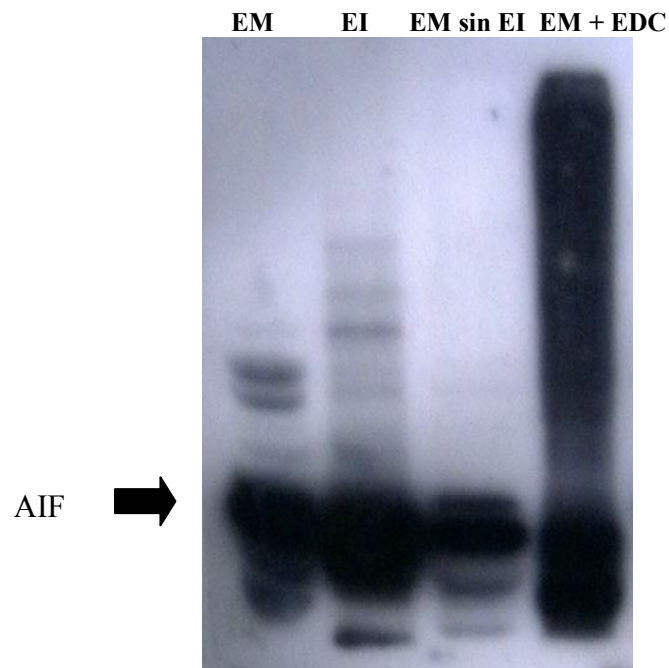


Figura 4.12. Inmunodetección (Western Blot) de extractos de distintas fracciones mitocondriales y fracciones mitocondriales tratadas con EDC para formar complejos covalentes. Espacio intermembrana (EI): concentración proteica 2.611  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (en tampon Tris 50mM con atractilosido). Extracto mitocondrial total (EM): concentración proteica 3.905  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Extracto mitocondrial total después de separar el espacio intermembrana (EM sin EI): concentración proteica 3.219  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Extracto mitocondrial total tratado con EDC 8mM durante 24 horas a 4°C. (EM + EDC): concentración proteica 1.952  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Esta aproximación nos permite ver que AIF interacciona con otras proteínas de la mitocondria, aunque sería necesario cambiar las condiciones del ensayo para obtener una mejor resolución. Además se puede observar que AIF está presente en la fracción de extracto mitocondrial total en la cual se ha extraído el espacio intermembrana, lo cual parece indicar que AIF no está presente únicamente en el espacio intermembrana como proteína soluble sino que puede tener otras posibles localizaciones, lo cual se correspondería con los estudios de Otera et al. (2005) sobre la localización de AIF como proteína integral de la membrana interna mitocondrial.





**4.2 ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE  
LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF  
(APOPTOSIS INDUCING FACTOR) Y  
SU ACTIVIDAD APOPTOGENICA**

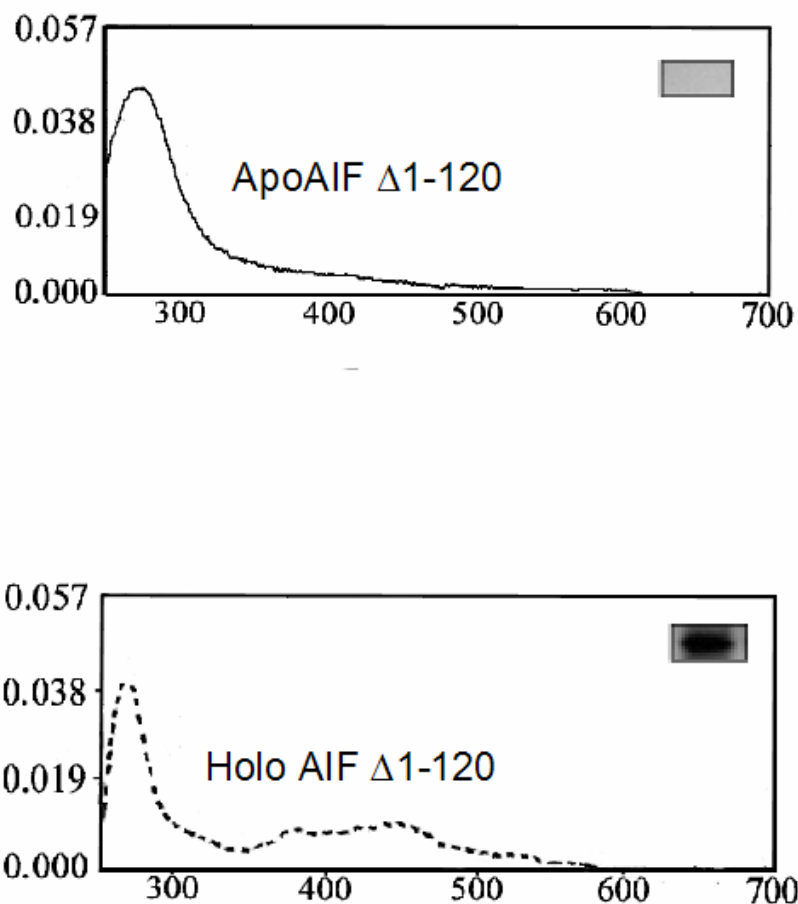
## **4.2. ESTUDIO DE LA RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF (APOPTOSIS INDUCING FACTOR) Y SU ACTIVIDAD APOPTOGENICA**

El presente estudio se ha llevado a cabo con dos proteínas AIF de ratón de diferente longitud en el extremo N-terminal, mAIF $\Delta$ 1-120 y mAIF $\Delta$ 1-101. Previamente el precursor AIF (1-612), que no une FAD, había demostrado su capacidad de inducir apoptosis tanto en células microinyectadas como en núcleos aislados (Susin *et al.*, 1999b) tras un plegamiento del mismo *in vitro*. Sin embargo esta forma de AIF no se encuentra nunca en el citosol. Se procesa en la mitocondria tanto para eliminar la secuencia de localización mitocondrial (Otera *et al.*, 2005) como tras el estímulo apoptótico para salir de la mitocondria (Polster *et al.*, 2005, Yuste *et al.*, 2005). Por tanto la forma mAIF $\Delta$ 1-101 se corresponde con la proteína real apoptogénica.

### **4.2.1 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD APOPTOTICA DE mAIF $\Delta$ 1-120.**

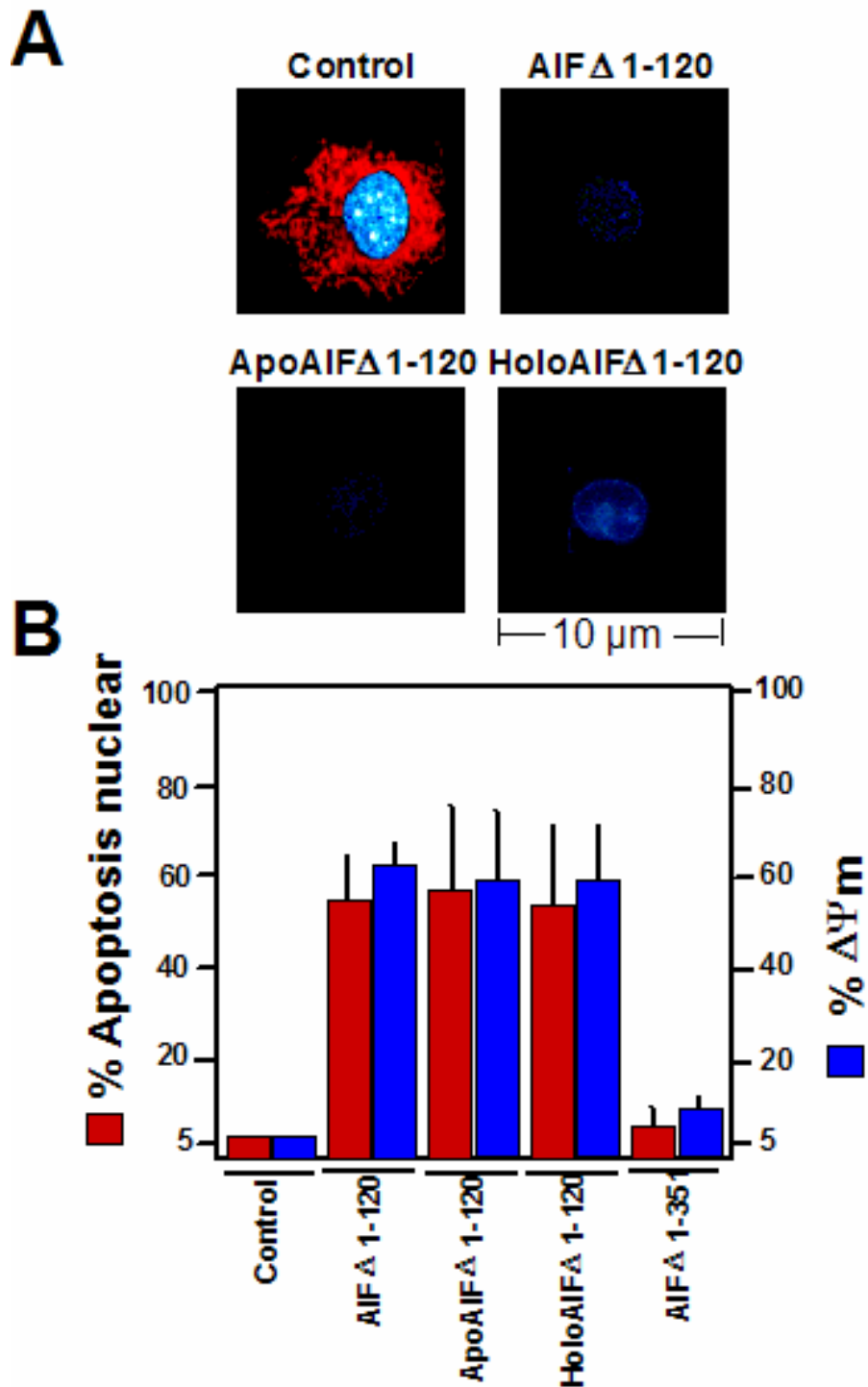
#### 4.2.1.1 Actividad apoptótica de apoAIF $\Delta$ 1-120.

El grupo prostético FAD de mAIF $\Delta$ 1-120 se puede eliminar por diálisis en presencia de cloruro de guanidinio. Esta manipulación genera apoproteína (apoAIF $\Delta$ 1-120), que se puede reconstituir a holoproteína (holoAIF $\Delta$ 1-120) por adición externa de FAD. ApoAIF no tiene actividad NADH oxidasa-NBT reductasa detectable, tal como era de esperar, mientras que la holoAIF reconstituída presenta una actividad NADH oxidasa-NBT reductasa indistinguible de la proteína original mAIF $\Delta$ 1-120 (Figura 4.13). Además, los espectros de dicroísmo circular de la holoproteína y apoproteína (ver Materiales y métodos, apartado 3.5.11) fueron muy similares entre sí. Esto indica que el plegamiento global de la proteína no está afectado por la eliminación del grupo prostético FAD.



**Figura 4.13.** Características espectrales de apoAIF y holoAIF reconstituida. El recuadro interior muestra la recuperación de la actividad NADH oxidasa a partir de la reconstitución de apoAIF con FAD, medida *in situ* mediante detección con el ensayo de actividad NBT reductasa (Materiales y métodos, apartado 3.6.1.1.2.).

Estas proteínas (AIF $\Delta$ 1-120, apoAIF $\Delta$ 1-120 y la reconstituída holoAIF $\Delta$ 1-120) se microinyectaron en el citoplasma de fibroblastos Rat-1. Los resultados sobre su actividad apoptótica pueden observarse en la figura 4.14

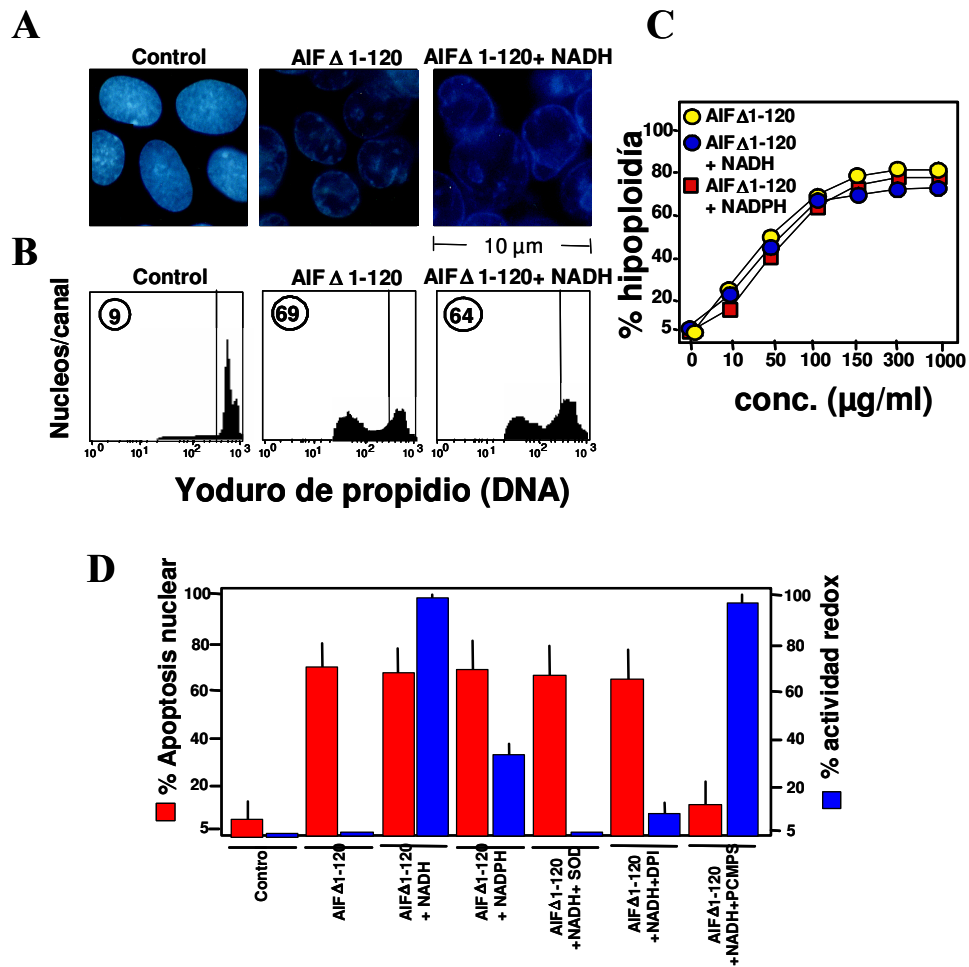


**Figura 4.14.** Actividad apoptótica de apoAIF $\Delta$ 1-120 y holoAIF $\Delta$ 1-120 reconstituida en ensayos de microinyección. Se microinyectaron células Rat-1 con las proteínas indicadas (7.5 $\mu$ M AIF $\Delta$ 1-120, apoAIF $\Delta$ 1-120 y holoAIF $\Delta$ 1-120 reconstituida), se tiñeron con Hoechst 33342 (fluorescencia azul) y con CMXRos, una tinción sensible a  $\Delta\Psi_m$  (fluorescencia roja). Los fenotipos celulares representativos obtenidos tras 3 horas de la microinyección se muestran en el panel A. Panel B: Cuantificación de la apoptosis nuclear y disminución del  $\Delta\Psi_m$  inducido por microinyección (100-150 células Rat-1/sesión) de AIF $\Delta$ 1-120, apoAIF $\Delta$ 1-120 y holoAIF $\Delta$ 1-120 reconstituida. Como control negativo se utilizó AIF $\Delta$ 1-351. ( $x \pm$  S.E. de tres experimentos).

Las tres proteínas indujeron un nivel similar de condensación de cromatina, así como de disipación del potencial transmembrana mitocondrial (Figura 4.14, A y B). Un mutante por delección de AIF, AIF $\Delta$ 1-351 se utilizó como control negativo, ya que es inactivo en este sistema. Esta proteína se purificó en el Amgen Institute and Ontario Cancer Institute de la Universidad de Toronto (Canada) y carece del dominio oxidoreductasa.

#### 4.2.1.2. Actividad apoptótica de mAIF $\Delta$ 1-120 en relación con NAD(P)H.

Los efectos nucleares de AIF se estudiaron en núcleos aislados (cell-free system), en el cual se añadió mAIF $\Delta$ 1-120 a núcleos purificados de células HeLa. En este sistema, mAIF $\Delta$ 1-120 produjo una marcada condensación periférica de cromatina (Figura 4.15A) así como pérdida del contenido total de DNA (Figura 4.15B). La adición de NADH y NADPH no favoreció la actividad apoptogénica de mAIF $\Delta$ 1-120 (Figura 4.15C). Además, la inhibición de la actividad oxidoreductasa por adición externa de SOD o difenileniodonium, un inhibidor de flavoenzimas que reacciona covalentemente con FAD (O'Donnel *et al.*, 1993; Majander *et al.*, 1994; Coves *et al.*, 1999), no afectó la capacidad apoptogénica de AIF (Figura 4.15D). Por el contrario, la adición de ácido *para*-cloromercurifenilsulfónico, un reactivo de grupos tiol, anuló la actividad apoptogénica de AIF $\Delta$ 1-120 sin afectar su actividad NADH oxidasa-NBT reductasa (Figura 4.15D).



**Figura 4.15.** Independencia entre la actividad redox de AIF y su actividad apoptótica: efectos apoptóticos nucleares inducidos por mAIFΔ1-120 o mAIFΔ1-120 + NADH en núcleos aislados. *A*: Núcleos HeLa tratados durante 120 minutos con 100 μg/ml de mAIFΔ1-120 o AIFΔ1-120 (100 μg/ml) + NADH (2 mM) y teñidos a continuación con Hoechst 33342. *B*: Núcleos HeLa tratados como se describe en *A* y teñidos con yoduro de propidio. Se ha medido el porcentaje de hipoploidía mediante citometría de flujo. *C*: Curva del efecto apoptogénico de mAIFΔ1-120 en función de la concentración en presencia y ausencia de NADH y NADPH 2 mM, medido análogamente a *B*. *D*: Comparación entre la actividad redox y la actividad apoptótica de AIF obtenida tras pretratamiento de mAIFΔ1-120 (100 μg/ml, 15 minutos a 37°C) con NADH (2 mM), NADPH (2 mM), SOD (40 U/ml), difenileniodonium (*DPI*, 250 μM), o ácido para-cloromercurifenilsulfónico (*PCMPS*, 30 μM) ( $x \pm$  S.E. de 5 experimentos).

#### 4.2.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD APOPTOTICA DE mAIFΔ1-101.

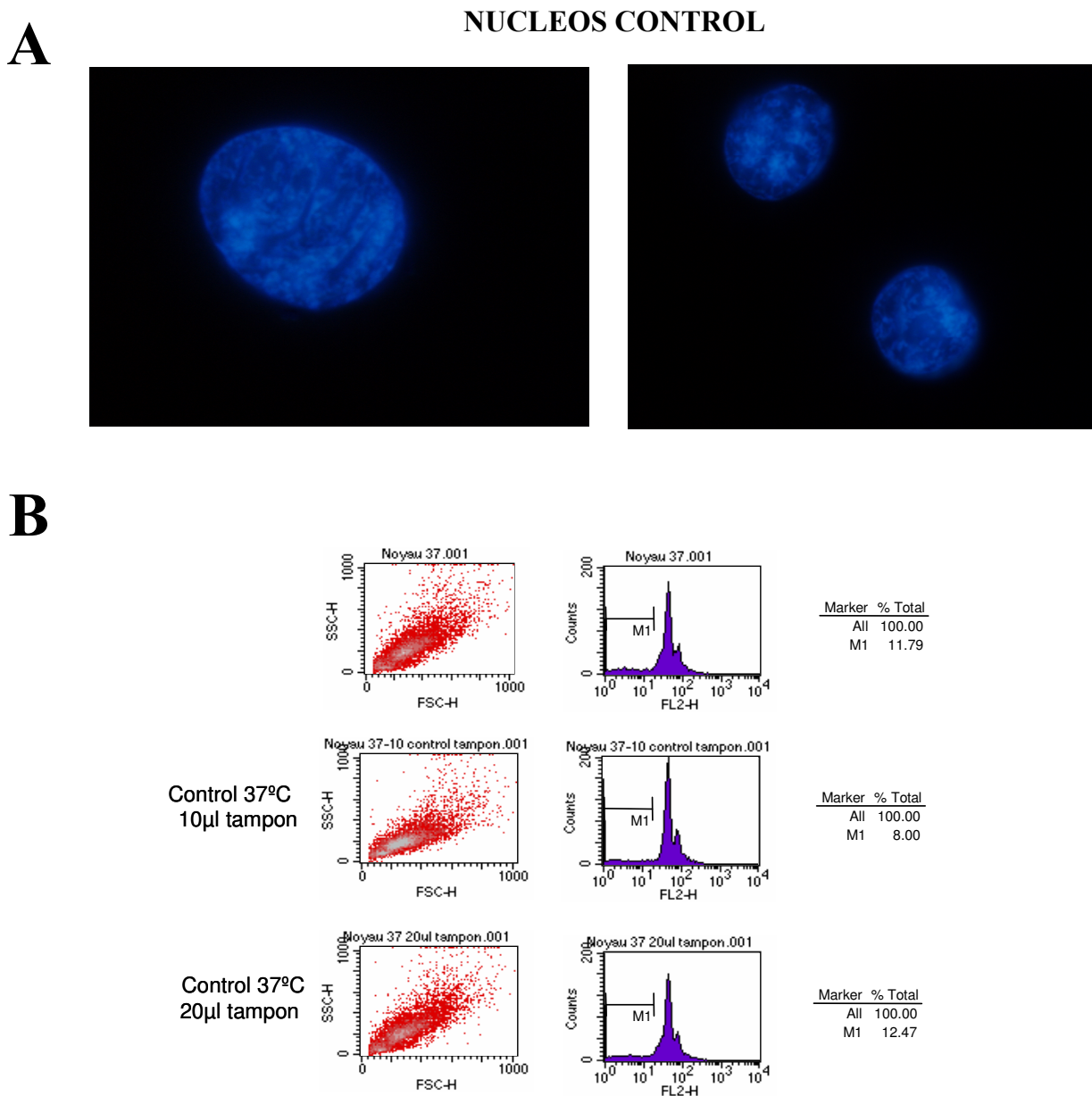
Para llevar a cabo este estudio se obtuvo AIF Δ1-101 recombinante de ratón mediante el sistema de vector procariota pET28a (ver apartado 3.4.5). Este sistema incorpora una cola de histidinas, en este caso, en N-terminal de la proteína recombinante y permite su purificación mediante columna de afinidad a metales (IMAC), en este caso de  $Zn^{2+}$  (ver apartado 3.5.4.2.). Posteriormente esta cola de histidinas se puede eliminar mediante digestión proteolítica con trombina, ya que entre la misma y AIF hay un corte específico para trombina (ver apartado 3.5.5). La proteína se purificó según el protocolo descrito en el apartado 3.5.6.2., y la proteína resultante no presentó diferencias espectrales significativas respecto a mAIF Δ1-120.

Por otra parte, tras el corte con trombina, se realizaron preparaciones de apoproteínas de AIFΔ1-101, apoAIFΔ1-101 recombinante de ratón mediante purificación por FPLC en columna de filtración en gel Superosa 12, en las cuales AIF pierde el grupo prostético FAD (ver apartado 3.5.7.2).

Las distintas proteínas purificadas: AIF 1-101 con cola de histidinas (His6x mAIFΔ1-101) y apoAIFΔ1-101 se han evaluado como proteínas apoptogénicas en núcleos aislados (apartados 3.3.5 al 3.3.7). Este estudio se realizó por triplicado, con proteínas procedentes de diferentes preparaciones.

##### 4.2.2.1. Controles negativo y positivo del estudio.

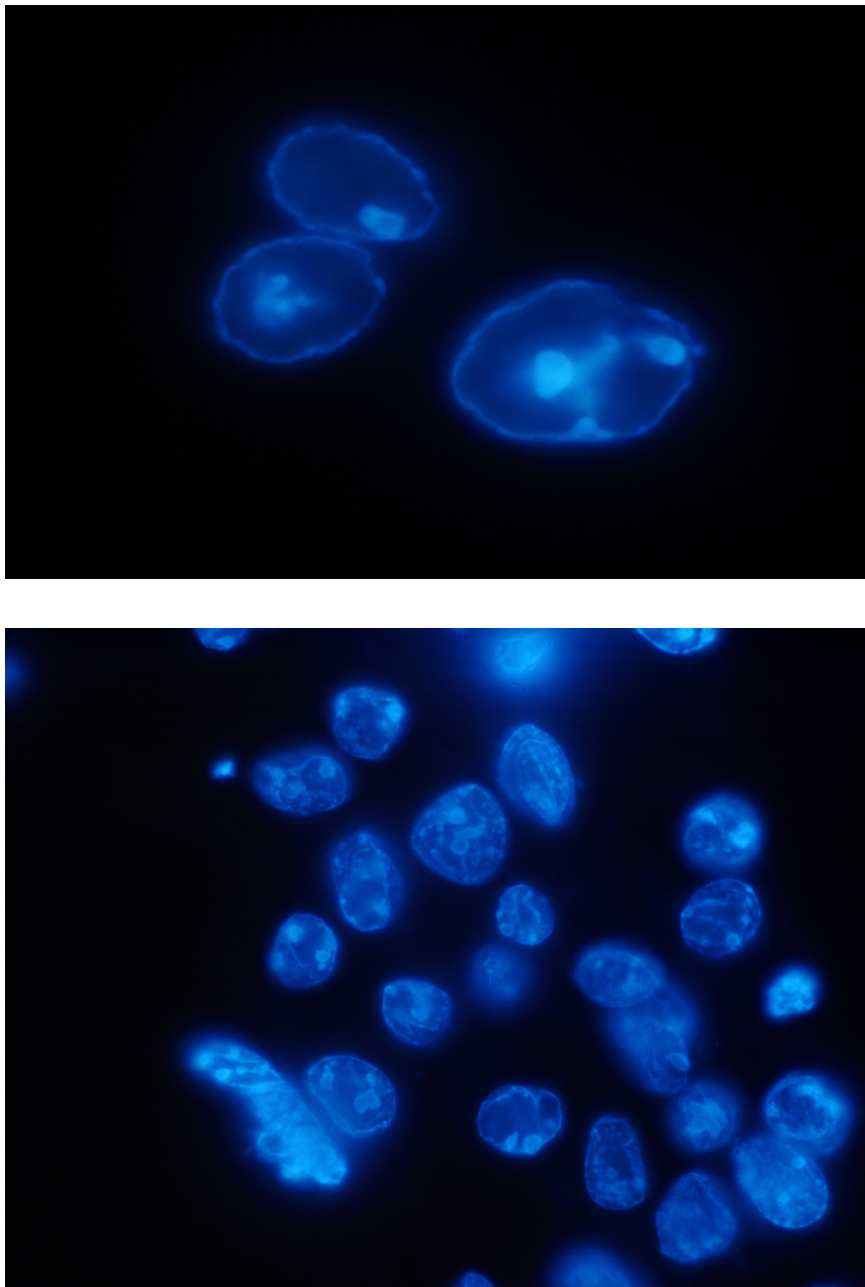
Como controles positivos se ha utilizado espacio intermembrana de mitocondrias de hígado de ratón así como extracto mitocondrial total. Los controles negativos se muestran en la Figura 4.16 (A y B) y los controles positivos se muestran en la figura 4.17 (A y B)



**Figura 4.16.** Control negativo de la actividad apoptogénica. A: Núcleos purificados de células HeLa se trataron con cantidades crecientes (1µl, 10µl y 20µl) de tampón Tris 50mM pH 8 durante 120 minutos. A continuación fueron tratadas con DAPI (fluorescencia azul). B: Analisis por citometría de flujo tras teñir con yoduro de propidio.

Cuando se tratan los núcleos con espacio intermembrana mitocondrial obtenido de mitocondrias de hígado de ratón y con extracto mitocondrial total se puede observar la misma morfología descrita anteriormente y que se ha descrito en la literatura. Por ello este sistema se utiliza como control positivo (Figuras 4.17. a 4.19.). En las figuras 4.18 y 4.19 se muestra el análisis por citometría de flujo de los núcleos tratados tanto con espacio intermembrana como con extracto mitocondrial total, respectivamente.





**Figura 4.17.** Núcleos de células He-La incubados a 37°C en presencia de espacio intermembrana mitocondrial y teñidos posteriormente con DAPI. Se observa la inducción de las características típicas de la morfología de las fases iniciales de la apoptosis nuclear, entre las que se encuentran la condensación periférica de la cromatina y la pérdida de contenido total de DNA.

## ESPACIO INTERMEMBRANA

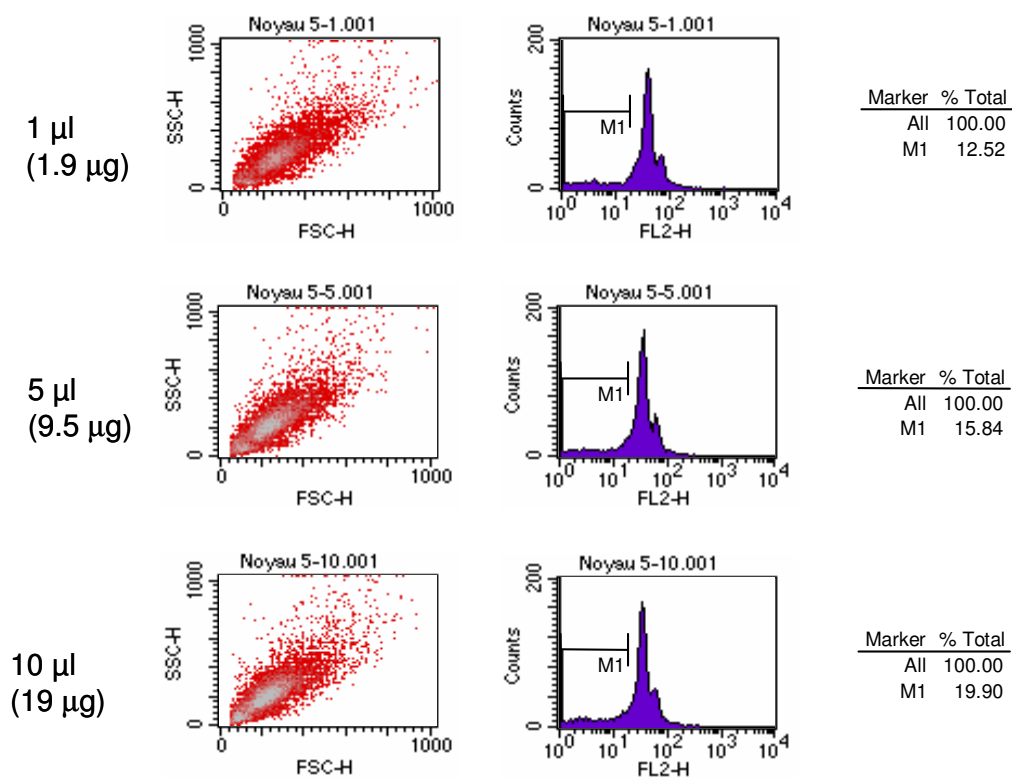


Figura 4.18. Control positivo de la actividad apoptogénica. Análisis por citometría de flujo de los núcleos aislados tratados con cantidades crecientes (1 µl, 5 µl y 10 µl) de extracto del espacio intermembrana obtenido por transición de permeabilidad, tal y como se describe en el apartado 3.3.3.

## EXTRACTO MITOCONDRIAL

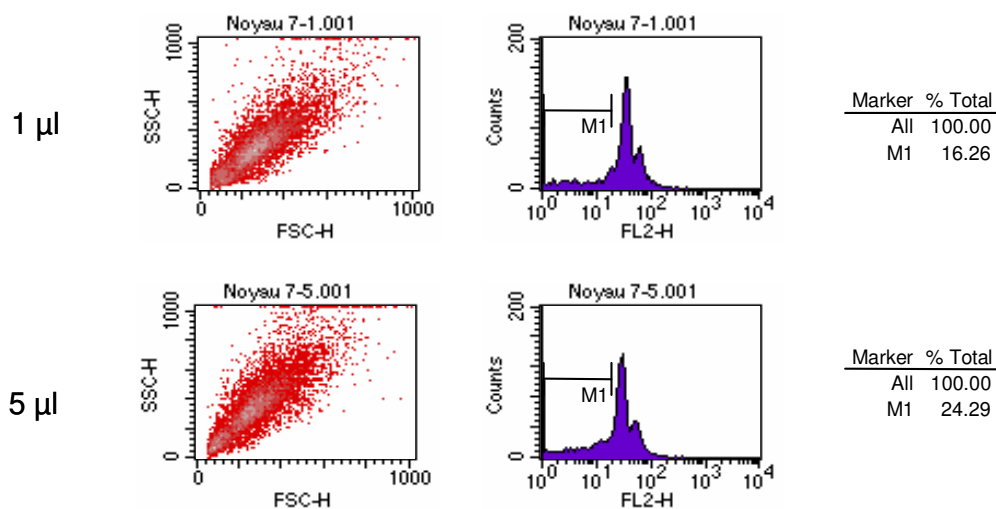
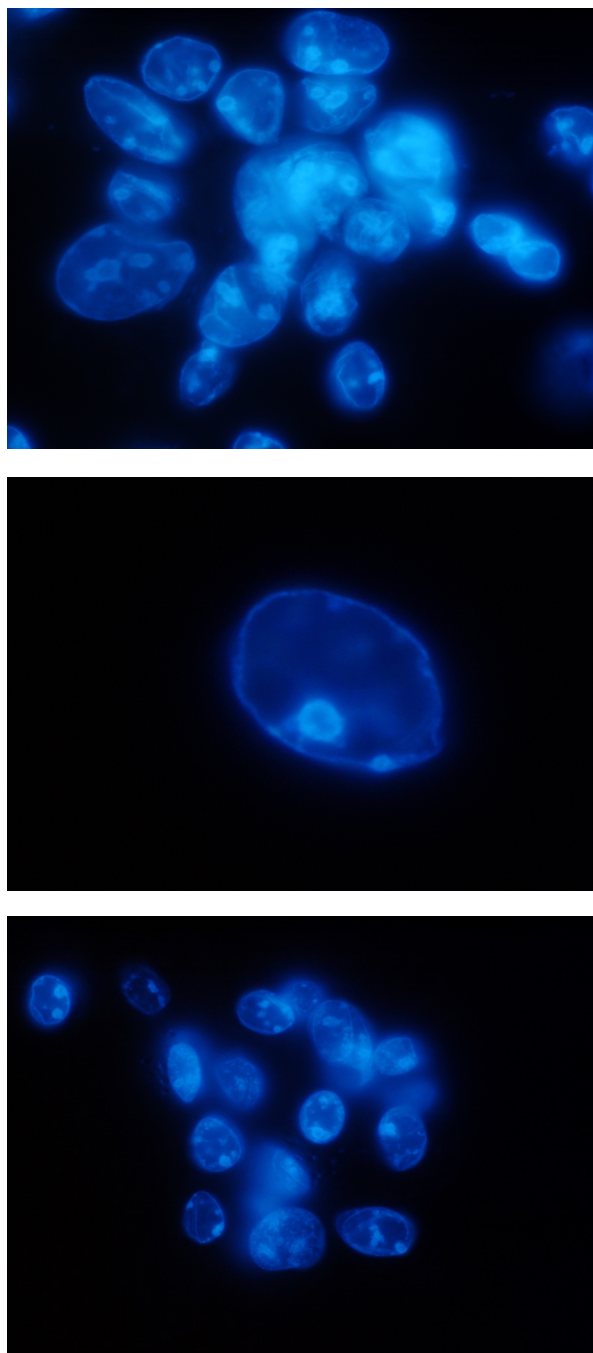


Figura 4.19. Control positivo de la actividad apoptogénica. Análisis por citometría de flujo de los núcleos aislados tratados con cantidades crecientes (1  $\mu$ l y 5  $\mu$ l) de extracto mitocondrial total (ver apartado 3.3.4)

### 4.2.2.2. Actividad de la holoproteína mAIF $\Delta$ 1-101.

Cuando se tratan los núcleos con mAIF $\Delta$ 1-101 recombinante con cola de histidinas (His6x mAIF $\Delta$ 1-101) observamos la inducción de las características típicas de la morfología de las fases iniciales de la apoptosis nuclear, entre las que se encuentran la condensación periférica de la cromatina y la pérdida de contenido total de DNA (Figura 4.20), refrendado por la citometría de flujo (Figura 4.21). Por tanto la cola de histidinas en N-terminal no afecta a la actividad apoptogénica de AIF.



**Figura 4.20.** Núcleos de células He-La incubados a 37°C en presencia de AIF 1-101 recombinante con cola de histidinas (His6x mAIF $\Delta$ 1-101) y teñidos posteriormente con DAPI. Se observa la inducción de las características típicas de la morfología de las fases iniciales de la apoptosis nuclear, entre las que se encuentran la condensación periférica de la cromatina y la pérdida de contenido total de DNA.

## AIF 1-101 His(6x)

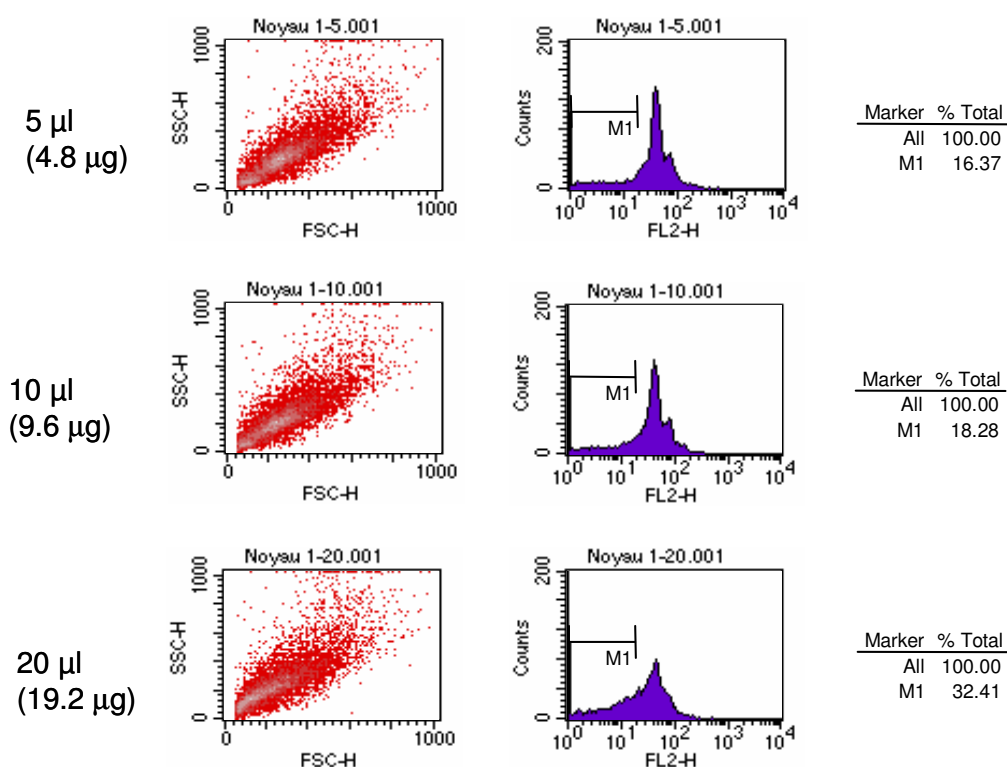
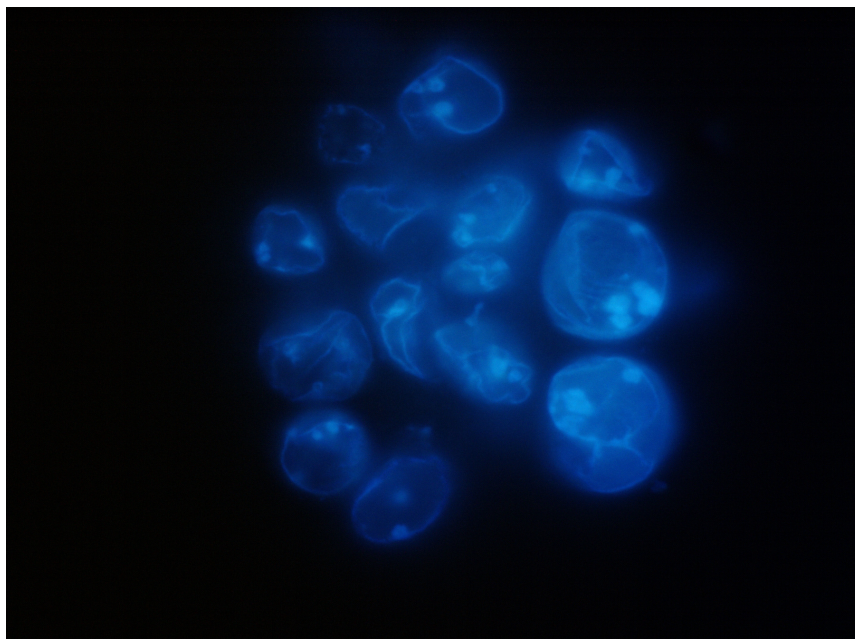
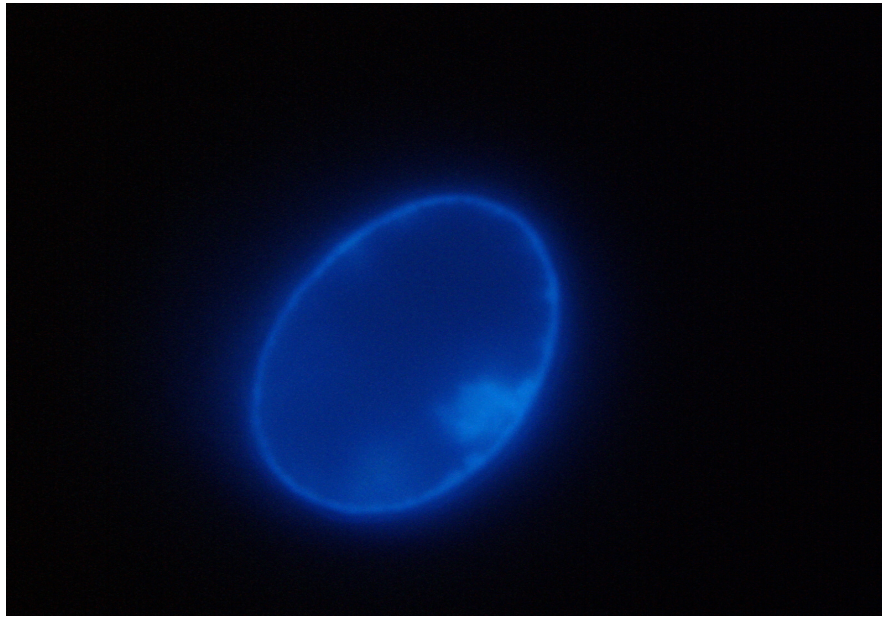


Figura 4.21. Actividad apoptogénica de mAIF $\Delta$ 1-101. Análisis por citometría de flujo de los núcleos aislados tratados con cantidades crecientes (4.8  $\mu$ g, 9.6  $\mu$ g y 19.2  $\mu$ g) de proteína recombinante mAIF $\Delta$ 1-101, obtenida según lo descrito en el apartado 3.5.4.2.

4.2.2.3. Actividad de la apoproteína mAIF $\Delta$ 1-101.

Tras la incubación de apoAIF recombinante de ratón con núcleos aislados de células Hela se observa la inducción de las características típicas de la apoptosis nuclear descritas anteriormente, entre las que se encuentran la condensación periférica de la cromatina y la pérdida de contenido total de DNA (Figura 4.22), como se demostró en el análisis por citometría de flujo (Figura 4.23), donde se utilizaron distintas preparaciones de apoAIF, con idéntico resultado.





**Figura 4.22.** Núcleos de células He-La incubados a 37°C en presencia de apoproteína AIF 1-101 recombinante y teñidos posteriormente con DAPI. Se observa la inducción de las características típicas de la morfología de las fases iniciales de la apoptosis nuclear, entre las que se encuentran la condensación periférica de la cromatina y la pérdida de contenido total de DNA.

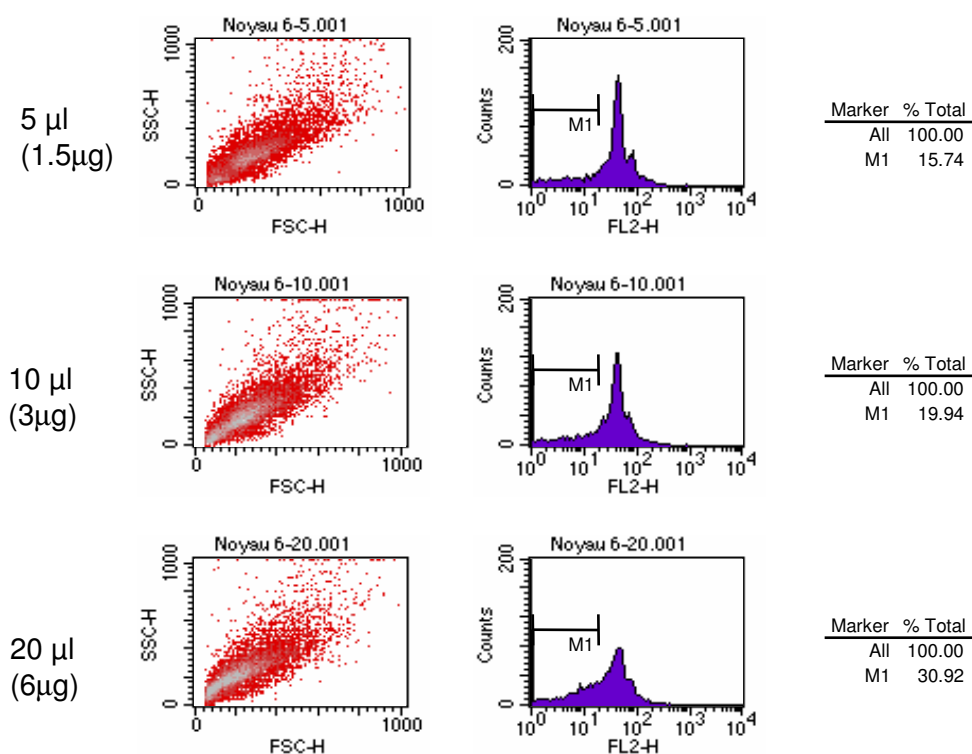
mAIF APO $\Delta$ 1-101

Figura 4.23. Actividad apoptogénica de mAIF $\Delta$ 1-101. Análisis por citometría de flujo de los núcleos aislados tratados con cantidades crecientes (1.5  $\mu$ g, 3  $\mu$ g y 6  $\mu$ g) de apoproteína recombinante mAIF $\Delta$ 1-101, obtenida según lo descrito en el apartado 3.5.7.2.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos con el extracto del espacio intermembrana y el extracto mitocondrial total se observa que el efecto producido sobre los núcleos es mayor cuando se utiliza AIF recombinante, ya sea en forma de holoproteína o apoproteína.

### 4.2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF EN PRESENCIA DE Hsp70.

Se ha estudiado la actividad redox de mAIF $\Delta$ 1-120 para la transferencia de un electrón y de dos electrones (véase apartado 3.6.1.1), mediante los ensayos con NBT y DPIP, en presencia de Hsp70, una proteína de choque térmico que inhibe la capacidad apoptogénica de AIF (Ravagnan *et al.*, 2001). Se utilizó la proteína Hsp27 como control, ya que esta proteína no afecta a la actividad apoptogénica de AIF. Se estudiaron las siguientes relaciones molares AIF:Hsp70/27: 1:1, 1:2.5 y 1:5.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.24. Cuando se analiza la actividad DPIP se observa que la presencia de Hsp70 no afecta a la actividad redox de AIF de modo significativo. La actividad NBT reductasa disminuye en presencia de Hsp70 pero también de Hsp27, en mayor medida en relación molar 1:5 (50% de actividad, aproximadamente). Esto muestra un resultado artefactual para el ensayo con NBT, que puede ser debido a efectos estéricos que dificultan la interacción con el solvente.

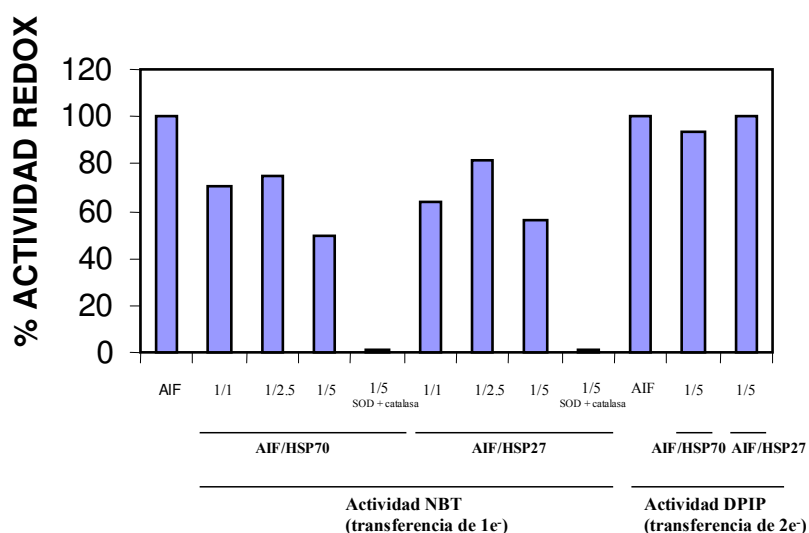


Figura. 4.24 Actividad diaforasa de mAIF $\Delta$ 1-120 para la transferencia de un electrón (aceptor NBT) y de dos electrones (aceptor DPIP) en presencia Hsp70, a diferentes razones molares (AIF:Hsp70): 1:1, 1:2.5 y 1:5. Se utilizó como control Hsp27.



En conjunto, el resultado de la actividad redox de mAIF $\Delta$ 1-120 con DPIP como aceptor de electrones en presencia de Hsp70 muestra que la función apoptogénica de AIF es independiente de su función redox, ya que Hsp70 inhibe su actividad apoptogénica pero no su actividad redox.



**4.3 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
MOLECULARES IMPLICADOS EN LA  
ACTIVIDAD REDOX DE AIF  
(APOPTOSIS-INDUCING FACTOR)**

### 4.3 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF (APOPTOSIS-INDUCING FACTOR).

#### 4.3.1 IDENTIFICACION DE RESIDUOS IMPLICADOS EN LA TRANSFERENCIA ELECTRONICA DE AIF.

Con objeto de estudiar los aminoácidos implicados en la función redox se llevaron a cabo una serie de estudios encaminados a la identificación de estos residuos y poner de manifiesto su función mediante la caracterización de proteína recombinante AIF $\Delta$ 1-102 mutante.

En primer lugar, se ha realizado un análisis basado en el conocimiento estructural de AIF. Se han identificado los posibles aminoácidos esenciales para la función redox en base a la estructura de la proteína (Maté *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2002). Además, esta estructura presenta una gran homología con BphA4, estando algunos de estos residuos conservados, al igual que en toda la familia de las glutation reductasas (Senda *et al.*, 2000; Maté *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2002). En la figura 4.25 se muestra el sitio activo de mAIF (Maté *et al.*, 2002). Todavía no se ha obtenido la resolución de la estructura cristalina del complejo [AIF:NADH] por lo que en esta figura el NAD se ha posicionado de forma análoga a la estructura del complejo proteína:NAD de sus proteínas homólogas cristalizadas.

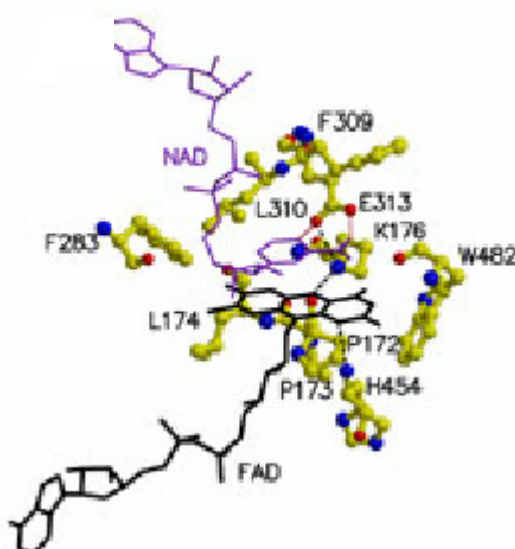


Figura 4.25. Sitio activo de AIF de ratón. Se muestran los residuos del entorno del FAD. El NAD<sup>+</sup> está posicionado por analogía con otras flavoproteínas bacterianas. Maté *et al.*, 2002.

Se considera que los residuos de mAIF K176 y E313 pueden estar implicados en la transferencia electrónica entre NADH y FAD por su localización en el sitio activo, porque pueden formar un puente salino entre ellos y además son residuos evolutivamente conservados. En AIF humana se corresponden con los residuos K177 y E314, respectivamente. En el sitio activo de la estructura de AIF de ratón el átomo N5 del anillo de isoaloxacina del FAD estabiliza un puente de hidrógeno con el N $\zeta$  de la lisina 176 (3.0Å), el cual forma un puente salino con el glutámico 313 (2.8Å) (5). Estos residuos están conservados no solo en BphA4 y en enzimas relacionados con la familia de la glutathion reductasa, tales como la propia glutathion reductasa (GR), tripanotona reductasa y dihidrolipoamida deshidrogenasa, sino entre todas las ferredoxin reductasas dependientes de NADH componentes de una cadena de transporte electrónico con una oxigenasa como componente final. Esto sugiere que deben tener alguna relación funcional con la transferencia electrónica. En BphA4 estos residuos se corresponden con la lisina 53 y el glutámico 159, donde el átomo O4 del anillo de isoaloxacina forma un puente de hidrógeno con el átomo N $\eta$  de la lisina 53 (2.7Å) el cual forma un puente salino con el átomo O $\epsilon$  del glutámico 159 (2.7Å), el cual forma un puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo de nicotinamida del NADH (Senda *et al.*, 2000).

Debido a que la mutación por alanina de estos residuos no modificó significativamente la transferencia electrónica en el ensayo NBT reductasa (Maté *et al.*, 2002) se han sustituido en hAIF $\Delta$ 1-102 estos residuos (polares con carga electrónica) por otros que puedan afectar más la actividad redox. En este caso, la lisina 177 se ha sustituido por triptófano, un residuo con anillo indol, típicamente apolar y más voluminoso, con lo cual se modifica el entorno del sitio activo de forma estérica. Por otra parte, el glutámico 314 se ha cambiado por serina, un residuo también polar, pero sin carga. Además se ha realizado el mutante doble K177W/E314S, el cual se espera que produzca un efecto más drástico sobre la transferencia electrónica, de estar implicados estos residuos en la misma.

El residuo F310 de AIF humano se corresponde con el residuo F309 de AIF de ratón. Este residuo no está conservado en BphA4 ni rubredoxin reductasa, donde existe valina. En BphA4 este residuo se corresponde con la valina 155, la cual sufre un cambio conformacional en la unión del NADH, desplazándose 0.8Å. De esta forma el anillo de nicotinamida queda en una disposición en sandwich respecto al anillo de isoaloxacina y la cadena lateral de la valina 155. En putidaredoxin reductasa y en glutathion reductasa (GR) hay una tirosina. En esta última este residuo se mueve para dejar interaccionar la nicotinamida con el anillo de isoaloxacina. Por lo tanto, como la disposición espacial de

los anillos de isoaloxacina y nicotinamida es similar entre BphA4 y GR se ha sugerido que esta función de “puerta” podría estar desempeñada por la fenilalanina 309 en mAIF (Maté *et al.*, 2002). Esta disposición parece ser favorable para la transferencia electrónica entre NADH y FAD. Por tanto, se diseñó el mutante F310G en hAIF $\Delta$ 1-102 con el fin de modificar la posible interacción de Van der Waals que pudiera ejercer la fenilalanina en la formación del complejo AIF:NADH, y para ello se cambió por un residuo que no forma este tipo de interacción, y que además es un residuo polar, la glicina.

La P173 de hAIF $\Delta$ 1-102 también es un residuo ampliamente conservado en todas las ferredoxin reductasas NADH dependientes acopladas a una cadena de transporte electrónico con una oxigenasa como componente final. Se corresponde con la P49 de BphA4 y se ha sugerido que es un residuo importante para el posicionamiento del anillo de isoaloxacina al interaccionar desde su lado *si* como un soporte interno (Senda *et al.*, 2000). Para determinar la importancia del residuo P173 en la actividad redox de hAIF $\Delta$ 1-102 se diseñó el mutante P173G, donde se sustituyó la prolina por glicina, lo cual supone una disminución importante de la interacción estérica con el grupo prostético FAD, lo cual permitiría una mayor movilidad del mismo con un afecto desfavorable para la actividad redox de hAIF $\Delta$ 1-102.

El residuo W483 de AIF humano se corresponde con el residuo W482 de ratón. Tanto en AIF como en las reductasas NADH dependientes similares a BphA4 está conservada la secuencia Trp-Ser-Asp en el lado *si* del anillo de isoaloxacina. En BphA4 este Trp (320) está bastante expuesto al solvente y se ha demostrado la implicación de este residuo en la transferencia electrónica desde el FAD reducido al cluster [2Fe-2S] de la ferredoxina (Senda *et al.*, 2007). Además la pteridina del FAD presenta una interacción de van der Waals con la cadena lateral del Trp 320 y, por otra parte, en la formación del complejo BphA4:NADH el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena principal del Trp 320 forma un puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo de nicotinamida (Senda *et al.*, 2000). En AIF, sin embargo, este Trp parece estar protegido de su contacto con el solvente por mediación de la región helicoidal del extremo C-terminal (Maté *et al.*, 2002), la cual está ausente en BphA4 (Senda *et al.*, 2000). El objetivo del mutante W483G en hAIF $\Delta$ 1-102 es modificar la estabilidad de la unión del grupo prostético FAD, además de estudiar si afecta a la reoxidación de la proteína, tal y como se ha demostrado para la proteína homóloga BphA4 (Senda *et al.*, 2000).

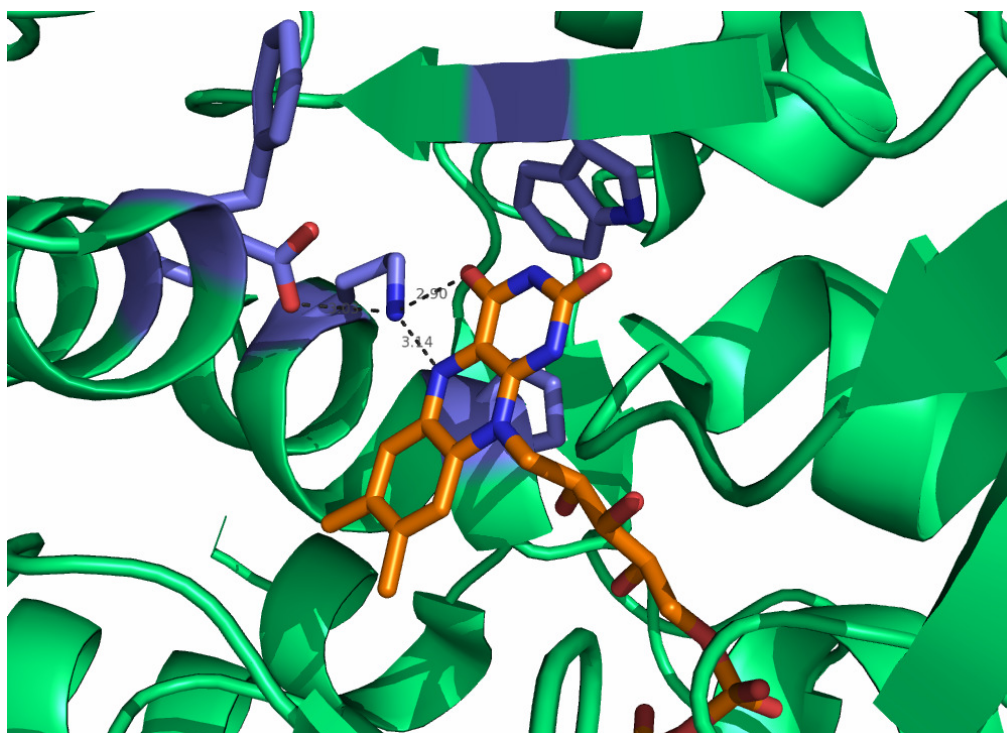


Figura 4.26. Sitio activo de hAIF obtenido a partir de la resolución de la estructura cristalina (Ye et al., 2002). Centro activo de AIF humana (código PDB: 1m6i). El FAD se representa en varillas, coloreado por tipo de átomo con los carbonos y fosfatos en naranja. Los residuos mutados del centro activo mutados en el presente trabajo se representan también en varillas, pero con los carbonos en morado. Se muestran también las interacciones en las que participa la cadena de Lys177. El átomo N5 del anillo de isoaloxacina del FAD estabiliza un puente de hidrógeno con el N $\zeta$  de la lisina 177 (3.14 Å), el cual forma un puente salino con el glutámico 314 (3.03Å). Figura producida con PyMOL (DeLano, 2002).

Por todo lo expuesto se abordó el llevar a cabo los mutantes correspondientes a F310G, K177W, E314S, P173G y W483G, junto con el doble mutante K177W/E314S en hAIF $\Delta$ 1-102, en lugar de mAIF $\Delta$ 1-101, ya que se consideró de mayor interés utilizar la proteína humana con la perspectiva de estudios futuros. Además, interesaba disponer de proteínas similares a la proteína salvaje, que tuvieran actividad apoptogénica pero carecieran de actividad redox, para poder estudiar su actividad apoptogénica de modo individualizado. Por ello se realizaron estas mutaciones en el centro activo del enzima, y que además introducían una mutación no conservativa, ya que, a pesar de proporcionar menos información desde el punto de vista cinético, si permitían obtener datos para el mecanismo general de transferencia electrónica respecto a la reacción de reducción con NADH y también para futuros estudios de apoptosis.





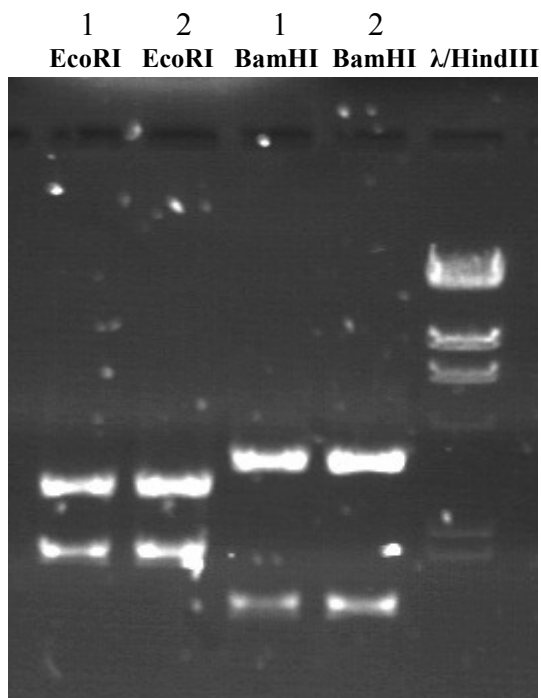


Figura 4.28. Análisis de la direccionalidad del inserto hAIF en pBSK. Digestión de pBSK con inserto hAIF con los enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. 1 y 2 son plásmidos pBSK con inserto hAIF digeridos con *EcoRI* y *BamHI* obtenidos de diferentes colonias de células.

La enzima de restricción *BamHI* corta en la posición 501 de la secuencia genómica de hAIF y *EcoRI* corta en la posición 701 del vector pBSK. Por tanto la inserción de hAIF en pBSK presenta la direccionalidad adecuada, ya que el corte teórico en sentido directo con *BamHI* origina dos fragmentos, uno de 1423 pb y otro de 3501, coincidente con lo obtenido en la digestión del plásmido pBSK con inserto hAIF (Figura 4.28), y que juntos suman 4924 pb, las obtenidas para el vector pBSK con inserto hAIF. Si el corte se hubiera producido en la dirección antisentido los fragmentos resultantes serían de 4423 pb y 519 pb.

#### 4.3.2.2. Reacciones de mutagénesis dirigida.

Las mutaciones estudiadas en este trabajo se realizaron directamente por PCR sobre el plásmido pBSK, a excepción del mutante P173G, que se realizó sobre el plásmido pET28a, según se describe en el apartado 3.4.3. El mutante doble K177W/E314S se realizó mediante corte de fragmentos de los mutantes individuales con enzimas de restricción y posterior ligación de los mismos (ver apartado 3.4.4). Las mutaciones individuales diseñadas para hAIF son: K177W, F310G, E314S, W483G. También se diseñó una reacción de PCR para obtener los dobles mutantes son K177W

E314S y F310G W483G y mutante cuádruple K177W/E314S/F310G/W483G (ver apartado 4.3.2.2), aunque resultó inefectiva.

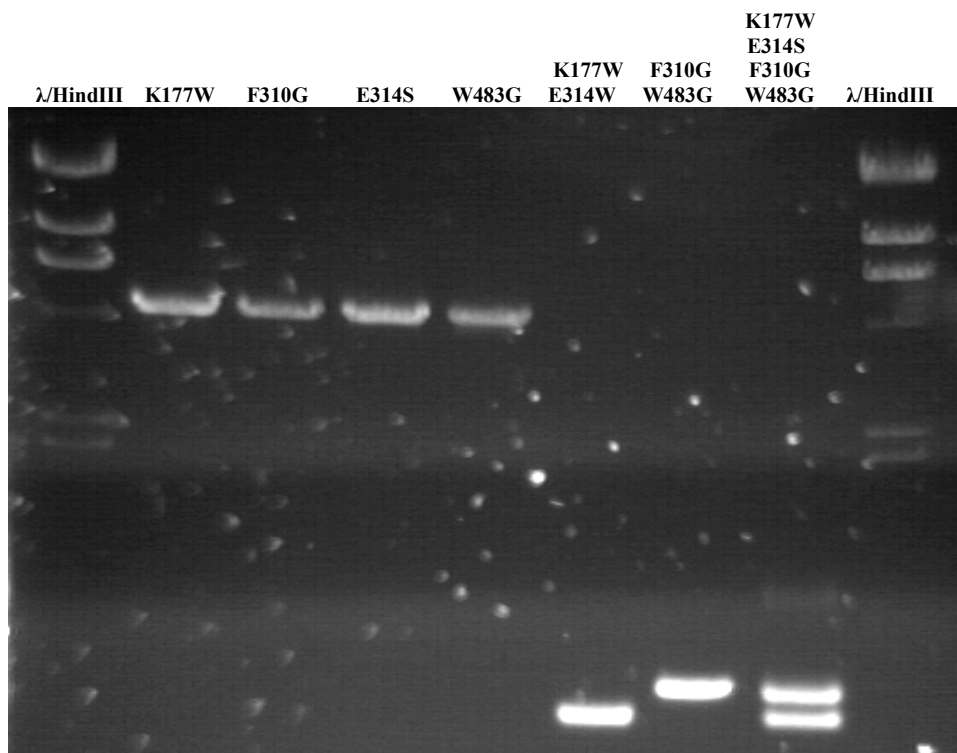


Figura 4.29. Análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR para mutagénesis dirigida en los mutantes de hAIF K177W, F310G, E314S, W483G mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargaron 5  $\mu$ l de marcador  $\lambda$ HindIII a cada lado, que presenta las siguientes bandas de mayor a menor (arriba abajo en el gel), en pares de bases (pb): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564. Para cada muestra se añadieron 5  $\mu$ l de producto de PCR y 1  $\mu$ l de buffer DNA (6X).

Se puede observar que la PCR es correcta para todos los mutantes individuales, pero no se obtuvo producto de PCR para los mutantes dobles ni el cuádruple.

#### 4.3.2.3 Análisis de la mutagénesis.

Tras el tratamiento con la enzima *DpnI*, transformación de células competentes y cultivo, se aisló DNA plasmídico (ver apartado 3.4.1.1) y se realizó el análisis por restricción de los sitios introducidos por mutación silenciosa para verificar la presencia de la mutación introducida.

El resultado se observa en la figura 4.30.

λ/HindIII <-----K177W(SacI)-----><-----F310G (SacI)-----> <-----E314S (NheI)-----> W483G(ClaI)  
λ/HindIII

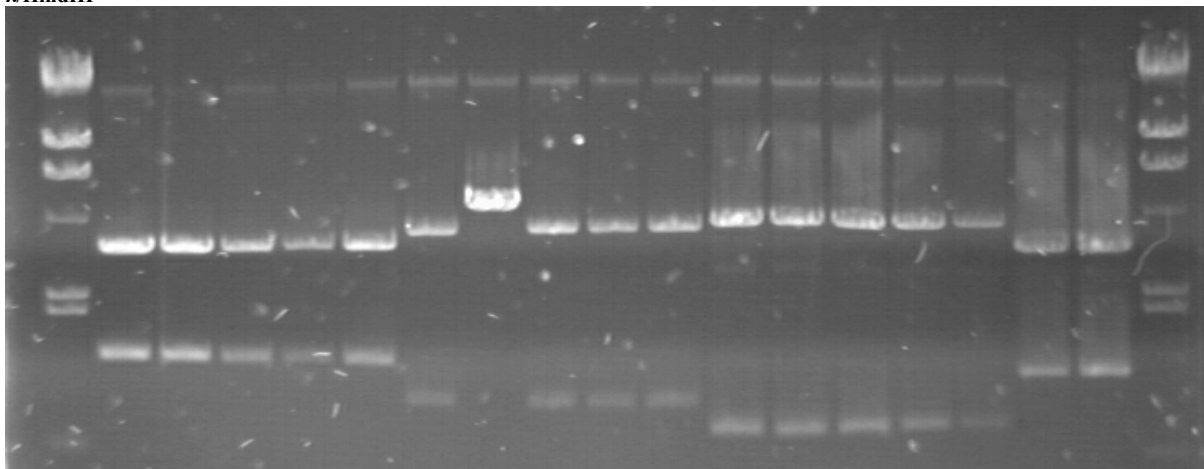


Figura 4.30. Gel de electroforesis de agarosa al 1% donde se realizó el análisis por restricción de los sitios introducidos por mutación silenciosa para verificar la presencia de la mutación introducida en cada mutante.

Se puede observar que todas las colonias son positivas para la mutagénesis excepto el segundo clon del mutante F310G.

Se realizó un mapa de restricción (Figura 4.31.) como aproximación para comprobar que no se hubieran generado otras mutaciones durante la PCR utilizando las enzimas *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Stu*I, *Xba*I, *Xho*I

*BamHI BglIII ClaI EcoRI HindIII NcoI NdeI NheI NotI PstI PvuII SacI SmaI XbaI XhoI*

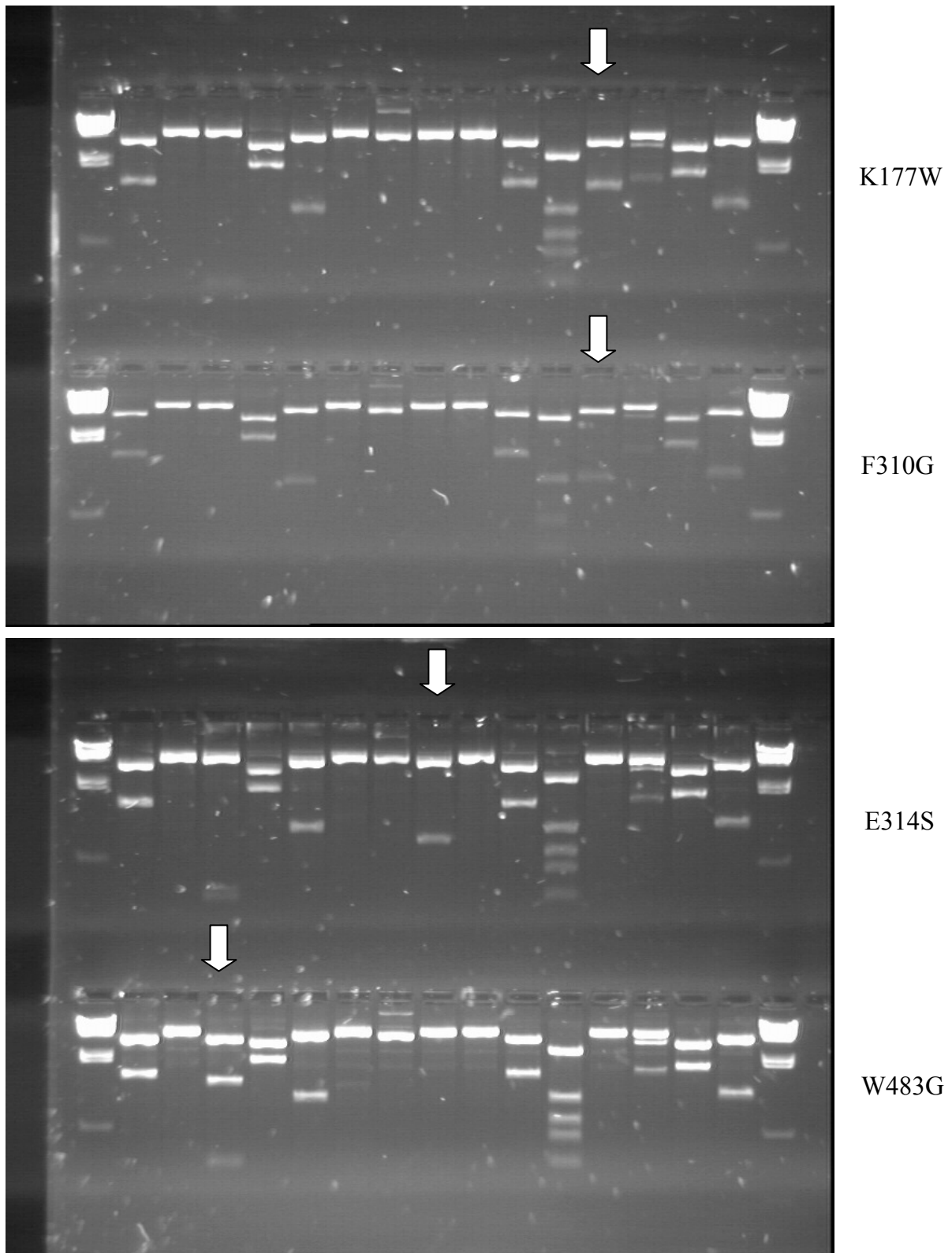


Figura 4.31. Mapa de restricción de los mutantes K177W, F310G, E314S y W483G.

Se puede observar que el mapa de restricción es correcto para todos los mutantes.

#### 4.3.2.4. Mutantes dobles.

Dado que el resultado de la PCR para la obtención de estos mutantes fue negativo se obtuvieron mediante restricciones y ligación, un método más laborioso pero también más fiable para evitar mutaciones espontáneas originadas en la reacción de PCR. Los mutantes K177 y E314 se cortaron por *HindIII* y los mutantes F310 y W483 se cortaron por *XhoI*.

Se cortaron las siguientes bandas de pBSK hAIF en los diferentes mutantes :  
fragmento de 1000 pb aproximadamente. (177 *HindIII*)  
fragmento de 4 kb aproximadamente. (314 *HindIII*)  
fragmento de 1200 pb aproximadamente (310 *XhoI*)  
fragmento de 3 kb aproximadamente. (483 *XhoI*)

A partir de las bandas correspondientes a los fragmentos de interes se aisló DNA con el kit de purificación de Quiagen QIAquick Gel Extraction Kit.

Tras ligación del fragmento de 1000 pb con la mutación K177W y el fragmento de 4kb con la mutación E314S se obtuvo el mutante doble K177W/E314S y tras la ligación del fragmento de 1200 pb con la mutación F310G y el fragmento W483G se obtuvo el mutante doble F310G/W483G.

Tras la transformación de células competentes XL2 y cultivo en placas con ampicilina se aisló DNA plasmídico y se hizo la restricción con los sitios introducidos por mutación silenciosa para comprobar la presencia de la doble mutación, en cada caso.

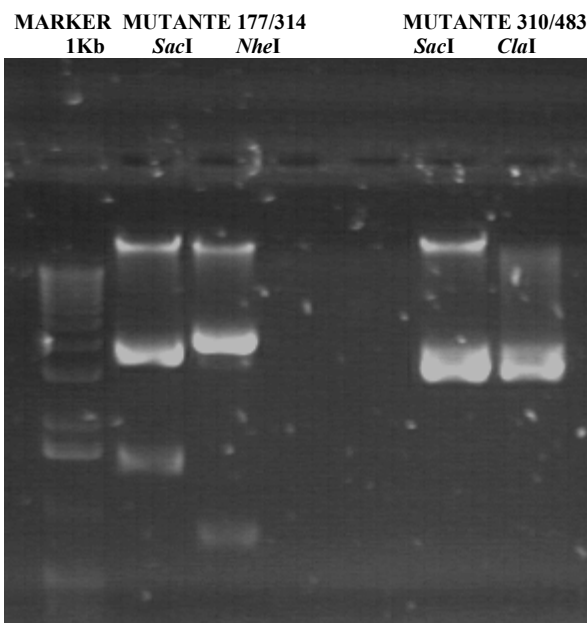


Figura 4.32. Análisis por enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1% de la presencia de las dobles mutaciones K177W/E314S y F310G/W483G.

Podemos observar en el mutante doble K177W/E314S las bandas correspondientes a los dos sitios de restricción de cada mutante individual mientras que el mutante doble F310G/W483G no se fragmentó correctamente y solo se observa la presencia de la banda originada por el sitio de restricción del mutante F310G.

#### 4.3.2.5. Clonación en pET de hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y sus mutantes.

##### *Preparación de pET*

A partir de pET con inserto (mAIF  $\Delta$ 1-101) se realizó una restricción con *NdeI* y *NotI* para obtener plásmido pET cortado y poder introducir el inserto hAIF  $\Delta$ 1-102.

Tras la electroforesis en gel de agarosa al 0.5% se cortó una banda entre 5000 y 6000 pb que se corresponde con el pET cortado por *NdeI* y *NotI* (5300 pb) (Figura 4.33)

##### ***Preparación del inserto hAIF $\Delta$ 1-102.***

Para la clonación de hAIF se tuvo que crear el sitio de restricción *NdeI* mediante reacción de PCR (véase Materiales y métodos, apartado 3.4.5.2.). Se diseñó un oligonucleótido directo que se crea un sitio de restricción *NdeI* a la vez que se elimina la secuencia de localización mitocondrial de la proteína (aminoácidos 1 al 102). De esta forma se obtiene el fragmento hAIF  $\Delta$ 1-102 con los sitios de restricción necesarios para

su clonación en pET28a. En 5' también se creó un sitio *EcoRI* previo a *NdeI* para poder cortar el sitio *NdeI* de forma eficaz. Como oligonucleótido reverso se utilizó el T3 terminador del pBSK. La PCR se realizó tal y como se describe en el apartado 3.4.5.2. El DNA correspondiente al inserto hAIF  $\Delta$ 1-102 salvaje y el correspondiente a cada mutante se aisló y purificó. El análisis de estos fragmentos puede observarse en la figura 4.33.

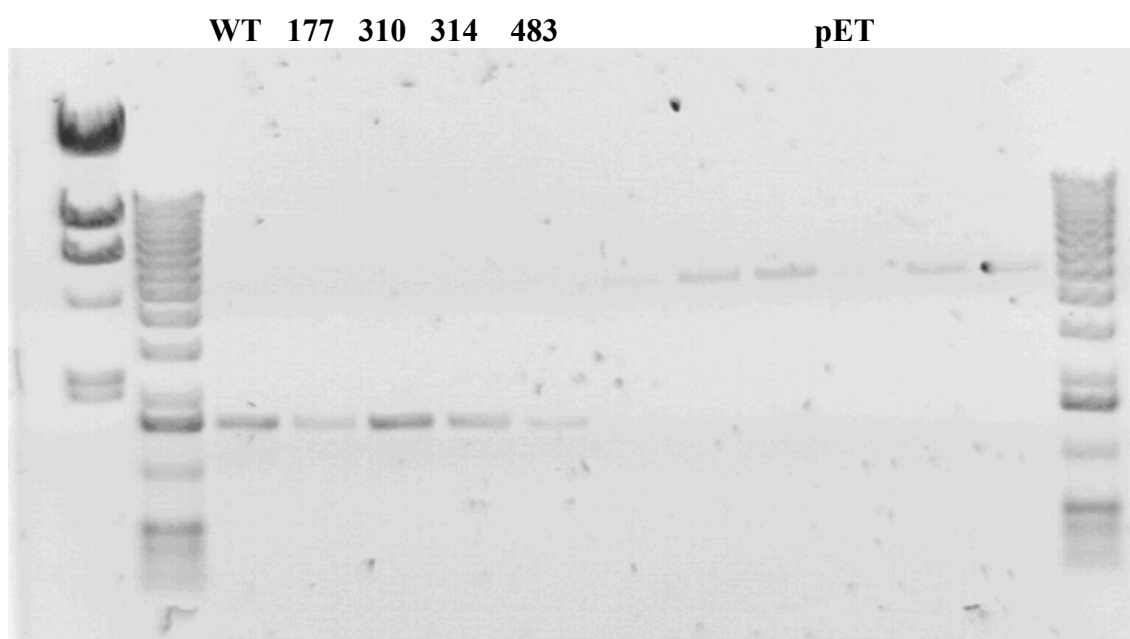


Figura 4.33. Análisis de los fragmentos de DNA hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y sus mutantes K177W, F310G, E314W y W483G mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%. Se añadieron 5  $\mu$ l de DNA para hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y los diferentes mutantes, con los sitios de restricción *NdeI* y *NotI*. Al lado se cuantifica el plásmido pET cortado con *NdeI* y *NotI*. Los marcadores utilizados fueron  $\lambda$ /*HindIII* a la izquierda, que presenta las siguientes bandas de mayor a menor (arriba abajo en el gel), en pares de bases(pb): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 y 564; y el marcador de 1Kb a la derecha.

Podemos observar que el producto de PCR es correcto para todos los mutantes. Por otra parte podemos ver que hay suficiente plásmido pET28a cortado para ligarlo con hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y los diferentes mutantes.

La ligación de pET28a y hAIF $\Delta$ 1-102 salvaje y los diferentes mutantes se llevó a cabo como se indica en el apartado 3.4.5. Se transformaron células supercompetentes XL2 y se cultivaron las células en placas petri con kanamicina (ver apartado 3.2.1.1). Tras el cultivo de las colonias obtenidas se aisló plásmido y se hizo la restricción con

las enzimas *NdeI* y *NotI*, la cual libera el inserto en cada caso, para comprobar la clonación en pET entre los sitios de elección.

Como el vector pET28a para la clonación se obtuvo a partir de pET con inserto mAIF, se comprobó que el inserto obtenido era hAIF y no mAIF. Para diferenciar hAIF de mAIF se hizo una restricción de los plásmidos con inserto con *XhoI* (mAIF no tiene este sitio de restricción, solamente el plásmido pET y hAIF) según se describe en el apartado 3.4.5. El resultado para el plásmido con hAIF salvaje se muestra en la figura 4.34, donde se observa el fragmento resultante de la digestión con *XhoI*. Por tanto el vector pET tiene como inserto hAIF. Esto se comprobó para cada uno de los mutantes.

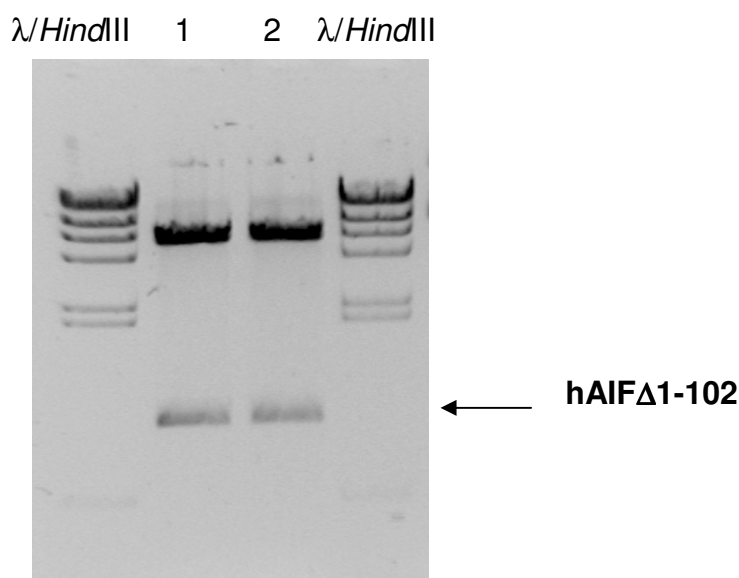


Figura 4.34. Análisis del inserto hAIF en pET mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos obtenidos por digestión con *XhoI*. 1 y 2 es el DNA plasmídico pET con inserto digerido aislado de dos colonias diferentes.

### 4.3.3 OBTENCION Y PURIFICACION DE hAIF $\Delta$ 1-102.

#### 4.3.3.1 Expresión de hAIF $\Delta$ 1-102

Las pruebas de expresión en diferentes clones de células BL21(D3) con inserto hAIF $\Delta$ 1-102 se realizaron como se indica en el apartado 3.5.3.2 .



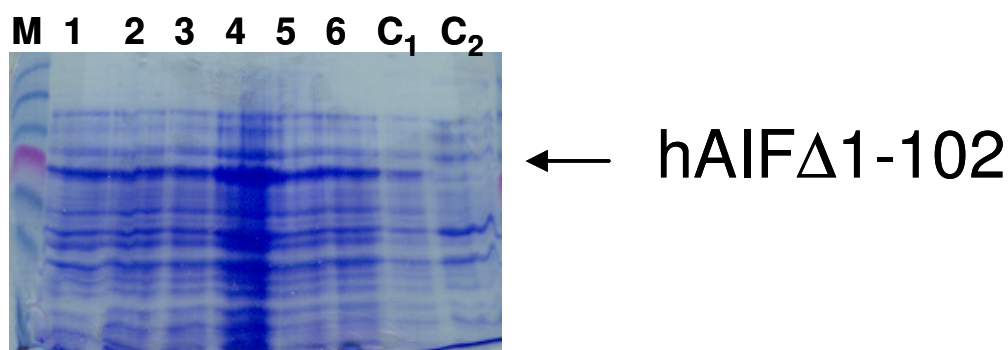


Figura 4.35. Análisis de la expresión de hAIF $\Delta$ 1-102 en diferentes clones de células BL21(D3) con plásmido de expresión pET28a con el inserto hAIF $\Delta$ 1-102. M: Marcador de peso molecular. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son diferentes clones de células. C1 es un control de células BL21(D3) sin inducción con IPTG y C2 un control negativo de expresión de células BL21(D3) sin plásmido.

La sobreexpresión de cada uno de los mutantes fue similar a la obtenida para la proteína salvaje.

#### 4.3.2.2. Purificación de hAIF $\Delta$ 1-102.

Las proteína se purificó según se describe en el apartado 3.5.4.2.

#### 4.3.2.3. Propiedades de hAIF $\Delta$ 1-102.

##### *Propiedades espectrales.*

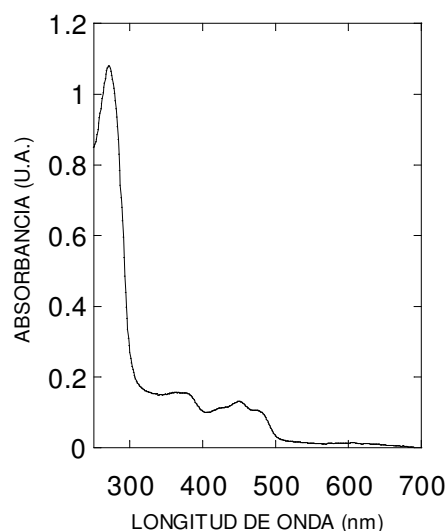


Figura 4.36. Espectro UV-VIS de hAIF $\Delta$ 1-102. El espectro se realizó en Tris/HCl 50 mM, pH 8, a temperatura ambiente. Se pueden observar máximos a 451 y 380 nm, correspondientes a las transiciones I y II de la flavina, respectivamente.

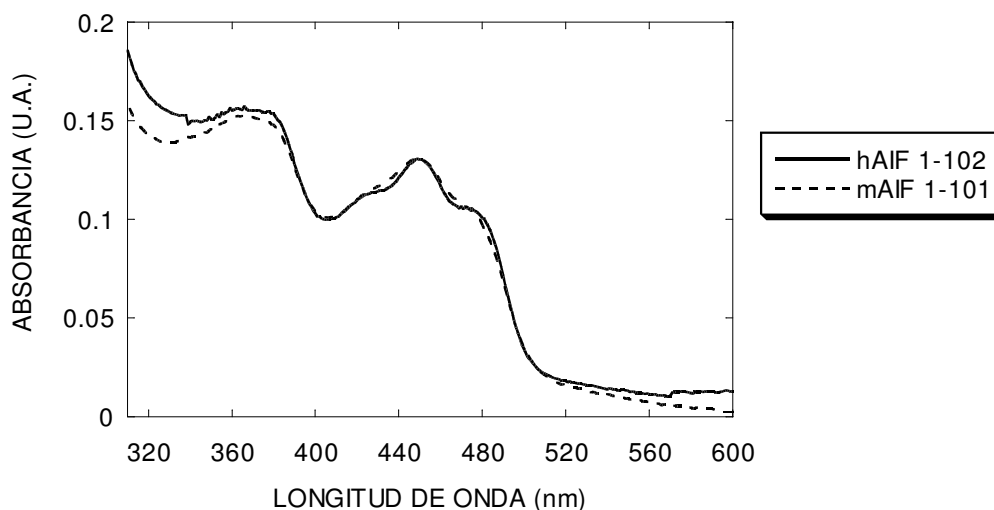


Figura 4.37. Espectros de absorción en el visible de hAIF $\Delta$ 1-102 (6xHis) y mAIF $\Delta$ 1-101(6xHis). Los espectros se realizaron en Tris/HCl 50mM, pH8, a temperatura ambiente.

Los máximos de absorción de las transiciones I y II de la flavina (450 y 380 nm) (Müller, 1991) no se encuentran desplazados entre hAIF $\Delta$ 1-102 (6xHis) y mAIF $\Delta$ 1-101(6xHis) (Figura 4.37). El coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) a 451 nm, calculado según se indica en el apartado 3.5.9.1 es  $15.37 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Tabla 4.2).

#### *Determinación del punto isoeléctrico de hAIF $\Delta$ 1-102*

Se han determinado los siguientes puntos isoeléctricos para hAIF $\Delta$ 1-102, según se describe en el apartado 3.5.1.2.

pIs: 7\*, 6.8\*, 6.7, 6.55, 6.4, 6.3, 6\*, 5.8, 5.75, 5.6, 5.5

(\*) Formas mayoritarias

#### *Potencial redox de hAIF*

Se ha determinado el potencial redox de hAIF según se describe en el apartado 3.5.14. En este caso, se han obtenido dos potenciales redox, correspondientes a dos transferencias de un electrón consecutivas: -326 y -360mV  $\pm$  10mV a pH 7.5 y 20°C.

#### 4.3.4. FORMAS MUTADAS DE hAIF $\Delta$ 1-102.

Las mutaciones estudiadas en este trabajo se realizaron directamente sobre el plásmido pBSK, a excepción del mutante P173G, que se realizó sobre el plásmido pET28a, según se describe en el apartado 3.4.3. El mutante doble K177W/E314S se realizó mediante corte de fragmentos de los mutantes individuales con enzimas de restricción y posterior ligación de los mismos (apartado 3.4.4). Se seleccionaron colonias con la mutación deseada, mediante la presencia de la mutación silenciosa introducida, que permite el corte con un enzima de restricción específico ausente en la forma no mutada (ver apartado 3.4.3) y se comprobó la secuencia mediante secuenciación del ADN (ver apartado 3.4.6). Los insertos correspondientes a las diferentes formas de hAIF $\Delta$ 1-102 se clonaron en el vector de expresión pET28a, según se describe en el apartado 3.4.5. Se seleccionaron las colonias que presentaban el plásmido con el inserto mediante corte con enzima de restricción únicamente presente en éste último. Las colonias con la mutación P173G se seleccionaron mediante secuenciación del ADN.

##### 4.3.4.1. Análisis de la expresión de las formas mutadas de hAIF $\Delta$ 1-102

Las colonias seleccionadas, que contenían la mutación deseada en el plásmido de expresión pET28a, se sometieron a una prueba de expresión (ver apartado 3.5.3.2), con resultado similar al de la proteína salvaje (Figura 4.35).

##### 4.3.4.2 Purificación de las formas mutadas de hAIF $\Delta$ 1-102.

Las proteínas se purificaron según se describe en el apartado 3.5.4.2. En la figura 4.38 se observa el proceso de purificación de hAIF. A medida que se trata la columna con imidazol las proteínas retenidas en la misma eluyen en la fase móvil.

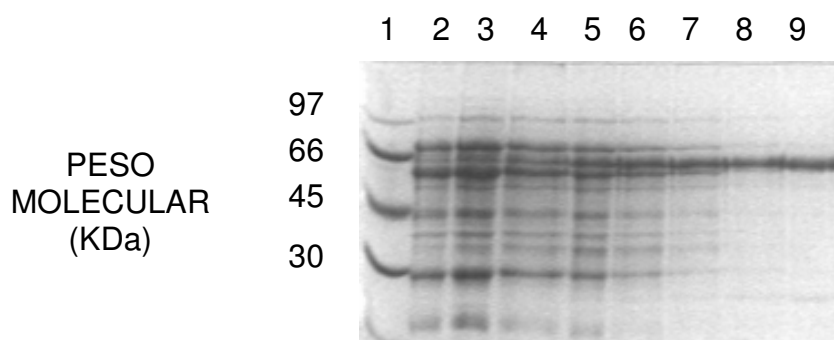


Figura 4.38. Diferentes fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol durante la purificación de hAIF $\Delta$ 1-102.

En la figura 4.39 se muestra la pureza de las proteínas recombinantes purificadas de AIF humano salvaje y los mutantes diseñados.

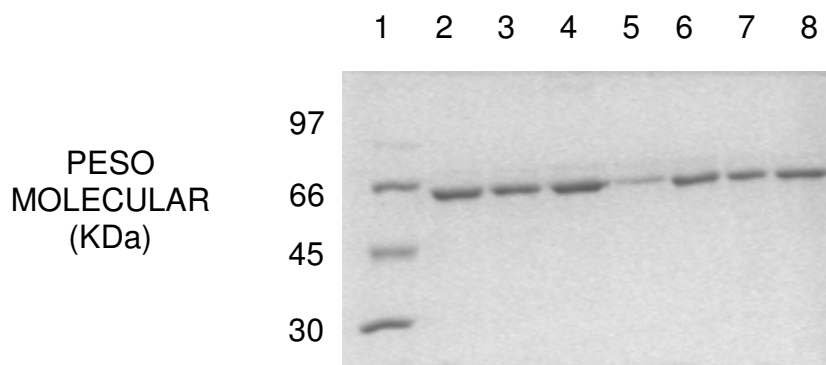


Figura 4.39. Proteínas purificadas de AIFΔ1-102 humana y los mutantes del sitio activo. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida. 1: Peso molecular (KDa), 2: hAIFΔ1-102 salvaje, 3: hAIFΔ1-102 F310G, 4: hAIFΔ1-102 W483G, 5: hAIFΔ1-102 E314S, 6: hAIFΔ1-102 K177W, 7: hAIFΔ1-102K177W/E314S, 8: hAIFΔ1-102 P173G. En cada carrera se cargaron 5 μg de proteína, con excepción del n°5, correspondiente a hAIFΔ1-102 E314S, con 1μg.

Los rendimientos de las purificaciones, generalmente de 1%, fueron muy dispares en algunos mutantes, probablemente debido a la baja estabilidad de las proteínas mutadas en estos casos y a pérdidas por precipitación. En la tabla 4.2 se muestran los valores de los puntos isoelectricos teóricos, la masa molecular teórica para las apoproteínas y holoproteínas y la concentración de proteína total para la proteína salvaje y los mutantes.

Proteína	pI teórico	Mw teórica Apoproteína (Da)	Mw teórica Holoproteína (Da)	C total (g/l)	C total ( $\mu$ M)	$\epsilon$ real $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda$
hAIF $\Delta$ 1-102 WT	7.29	57993.99	58823.49	1.14	19.38	15.37	450
hAIF $\Delta$ 1-102 F310G	7.29	57903.87	58733.37	0.62	10.55	18.55	445
hAIF $\Delta$ 1-102 W483G	7.29	57864.83	58694.33	0.43	7.32	14.75	451
hAIF $\Delta$ 1-102 K177W	6.99	58052.03	58881.53	0.39	6.62	14.32	442
hAIF $\Delta$ 1-102 E314S	7.77	57951.96	58781.46	0.47	7.99	16.53	441
hAIF $\Delta$ 1-102 K177W/E314S	7.29	58009.99	58839.49	0.75	12.74	15.45	441
hAIF $\Delta$ 1-102 P173G	7.29	57953.93	58783.43	1.3	22.11	18.46	444

Tabla 4.2. Valores teóricos de los puntos isoeléctricos y masa molecular de la apoproteína y holoproteína de la proteína salvaje humana, así como de los diferentes mutantes, calculados con la secuencia N-terminal de 23 aminoácidos MGSSHHHHHSSGLVPRGSH. El FAD tiene un peso molecular de 829.5 Da.  $\lambda$  es la longitud de onda del máximo correspondiente al FAD.

#### 4.3.5. PROPIEDADES DEL MUTANTE hAIF $\Delta$ 1-102 F310G.

Se diseñó la mutación de este residuo de fenilalanina a glicina porque es una mutación drástica, pero sin implicar un cambio de carga, y el objetivo, como se ha comentado anteriormente fue obtener un mutante con una actividad redox mínima, ya que este residuo podría estar implicado en la interacción de AIF con el donador de electrones NADH y/o en la transferencia NADH-FAD, además de estabilizar el entorno de la flavina (ver Figura 4.26).

##### 4.3.5.1. Conservación del residuo F310 en otras proteínas.

La F310 es un residuo muy conservado entre todas las especies de AIF. En la figura 4.40 se muestra la conservación de este residuo en AIF de rata, AIF de ratón, el homólogo de AIF de la ameba multicelular *Dictyostelium discoideum* y AIF humana.

AIF rata	308	CF	LGSELACALGRK	SQ-ASGIEVIQLFPEKGNMGKLLPEYLSNWTMEKVKREGVKVMPNA	366
AIF ratón	308	CF	LGSELACALGRK	SQ-ASGIEVIQLFPEKGNMGKLLPEYLSNWTMEKVKREGVKVMPNA	366
AMID	151	GS	AGVEMAAEIKTEYP	---EKEVTLIHSQVALADKELLPVSRQEVKEILLRKGVQLLSE	207
AIF Dictyostelium	261	CF	LGSELTCAINSNFQ	-DKNIKIDQIFPESGVLSTLFFDYLSKYATEEIIKSGVNVHTGT	319
wah-1 <i>C. elegans</i>	419	CH	LASELSYSIKRKYG	--ENVVHGVFEEKYPAEDILPEHIAQKSIKSAISKGGVDVRAEQ	476
hAIF	309	CF	LGSELACALGRK	KAR-ALGTEVIQLFPEKGNMGKLLPEYLSNWTMEKVKREGVKVMPNA	367

Figura 4.40. Alineamiento de secuencias de AIF de diferentes organismos y proteínas homólogas. Se muestra con el cuadro la posición del residuo F310 de AIF humana, conservado en todos excepto en las proteínas homólogas AMID y Wah-1 de *C. elegans*. Se ha realizado mediante el programa Bioedit con la aplicación Clustal W.

#### 4.3.5.2. Propiedades espectrales.

El espectro de absorción de UV-VIS se encuentra reflejado en la figura 4.41 y, como se observa, presenta perturbaciones con respecto a la proteína salvaje, aunque conserva los dos máximos del visible a 378 y 450 nm. Aunque se trata de un residuo implicado en la interacción con NADH, sin duda el entorno de la flavina se encuentra afectado. El coeficiente de extinción calculado a 445 nm se muestra en la Tabla 4.2.

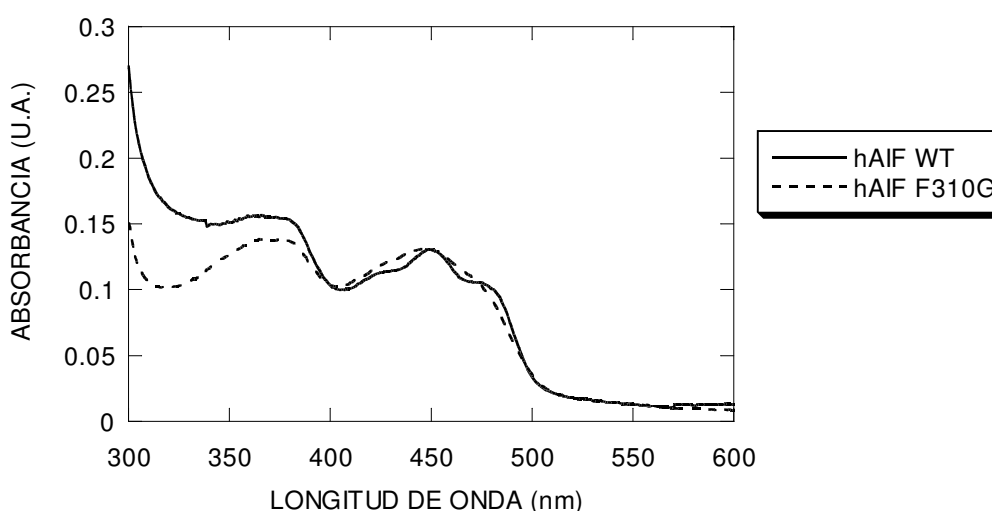


Figura 4.41. Espectros de absorción en el visible de hAIF $\Delta$ 1-102(6xHis)WT y hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis)F310G. Los espectros se realizaron en Tris/HCl 50mM, pH8, a temperatura ambiente.

#### 4.3.5.3. Determinación del punto isoeléctrico

Se han determinado los siguientes puntos isoeléctricos para hAIF $\Delta$ 1-102 F310G, según se describe en el apartado 3.5.1.2.

pIs: 7\*, 6.8\*, 6.55, 6\* (\*) Formas mayoritarias

El análisis de los puntos isoeléctricos muestra que se mantienen las formas mayoritarias de la proteína salvaje, ya que la mutación no implica cambio de carga eléctrica.

#### 4.3.5.4. Determinación del potencial redox

Se ha determinado el potencial redox del mutante F310G según se describe en el apartado 3.5.14. El potencial redox obtenido para este mutante es -20 mV a pH 7.5 y 20°C (Figura 4.42). Hay que señalar la dificultad de realización del mismo debido a problemas de precipitación de la proteína, con la consiguiente pérdida de calidad de la titulación. Sin embargo el potencial redox de este mutante es claramente más electropositivo que la proteína salvaje.

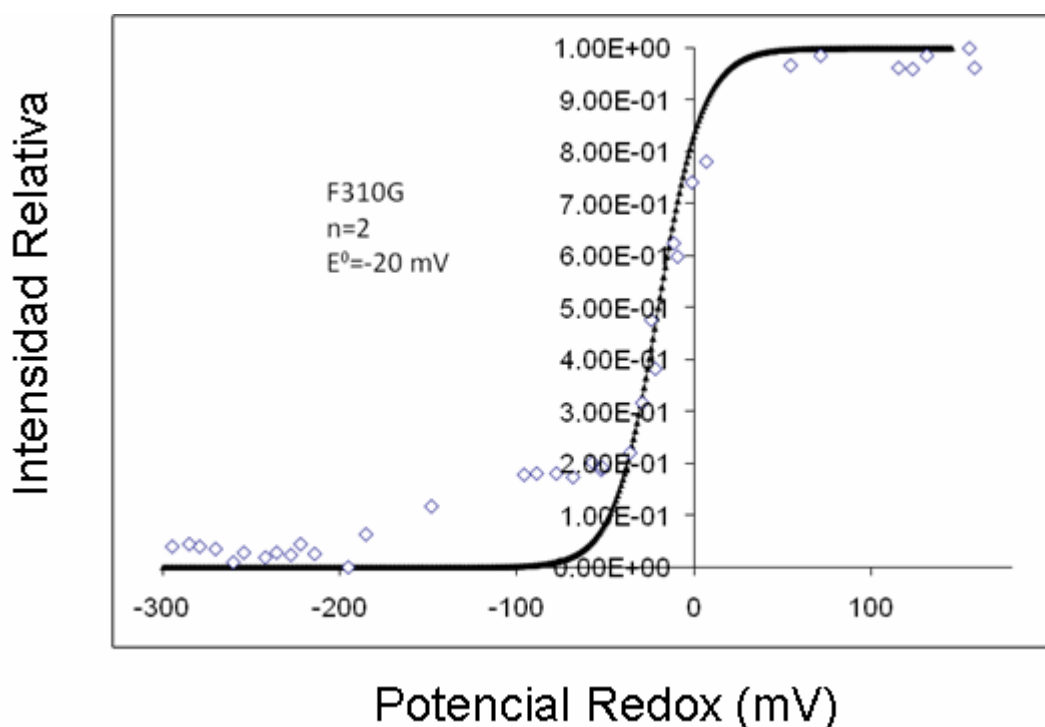


Figura 4.42. Curvas de titulación obtenidas por el seguimiento de variaciones de absorbancia a 450 nm de hAIF F310G en la adición de ditionito. La curva con línea continua se han calculado a partir de una ecuación de Nerst dielectrónica.

#### 4.3.6. PROPIEDADES DE LOS MUTANTES hAIFΔ1-102 K177W y hAIFΔ1-102 E314S

Como se ha mencionado en el apartado 4.3.1 se ha propuesto que la lisina 177 y el glutámico 314 podrían estar implicado en la transferencia NADH-FAD. Forman un

punto salino entre ellos y por otra parte la lisina 177 forma un puente de hidrógeno con el átomo N5 del anillo de isoaloxacina y el glutámico 314 con el átomo N7 del anillo de nicotinamida (Maté *et al.*, 2002) (ver Figura 4.26). La mutación a alanina de este residuo no implicó diferencias significativas en la actividad redox en estado estacionario de la proteína (Maté *et al.*, 2002) y por ello se sugirió que un residuo más voluminoso podría provocar interacciones estéricas cuyo resultado fuera un mutante con una actividad redox reducida. Por ello se realizó la mutación de la lisina 177 a triptófano. El glutámico 314 se cambió a serina, ya que, siendo un residuo polar, carece de la carga negativa del glutámico que estaría implicada en el establecimiento del puente salino con la lisina 177 y el puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo de nicotinamina.

#### 4.3.6.1. Conservación de los residuos K177 y E314 en otras proteínas

K177 y E314 son residuos conservados entre todas las especies de AIF y también entre todas las proteínas ferredoxin reductasas NADH dependientes acopladas a oxigenasa, entre ellas BphA4, rubredoxina reductasa, putidaredoxina reductasa. En la figura 4.43 se muestra la conservación de estos residuos en AIF de rata, AIF de ratón, el homólogo de AIF del hongo multicelular *Dictyostelium discoideum* y AIF humana. El residuo E314 de hAIF también está conservado en la proteína homóloga Wah-1 de *C. elegans*.

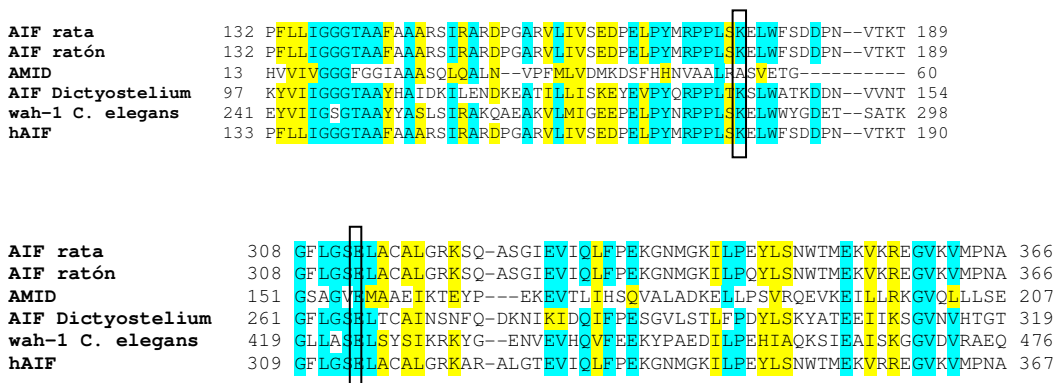


Figura 4.43. Alineamiento de secuencias de AIF de diferentes organismos y proteínas homólogas. Se muestra con un cuadro la posición del residuo K177 y E314 de AIF humana. Se realizó mediante el programa Bioedit con la aplicación Clustal W.



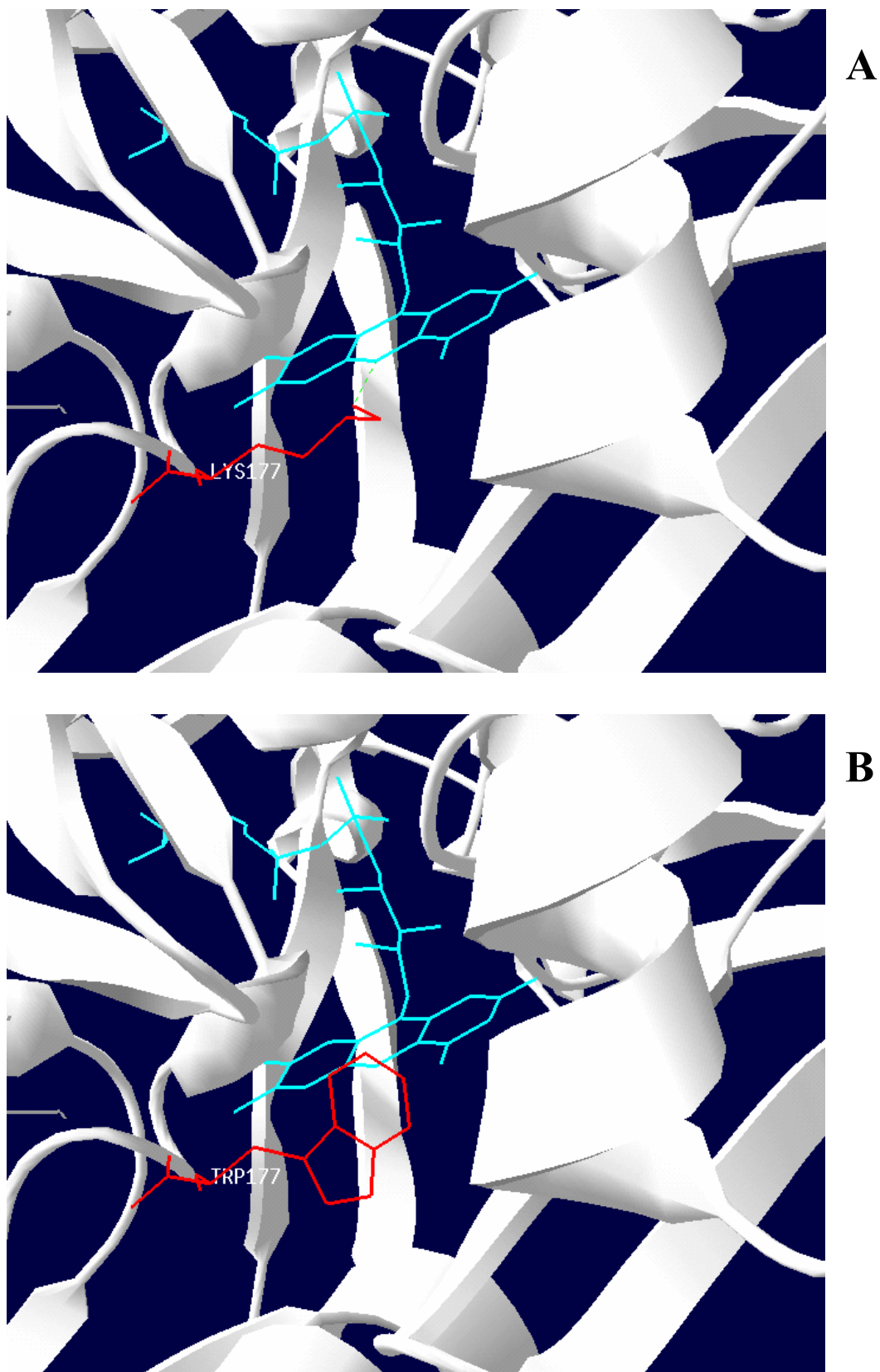


Figura 4.44. A: Localización del residuo L177 (rojo) y el FAD (azul) de la estructura cristalográfica tridimensional de hAIF (código PDB: 1m6i). B: Modelo tridimensional mediante simulación por ordenador con el programa Swiss-protein de la mutación L177W en hAIF.

## 4.3.6.2. Propiedades espectrales.

En la figura 4.45 se muestran los espectros UV-VIS de los mutantes individuales de hAIF $\Delta$ 1-102 K177W y E314S, así como el doble mutante K177W/E314S. En los tres casos se observa una gran alteración de las bandas espectrales observadas para la proteína salvaje, lo cual indica una significativa distorsión del entorno del grupo prostético FAD, lo cual coincide con los datos del sitio activo proporcionados por la resolución de la estructura cristalográfica de la proteína, donde el átomo N5 del anillo de isoaloxacina del FAD estabiliza un puente de hidrógeno con el N $\zeta$  de la lisina 177, el cual forma un puente salino con el glutámico 314. Los coeficientes de extinción para los mutantes K177W y E314S, calculados a 442 y 441 nm, respectivamente, se muestran en la Tabla 4.2.

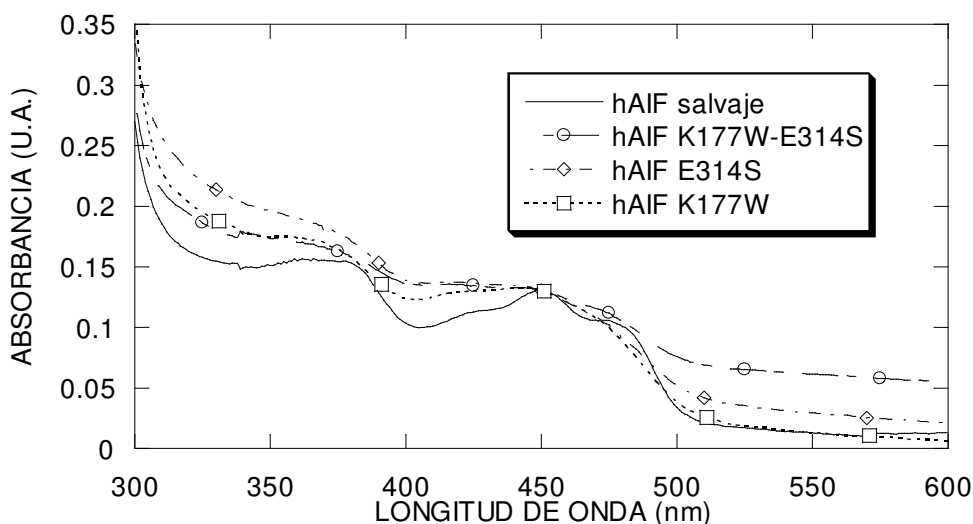


Figura 4.45. Espectros de absorción en el visible de hAIF $\Delta$ 1-102(6xHis)WT, hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis)K177W, hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis)E314S, hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis) K177W-E314S. Los espectros se realizaron en Tris/HCl 50 mM, pH 8, a temperatura ambiente.

## 4.3.6.3. Determinación del punto isoeléctrico

Se han determinado los siguientes puntos isoeléctricos para hAIF $\Delta$ 1-102 K177W, hAIF $\Delta$ 1-102 E314S y hAIF $\Delta$ 1-102 K177W/E314S, según se describe en el apartado 3.5.1.2.

	<u>pI</u> s
K177W	6.3, 5.75, 5.4
E314S	6.3
K177W/E314S	6.3

El análisis de los puntos isoeléctricos indica que, en el caso de la Lys177 los valores de los puntos isoeléctricos se desplazan hacia valores más ácidos al sustituir un aminoácido básico por un aminoácido neutro.

#### 4.3.7. PROPIEDADES DEL MUTANTE hAIFΔ1-102 W483G

##### 4.3.7.1. Conservación del residuo W483 en otras proteínas.

En BphA4 se ha demostrado la implicación de este residuo en la transferencia electrónica desde el FAD reducido al cluster [2Fe-2S] de la ferredoxina (Senda *et al.*, 2007). Además, como se ha comentado anteriormente, la pteridina del FAD presenta una interacción de van der Waals con la cadena lateral del Trp 320 y, por otra parte, en la formación del complejo BphA4:NADH el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena principal del Trp 320 forma un puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo de nicotinamida (Senda *et al.*, 2000). El objetivo del mutante W483G en hAIFΔ1-102 es estudiar su implicación en la estabilidad de la unión del grupo prostético FAD y en la transferencia electrónica. Este residuo se modificó a glicina, ya que introduce un cambio drástico en el entorno del FAD al eliminar su estabilización a través del anillo indol del triptófano.

El residuo W483 está muy conservado entre todas las especies de AIF. En la figura 4.46 se muestra la conservación de estos residuos en AIF de rata, AIF de ratón, el homólogo de AIF de la ameba multicelular *Dictyostelium discoideum* y AIF humana.

AIF rata	475	Y	W	H	S	M	F	R	S	D	L	G	P	D	V	G	Y	E	A	I	G	L	V	D	S	S	L	P	T	V	G	V	F	A	K	A	T	A	Q	D	N	P	K	S	A	T	E	Q	S	G	T	G	I	R	S	E	S	E	T	E	534
AIF ratón	475	Y	W	H	S	M	F	R	S	D	L	G	P	D	V	G	Y	E	A	I	G	L	V	D	S	S	L	P	T	V	G	V	F	A	K	A	T	A	Q	D	N	P	K	S	A	T	E	Q	S	G	T	G	I	R	S	E	S	E	T	E	534
AMID	314	---	Q	R	P	I	C	A	Y	K	P	G	A	L	T	F	L	L	S	M	G	R	N	D	---	V	G	Q	I	S	G	F	Y	V	G	R	L	M	V	R	L	T	K	S	R	D	L	F	V	S	T	---	---	363							
AIF Dictyostelium	433	Y	T	Y	Q	P	F	F	M	S	D	L	T	F	G	V	G	F	E	A	V	G	N	T	S	S	K	L	K	T	F	S	V	W	E	K	P	S	S	D	E	T	K	Q	S	Y	T	K	G	N	I	Y	L	N	D	N	N	N	V	492	
wah-1 C. elegans	592	F	W	Y	Q	P	S	E	F	T	K	F	A	P	H	L	H	I	N	A	I	G	K	C	D	S	S	L	E	T	V	S	V	H	A	E	P	D	K	D	T	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	632						
hAIF	476	Y	W	H	S	M	F	R	S	D	L	G	P	D	V	G	Y	E	A	I	G	L	V	D	S	S	L	P	T	V	G	V	F	A	K	A	T	A	Q	D	N	P	K	S	A	T	E	Q	S	G	T	G	I	R	S	E	S	E	T	E	535

Figura 4.46. Alineamiento de secuencias de AIF de diferentes organismos y proteínas homólogas. Se muestra con el cuadro la posición del residuo W483 de AIF humana, conservado en todos excepto en las proteínas homólogas AMID y Wah-1 de *C. elegans*. Se ha realizado mediante el programa Bioedit con la aplicación Clustal W.

## 4.3.7.2. Propiedades espectrales

El espectro de absorción de UV-VIS se encuentra reflejado en la figura 4.47 y, como se observa, a pesar de conservar los máximos en el visible de la proteína salvaje a 378 y 450 nm presenta perturbaciones con respecto a la proteína salvaje, con dos hombros acentuados a 420 y 467 nm. Sin embargo su espectro es más parecido a las proteínas salvajes de ratón. Esto puede deberse a la desaparición de la posible transferencia de carga del triptófano 483 al FAD que puede producir la absorbancia en la proteína salvaje en la región del visible entre 500 y 600 nm. El coeficiente de extinción calculado a 451 nm se muestra en la Tabla 4.2.

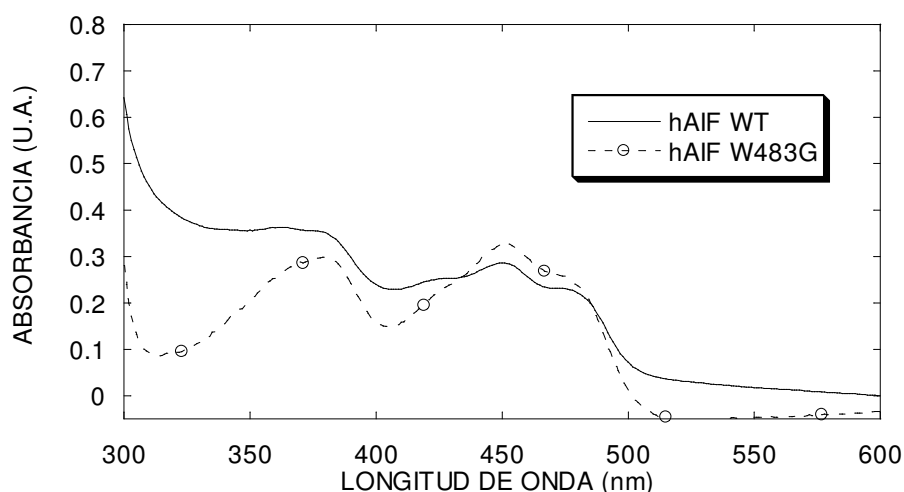


Figura 4.47. Espectros de absorción en el visible de hAIF $\Delta$ 1-102(6xHis)WT y hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis)W483G. Los espectros se realizaron en Tris/HCl 50 mM, pH 8, a temperatura ambiente.

## 4.3.7.3. Determinación del punto isoelectrico.

Se han determinado los siguientes puntos isoelectricos para hAIF $\Delta$ 1-102 W483G según se describe en el apartado 3.5.1.2.

pIs: 6.8, 6.7, 6.55, 6.2\*, 5.75 (\*) Forma mayoritaria

El análisis de los puntos isoeléctricos indica que se desplazan hacia valores ligeramente más ácidos.

#### 4.3.7.4. Determinación del potencial redox.

Se ha determinado el potencial redox del mutante W483G según se describe en el apartado 3.5.14. El potencial redox obtenido para este mutante es -292 mV a pH 7.5 y 20°C (Figura 4.42). Hay que señalar la dificultad de realización del mismo, al igual que lo descrito para el mutante F310G, debido a problemas de precipitación de la proteína, con la consiguiente pérdida de calidad de la titulación. El potencial redox de este mutante es cercano al de la proteína salvaje, aunque ligeramente más electropositivo.

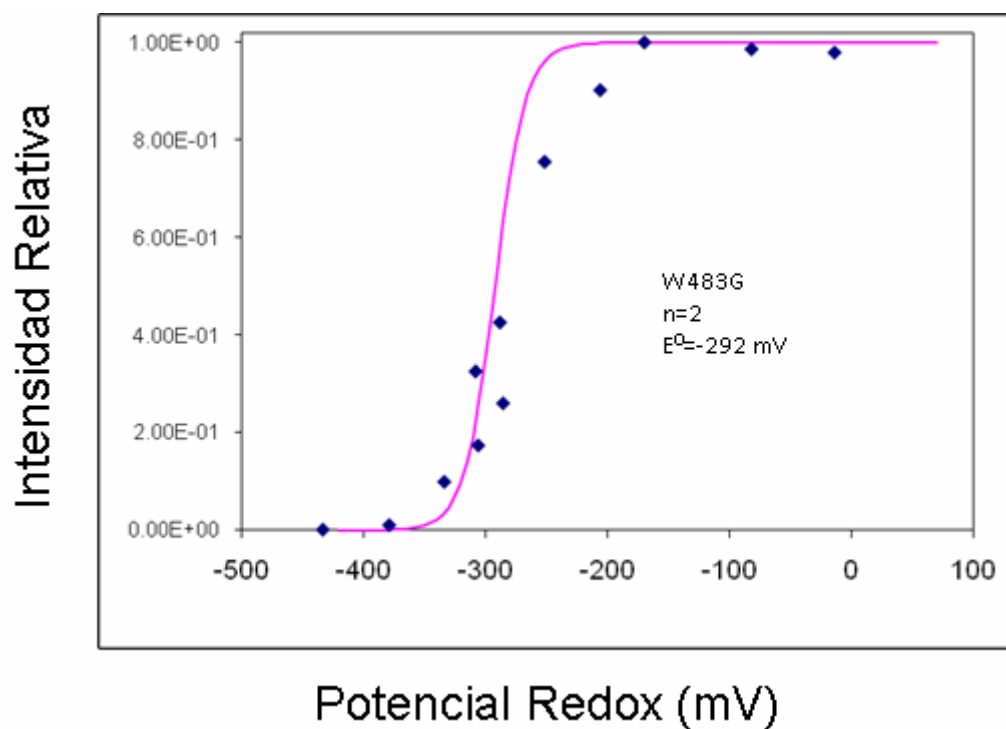


Figura 4.48. Curvas de titulación obtenidas por el seguimiento de variaciones de absorbancia a 450 nm de hAIF W483G en la adición de ditionito. La curva con línea continua se han calculado a partir de una ecuación de Nerst dielectrónica.

#### 4.3.8. PROPIEDADES DEL MUTANTE hAIF $\Delta$ 1-102 P173G

Se ha sugerido que la prolina 173 es un residuo importante para el posicionamiento del anillo de isoaloxacina al interactuar desde su lado *si* como un soporte interno (Senda *et al.*, 2000) (ver Figura 4.26). Para determinar la importancia del residuo P173 en la actividad redox de hAIF $\Delta$ 1-102 se diseñó el mutante P173G, donde se sustituyó la prolina por glicina, lo cual supone una disminución importante de la interacción estérica con el grupo prostético FAD, lo cual permitiría una mayor movilidad del mismo con un afecto desfavorable para la actividad redox de hAIF $\Delta$ 1-102.

##### 4.3.8.1. Conservación del residuo P173 en otras proteínas

El residuo P173 está muy conservado entre todas las especies de AIF. En la figura 4.49 se muestra la conservación de estos residuos en AIF de rata, AIF de ratón, el homólogo de AIF del hongo multicelular *Dictyostelium discoideum*, la proteína homóloga Wah-1 de *C. elegans* y AIF humana.

AIF rata	132	P	F	L	L	I	G	G	T	A	A	F	A	A	R	S	I	R	A	R	D	P	G	A	R	V	L	I	V	S	E	D	P	E	L	P	Y	M	R	P	P	L	S	K	E	L	W	F	S	D	D	P	N	--	V	T	K	T	189
AIF ratón	132	P	F	L	L	I	G	G	T	A	A	F	A	A	R	S	I	R	A	R	D	P	G	A	R	V	L	I	V	S	E	D	P	E	L	P	Y	M	R	P	P	L	S	K	E	L	W	F	S	D	D	P	N	--	V	T	K	T	189
AMID	13	H	V	V	I	V	G	G	F	G	G	I	A	A	S	Q	L	A	L	N	--	V	P	F	M	L	V	D	M	K	D	S	F	H	N	V	A	L	R	A	S	V	E	T	G	-----	60												
AIF Dictyostelium	97	K	Y	V	I	I	G	G	T	A	A	Y	H	A	I	D	K	I	L	E	N	D	K	E	A	T	I	L	L	S	K	E	Y	E	V	P	Y	Q	R	P	P	L	T	K	S	L	W	A	T	K	D	D	N	--	V	V	N	T	154
wah-1 C. elegans	241	E	Y	V	I	I	G	S	T	A	A	Y	A	S	L	S	I	R	A	K	Q	A	E	A	K	V	L	M	I	G	E	E	P	E	L	P	Y	N	R	P	P	L	S	K	E	L	W	W	Y	G	D	E	T	--	S	A	T	K	298
hAIF	133	P	F	L	L	I	G	G	T	A	A	F	A	A	R	S	I	R	A	R	D	P	G	A	R	V	L	I	V	S	E	D	P	E	L	P	Y	M	R	P	P	L	S	K	E	L	W	F	S	D	D	P	N	--	V	T	K	T	190

Figura 4.49. Alineamiento de secuencias de AIF de diferentes organismos y proteínas homólogas. Se muestra con el cuadro la posición del residuo P173 de AIF humana, conservado en todos excepto en las proteína homóloga AMID. Se ha realizado mediante el programa Bioedit con la aplicación Clustal W.

##### 4.3.8.2. Propiedades espectrales

El espectro de absorción UV-VIS de hAIF $\Delta$ 1-102 P173G se muestra en la figura 4.50. Se puede observar que se encuentra desplazado 8 nm respecto al de la proteína salvaje. Así, los máximos en el visible de la proteína salvaje a 378 y 451 nm se presentan a 370 y 442 nm respectivamente. Además del desplazamiento también existen otras perturbaciones que afectan, principalmente a la región entre 250 y 400 nm.

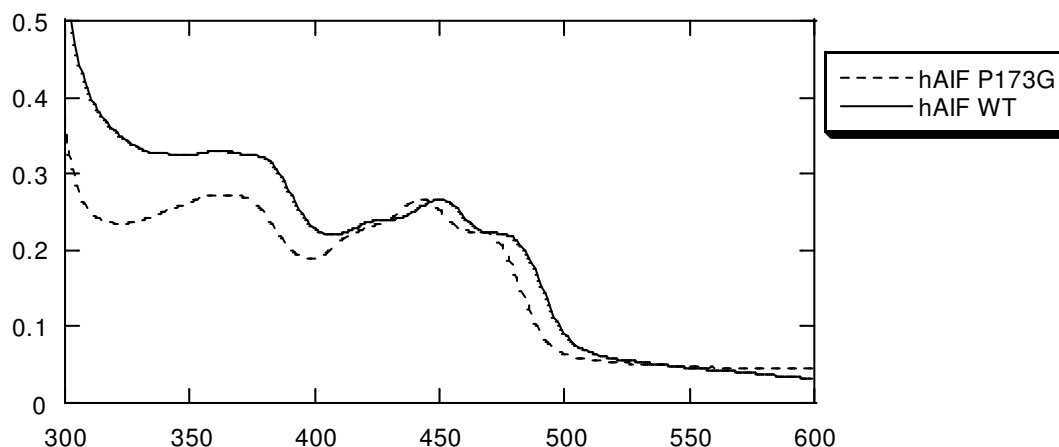


Figura 4.50. Espectros de absorción en el visible de hAIF $\Delta$ 1-102(6xHis)WT y hAIF $\Delta$ 1-101(6xHis)P173G. Los espectros se realizaron en Tris/HCl 50mM, pH8, a temperatura ambiente.

#### 4.3.8.3. Determinación del punto isoelectrico

Se han determinado los siguientes puntos isoelectricos para hAIF $\Delta$ 1-102 P173G según se describe en el apartado 3.5.1.2.

pIs: 7\*, 6.8\*, 6.7, 6.55, 6.4, 6.3, 6\*, 5.8, 5.75, 5.6, 5.5

(\*) Formas mayoritarias

Los puntos isoelectricos son iguales a los determinados para hAIF $\Delta$ 1-102, como corresponde a una mutación de mantiene el carácter neutro del aminoácido, y también se detectaron gran cantidad de isoformas.

#### 4.3.9. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE hAIF $\Delta$ 1-102 Y SUS MUTANTES.

Se realizaron los espectros de fluorescencia según se describe en el apartado 3.5.10. Los espectros obtenidos para la zona de la proteína se muestran en la figura 4.51 y para la zona del triptófano en la figura 4.52, en Tris 50mM, pH 8.

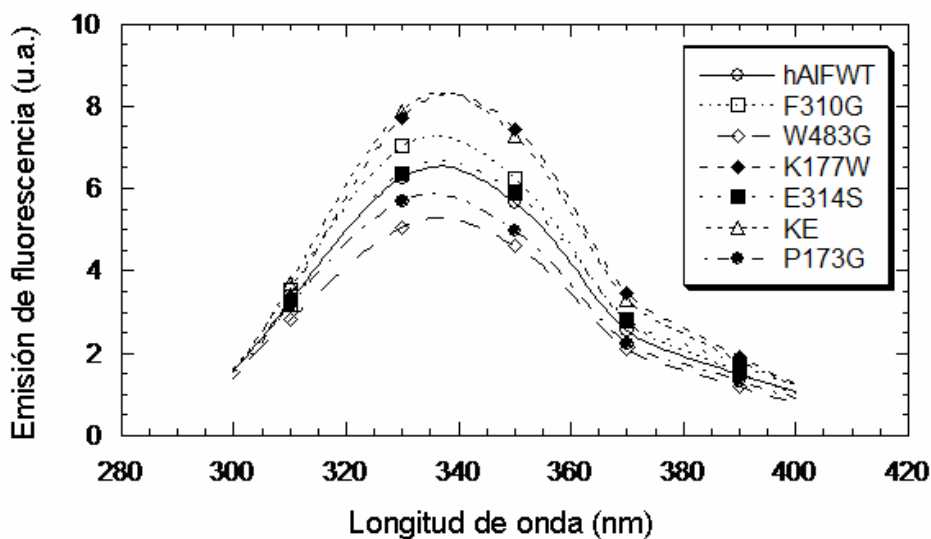


Figura 4.51. Espectros de emisión de fluorescencia de hAIF y sus mutantes con  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm. KE: mutante doble hAIF  $\Delta 1-102$  K177W/E314S.

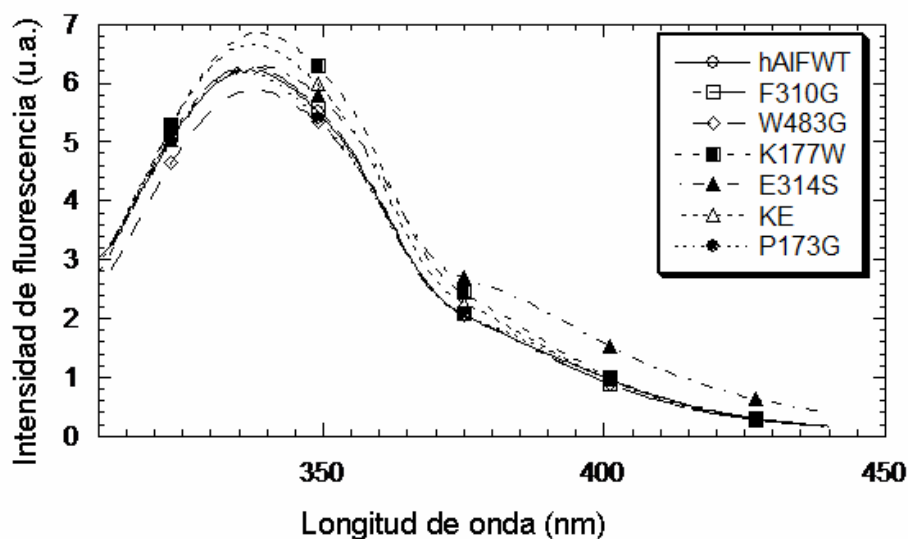


Figura 4.50. Espectros de emisión de fluorescencia de hAIF y sus mutantes con  $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm. KE: mutante doble hAIF  $\Delta 1-102$  K177W/E314S.

Los mutantes mostraron espectros de emisión de fluorescencia del triptófano sin una alteración significativa del rendimiento cuántico respecto a la forma salvaje. Además el espectro del mutante W483G no se encuentra desplazado hacia el azul,



respecto a la proteína salvaje, lo cual indica que este triptófano está protegido del solvente.

#### 4.3.10 PAPEL DE LOS RESIDUOS F310G, K177W, E314S, W483G Y P173G EN LA ACTIVIDAD REDOX DE AIF HUMANA. MEDIDA DEL PROCESO DE REDUCCIÓN DE AIF POR NADH MEDIANTE CINÉTICAS RÁPIDAS POR MEZCLA RÁPIDA CON FLUJO DETENIDO.

El proceso de reducción por NADH de mAIF, hAIF y de los mutantes de esta última en el entorno del centro activo, se ha seguido a 450 nm mediante mezcla rápida con flujo detenido a una relación molar 1:1. Todas las muestras se prepararon en 50 mM Tris/HCl pH 8 en anaerobiosis, según se describe en el apartado 3.6.2. De forma similar se analizó la evolución de los complejos de transferencia de carga descritos en el apartado 4.1.6 mediante el seguimiento de la reacción a 600 y 720 nm, longitudes de onda donde absorben mayoritariamente CT1 y CT2, respectivamente.

Las trazas cinéticas experimentales obtenidas a cada una de estas longitudes de onda se ajustaron a procesos bien monofásicos o bifásicos (ver apartado 3.6.2.1). La tabla 4.3 recoge las constantes cinéticas observadas ( $k_{obs}$ ) para cada uno de las variantes de AIF analizadas.

	$k_{obs}$					
	450 nm		600 nm		720 nm	
	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$	$k_1$	$k_2$
mAIF salvaje	>600 <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
hAIF salvaje	>600 <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
F310G	0.5	0.03	0.3	0.02	0.4	0.04
K177W/E314S	0.3	0.06	0.3	-	-	-
P173G	0.06	-	0.06	-	-	-
K177W	0.1	0.02	0.06	0.02	-	-
W483G	0.5	0.05	0.3	0.06	0.6	0.05
E314S	1.4	0.1	-	-	-	-

Tabla 4.3. Constantes observadas para la reducción de AIF por NADH, relación molar 1:1.

<sup>a</sup> La mayor parte de la reacción tuvo lugar dentro del tiempo muerto del aparato. T<sup>a</sup>: 12°C.

En las proteínas salvajes, tanto AIF humana como de ratón, el análisis de los datos para la reacción de semireducción de la flavina con NADH indica que la mayor parte del proceso ocurre dentro del tiempo muerto del aparato ( $k_{obs} > 600 \text{ s}^{-1}$ ), por tanto el

proceso es muy rápido y en estas condiciones tampoco se puede detectar la formación de los complejos de transferencia de carga CT1 y CT2.

Sin embargo, todas las mutaciones introducidas en el presente estudio en el centro activo producen no solo una considerable ralentización del proceso de reducción por NADH, sino que también disminuyen considerablemente su amplitud. Esto sugiere que los residuos P173, F310, E314, K177 y W483 juegan un papel clave en el mecanismo acción de este enzima.

Sin embargo, esta ralentización permite observar la formación de CTs para algunos de ellos mediante el análisis del proceso a 600 y/o 720 nm. Así, con la única excepción del mutante E314S, la reacción de todos ellos con NADH viene acoplada con un aumento de absorbancia a 600 nm, el cual se puede relacionar con la formación de un CT entre la flavina y la nicotinamida, que corresponden con los observados para mAIF $\Delta$ 1-120 (apartado 4.1.6) en un espectro UV-VIS con un exceso de adición de NADH (relacion molar AIF:NADH 1:5). Estas especies, se estabilizan especialmente en el caso de los mutantes F310G, K177W y W483G. Por tanto, la incapacidad de estos mutantes de reducirse por NADH no parece deberse a un papel de estos residuos en el proceso de interacción, si no más bien a un rol en el mecanismo catalítico o en la modulación de las propiedades de oxido reducción de la cofactor de AIF, el FAD. Estas hipótesis vienen avaladas por la escasa amplitud observada para la reducción de la flavina a 450 nm (Figura 4.53A). El resultado es totalmente diferente en el caso del mutante E314S, donde la falta de formación de CTs sugiere una disposición diferente del anillo de nicotinamida en el centro activo una vez que tiene lugar la interacción enzima-coenzima. Por tanto, este residuo podría tener un papel más destacado en la localización del coenzima en el centro activo.

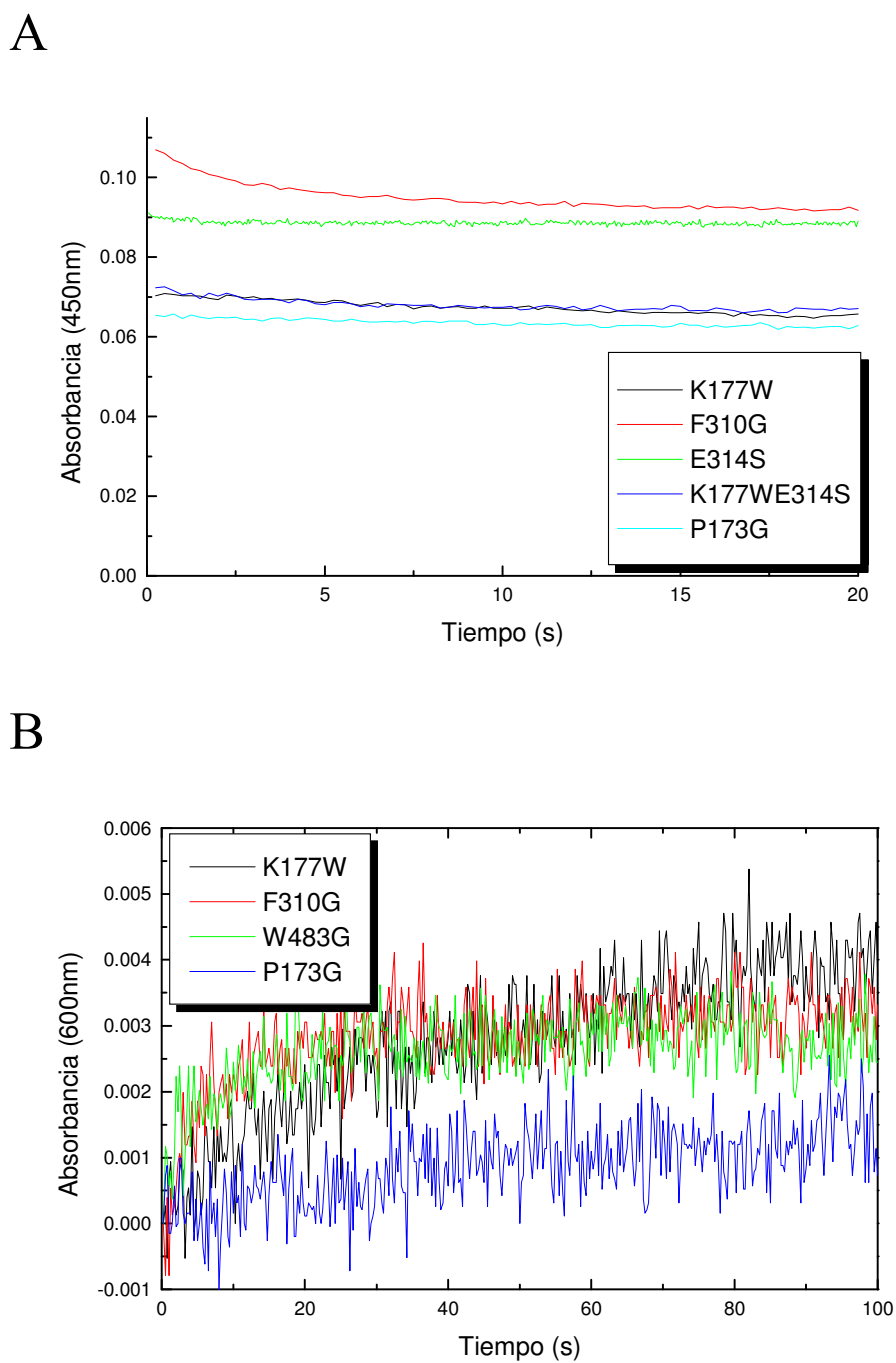


Figura 4.53. A: Reacción de reducción del FAD, medida por el descenso de absorbancia a 450nm frente el tiempo para los mutantes K177W, F310G, E314S, K177W/E314S y P173G. B: Reacción de formación de CT1, medida por el incremento de absorbancia a 600nm frente al tiempo para los mutantes K177W, F310G, W483G y P173G. En este caso no se ha representado el mutante E314S ya que se considera que no forma CT1. Las concentraciones de las proteínas en la mezcla de reacción fueron K177W 5 $\mu$ M, F310G 5 $\mu$ M, W483G 2.75 $\mu$ M, E314S 5  $\mu$ M, K177W/E314S 4 $\mu$ M y P173G 3.5  $\mu$ M.

Con los datos aquí presentados resulta difícil discernir que CT se está produciendo en cada momento, ya que aunque CT1 y CT2 tienen sus máximos a distintas longitudes de onda, sus bandas son amplias e interfieren entre ellas. Sin embargo, el hecho de que los procesos a 600 y 720 nm para F310G y W483G sean bifásicos, claramente sugiere la evolución entre dos especies a esas longitudes de onda, y por tanto la formación inicial de una especie CT1 que posteriormente se convierte en CT2.

De este modo, si suponemos que estos mutantes, a pesar de encontrarse considerablemente ralentizados y con el equilibrio de la reacción desplazado hacia los reactivos, presentan un mecanismo similar al de la enzima silvestre podría establecerse para la reacción de reducción de AIF con NADH un modelo análogo al descrito para la FNR (Tejero *et al.*, 2007) (Figura 4.54), con formación de CT1 y CT2. Estos complejos de transferencia de carga se producen como resultado de las interacciones de transferencia de carga  $\pi$ - $\pi$  entre el anillo de isoaloxacina de la flavina reducida (donador) y el anillo de nicotinamida del  $\text{NAD(P)}^+$  (aceptor) (o viceversa) y absorben a longitudes de onda largas.

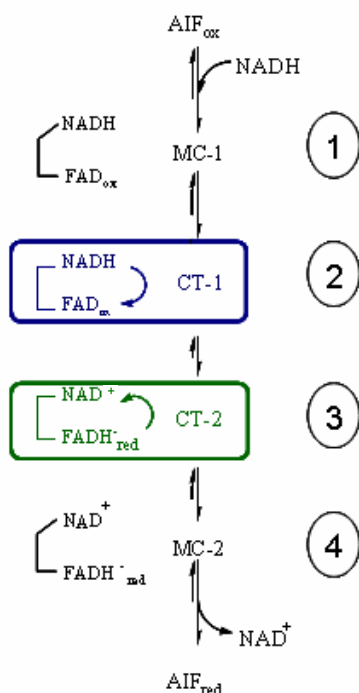


Figura 4.54. Mecanismo propuesto para la reacción de AIF con NADH. La reducción transcurre en varias etapas con la formación de, al menos, cuatro especies intermedias: (1) unión del NADH a AIF formando un complejo de Michaelis (MC-1), (2) conversión de MC-1 al complejo de transferencia de carga de la flavina oxidada y NADH (CT-1), (3) transferencia de hidruro y formación del segundo complejo de transferencia de carga entre la flavina reducida y el  $\text{NAD}^+$  (CT-2) y (4) formación del segundo complejo de Michaelis (MC-2) que se disocia para dar AIF reducida y  $\text{NAD}^+$ . Las etapas podrían ser reversibles. Modificado de Tejero *et al.*, 2007.

#### 4.3.11. MODELADO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCION DE AIF CON NAD<sup>+</sup>.

A partir de la estructura de AIF, y en base a estructuras cristalográficas de proteínas dependientes de piridín nucleótidos, se han generado dos modelos para la interacción de AIF con el NAD<sup>+</sup>. El primer modelo se basaría en una interacción análoga a la FNR y enzimas de la familia (Figura 4.55 A y B). Según este modelo el C4 del anillo de nicotinamida estaría localizado a 3.36 Å del átomo N5 del anillo de isoaloxacina, lo cual permitiría una transferencia de hidruro eficaz. El segundo modelo es homólogo a la interacción de NAD<sup>+</sup> con BphA4 (Senda *et al.*, 2000), GR, Adrenodoxina reductasa (AdR) y otras enzimas de la familia, y es el propuesto para la interacción de AIF con NAD<sup>+</sup> debido a la conservación de los residuos del sitio activo y su gran homología estructural. Se muestra en la figura 4.56 (A y B). El átomo C4 de la nicotinamida está localizado a una distancia de 3.38 Å del átomo N5 del anillo de isoaloxacina, lo cual también permitiría una transferencia de hidruro eficaz. Además de las interacciones de Van der Waals el anillo de nicotinamida estaría fijado a través de dos puentes de hidrógeno con el átomo O<sup>ε</sup> del E314 y el átomo del oxígeno del grupo carbonilo de la cadena principal del W483.

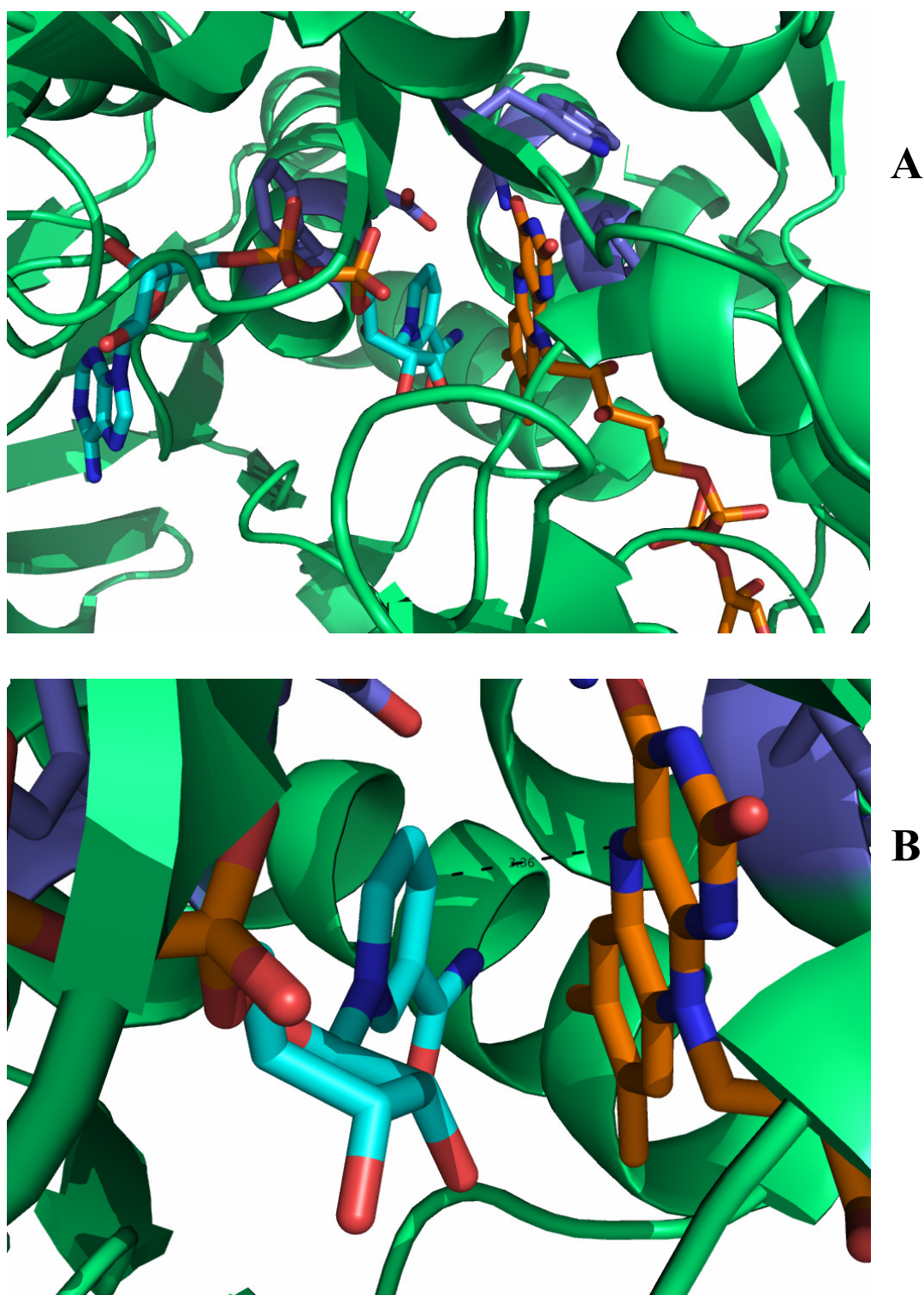


Figura 4.55. Modelo de interacción de AIF con  $\text{NAD}^+$  basado en la conformación del  $\text{NADP}^+$  en la estructura cristalina del complejo FNR: $\text{NADP}^+$  (código PDB: 2bsa). FAD y  $\text{NAD}^+$  se representan en varillas, coloreados por tipo de átomo con los carbonos en naranja y azul, respectivamente. Los residuos del centro activo mutados en el presente trabajo se representan también en varillas pero con los carbonos en morado. B: Distancia entre las posiciones C4 de la nicotinamida y el N5 de la isoaloxazina, la cual permitiría una transferencia de hidruro eficaz. Figuras producidas con PyMOL (DeLano, 2002).



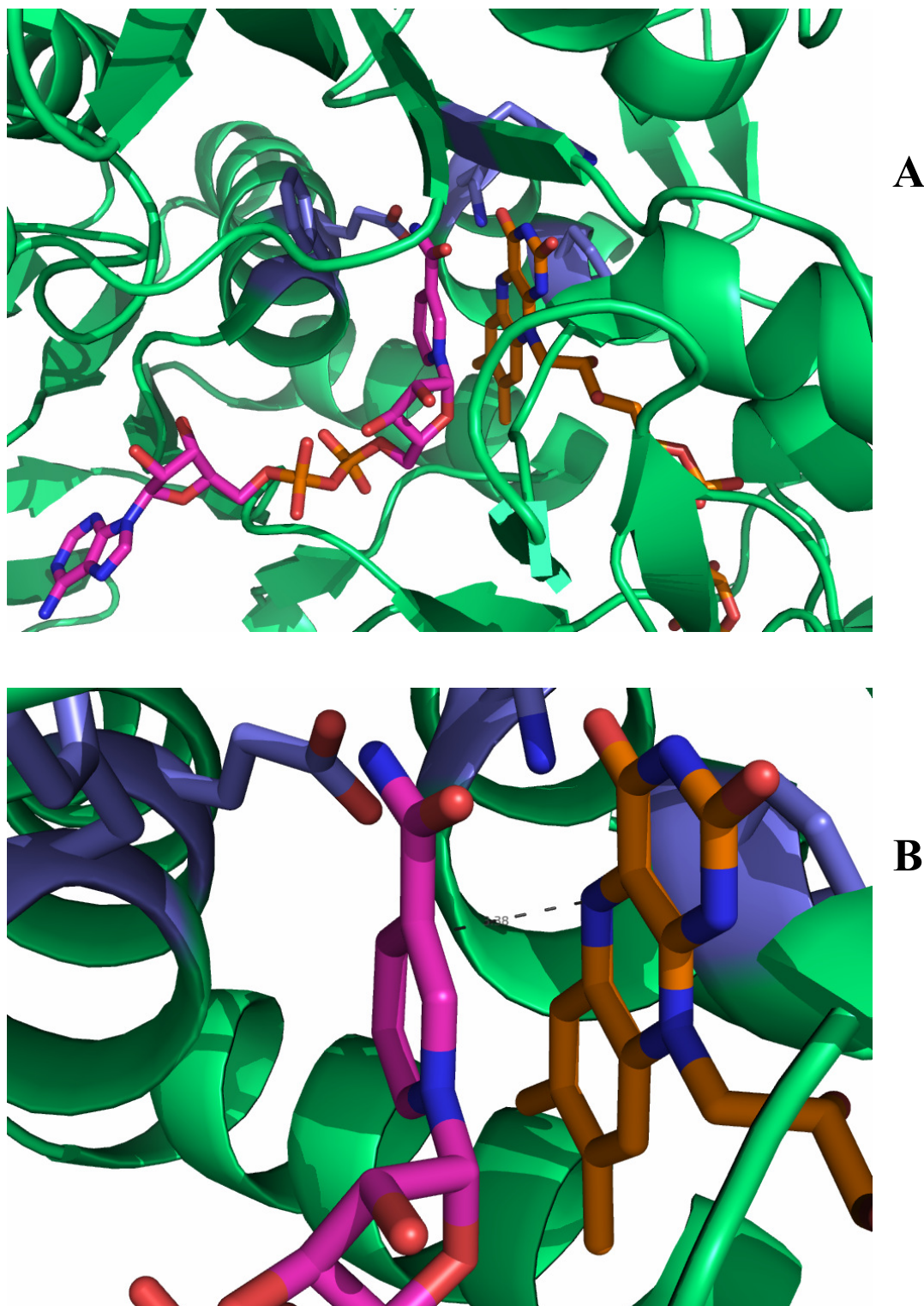


Figura 4.56. Modelo de interacción de AIF humana con  $\text{NAD}^+$  basado en la conformación del  $\text{NAD}^+$  en las estructuras cristalinas de los complejos BphA4: $\text{NAD}^+$  (código PDB: 2yvj) y GR: $\text{NAD}^+$  (código PDB: 1get). A: Centro activo de la AIF humana (pdb 1m6i) con  $\text{NAD}^+$  unido. FAD y  $\text{NAD}^+$  se representan en varillas, coloreados por tipo de átomo con los carbonos en naranja y rosa, respectivamente. Los residuos del centro activo mutados en el presente trabajo se representan también en varillas, pero con los carbonos en morado. B: Distancia entre las posiciones C4 de la nicotinamida y el N5 de la isoaloxazina, la cual permitiría una transferencia de hidruro eficaz. Figuras producidas con PyMOL (DeLano, 2002).





## *5. DISCUSIÓN*



Desde que en 1999 se descubriera una nueva proteína, AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Susin *et al.* 1999b), hallada en el espacio intermembrana mitocondrial y capaz de inducir apoptosis en núcleos aislados independiente de caspasas, a lo largo de estos años esta proteína ha sido objeto de una intensa actividad de investigación. Así, más de mil publicaciones confirman la importancia de AIF en la muerte celular programada independiente de caspasas. Sin embargo, poco se conoce sobre su función redox y su papel fisiológico en la mitocondria. En este sentido, el objeto de mi tesis doctoral ha sido, por un lado, clarificar la función redox de AIF y, por otro lado, analizar la posible relación con su función apoptótica.

Los resultados de este trabajo indican que mAIF  $\Delta$ 1-120 tiene una significativa actividad NADH oxidasa. De acuerdo con la clasificación de Massey (Massey, 1994), AIF pertenece a la clase de electrón-transferasas NADH reductasas, ya que reacciona rápidamente con el oxígeno formando como productos  $O_2^-$  y el radical flavoproteína neutro. No se ha podido detectar ningún intermediario semiquinona, a pesar de que se esperaría encontrar este radical neutro tras la transferencia de un solo electrón. mAIF es capaz de utilizar NADPH, aunque con una tasa de transporte electrónico marcadamente menor. En cada una de las actividades descritas para AIF la reacción puede iniciarse con la reducción de AIF por los dos donadores de electrones NAD(P)H, en ausencia de un aceptor de electrones exógeno. La forma reducida de AIF reacciona con aceptores de un electrón (oxígeno molecular y ferricianuro) o dos electrones (DCPIP). Los datos aportados por el estudio cinético del estado estacionario son bastante difíciles de interpretar debido a la formación de complejos de transferencia de carga relativamente estables. Estos complejos también han sido descritos posteriormente en mAIF  $\Delta$ 1-101 y AIF  $\Delta$ 1-53 (Churbanova y Sevrioukova, 2008), y se ha sugerido una función fisiológica de los mismos en un modelo donde AIF actuaría como molécula señalizadora del estado redox mitocondrial. Los valores de  $K_m$  para la actividad oxidasa de AIF respecto a NADH en el estado estacionario ( $K_m^{NADH} = 99.4 \mu M$ ) son similares a los descritos para otras NAD(P)H oxidasas, como la NADH oxidasa de *Amphibacillus xylanus* (Ohnishi *et al.*, 1994), con  $K_m^{NADH} = 33.3 \mu M$  o la enzima NAD(P)H oxidasa formadora de superóxido de neutrófilos humanos solubilizada en deoxicolato (Glass *et al.*, 1986), con  $K_m^{NADPH} = 97 \mu M$  para su reacción con NADPH. En cambio esta enzima presenta una  $K_m$  con un orden de magnitud 10 veces mayor para la reacción con NADH ( $K_m^{NADH} = 1700 \mu M$ ). Sin embargo los valores de actividad específica para NADH y NADPH en la NAD(P)H oxidasa formadora de superóxido de neutrófilos humanos son muy elevados (6.2 y 4.5 UI/mg, para NADH y NADPH, respectivamente), en un rango 100 veces superior respecto a AIF (0.036 y 0.098 UI/mg). Esta diferencia aporta evidencia sobre el sustrato fisiológico de AIF, el cual no parece ser el oxígeno. Estos resultados se

publicaron en el año 2001 (Miramar *et al.*, 2001). Posteriormente se ha demostrado que la actividad NADH oxidasa de AIF es importante para el mantenimiento del estado transformado de células tumorales de colon, y que además esta actividad es importante para la actividad del complejo I respiratorio (Urbano *et al.*, 2005).

En este trabajo se ha demostrado la independencia de la función apoptogénica de AIF y su actividad oxidoreductasa en base a tres argumentos. En primer lugar, la eliminación del grupo prostético FAD de la proteína no afecta a la actividad apoptogénica de mAIF $\Delta$ 1-120 en células microinyectadas. Además la apoproteína mAIF $\Delta$ 1-101 tiene la misma capacidad apoptogénica que la holoproteína en núcleos aislados. En segundo lugar, la adición de NADH, SOD o la derivatización covalente del FAD no modula la capacidad de AIF para inducir apoptosis nuclear en núcleos aislados. En tercer lugar, la inhibición de los efectos apoptogénicos de AIF mediante ácido *para*-cloromercurifenilsulfónico no influye sobre la actividad NADH oxidasa. Además, este resultado viene apoyado por un estudio reciente sobre una isoforma de AIF humana carente del dominio C-terminal, AFsh2, ausente en tejido cerebral, la cual exhibe actividad NADH oxidasa pero es incapaz de inducir apoptosis (Delettre *et al.*, 2006). Estos datos son similares a los obtenidos para el citocromo *c* en el sentido de que la actividad apoptogénica del citocromo *c* no depende de su estado redox. La sustitución de Fe<sup>2+</sup> por Co<sup>2+</sup> en el grupo prostético del citocromo *c* (una manipulación que elimina la capacidad de transferir electrones del grupo hemo) no altera su función activadora de caspasas (Kluck *et al.*, 1997), al contrario que ciertas sustituciones de aminoácidos, que no modifican su función redox, pero sí afectan a la activación de caspasas (Kluck *et al.*, 1997; Kluck *et al.*, 2000). Por tanto, tanto el citocromo *c* como AIF parecen ser proteínas bifuncionales con actividades apoptogénicas y redox claramente dissociables. Estos resultados se publicaron en el año 2001 (Miramar *et al.*, 2001). Desde entonces todos los estudios publicados avalan esta dualidad (Delettre *et al.*, 2006b; Cheung *et al.*, 2006). Por otra parte, la función redox de AIF puede tener un papel en el proceso apoptótico a través de su relación con los radicales libres de oxígeno. A partir de experimentos con ratones *Hq* se sugirió la implicación de AIF como proteína antioxidante, que actuaría en una cadena redox eliminando radicales libres en la mitocondria (Klein *et al.*, 2002) y por tanto su salida de la mitocondria provocaría un aumento de los mismos que contribuiría a la muerte celular por apoptosis. Posteriormente se ha demostrado su implicación en la fosforilación oxidativa (Vahsen *et al.*, 2004). Por tanto, la salida de AIF de la mitocondria contribuiría a la ruptura de la cadena electrónica mitocondrial, con el consiguiente incremento de especies reactivas de oxígeno. En este trabajo se demuestra la capacidad de AIF para producir radicales

superóxido, por lo que AIF podría contribuir también al incremento de radicales libres tras su salida de la mitocondria a través de su función redox. En la actualidad existe cada vez más evidencia sobre la relación entre la bioenergetica celular y la apoptosis. La pérdida progresiva de potencial de membrana tras el estímulo apoptótico se correlaciona con frecuencia con un aumento de las especies reactivas de oxígeno, las cuales saturan rápidamente los sistemas antioxidantes celulares e inducen la pérdida de función mitocondrial originando una crisis bioenergética que conduce a la muerte celular (Kroemer *et al.*, 2007).

AIF está presente en las mitocondrias de todos los tejidos de ratón que se han estudiado y también está presente en más de 60 líneas celulares tumorales humanas (Daugas *et al.*, 2000), lo cual sugiere que AIF realiza importantes actividades metabólicas. Existen diversas NADH oxidasas bacterianas aisladas y caracterizadas (Ahmed y Claiborne, 1989; Arcari *et al.*, 2000). La posible función de estas enzimas es mantener el balance redox celular en condiciones aeróbicas, convirtiendo NADH en NAD<sup>+</sup> (Toomey y Mayhew, 1998; Niimura *et al.*, 1995). Además, también se han descrito, aunque apenas caracterizadas, varias NADH oxidasas formadoras de ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en células animales, concretamente en mitocondrias de corazón (Nohl *et al.*, 1987), mitocondrias de hígado (Linke *et al.*, 1993), microsomas de miocitos bovinos (Mohazzab y Wollin, 1994) y células endoteliales (Zalba *et al.*, 2000). En general, AIF no se asemeja a la mayoría de las NADH oxidasas previamente descritas. En primer lugar, en solución es monomérica, mientras que las NADH oxidasas bacterianas son con frecuencia dimericas o tetraméricas (Jarasch *et al.*, 1981). En segundo lugar, AIF transfiere electrones sin la intervención de los grupos sulfidrilos de las cisteínas, a diferencia de otras NADH oxidasas con un centro redox activo constituido por un puente disulfuro formado por dos residuos vecinos de cisteínas (Arcari *et al.*, 2000; Toomey y Mayhew, 1998). En tercer lugar, AIF oxida NADH a través de un mecanismo que no requiere la adición de FAD exógeno, mientras que diversas NADH oxidasas bacterianas requieren FAD (Ohnisi *et al.*, 1994; Arcari *et al.*, 2000; Niimura *et al.*, 1995; Toomey y Mayhew, 1998). En cuarto lugar, AIF no funciona *in vitro* como una proteína antioxidante eliminando peróxido de hidrógeno. Sin embargo la resolución de la estructura cristalina de AIF (Maté *et al.*, 2002) puso de manifiesto que a pesar de que AIF recombinante en solución se comporta como un monómero existe la posibilidad de formación de un dímero de la proteína, además de su gran semejanza con BphA4, proteína dimerica que reduce el componente ferredoxina en el complejo bifenil dioxigenasa bacteriano (Senda *et al.*, 2000). Estos datos sugieren que AIF puede funcionar como una proteína de transporte electrónico similar a BphA4. En el año 2004 demostró su implicación en la fosforilación oxidativa (Vahsen *et al.*,

2004), relacionada con el ensamblaje y/o mantenimiento del complejo I, aunque su función y aceptores fisiológicos todavía son desconocidos.

Es interesante observar la significativa diferencia entre las distintas formas de AIF para un mismo organismo, como es el de ratón. Así, mAIF  $\Delta$ 1-120, mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53 presentan características muy distintas. En primer lugar, mAIF  $\Delta$ 1-120 funciona *in vitro* en solución como una proteína monomérica (Miramar *et al.*, 2001), aunque pueda cristalizar como dímeros (Maté *et al.*, 2002), al contrario que mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53, que pese a ser proteínas monoméricas en solución parecen actuar como proteínas dimericas en determinadas condiciones (Churbanova y Sevrioukova, 2008). En segundo lugar, mAIF  $\Delta$ 1-120 posee una actividad oxidasa semejante a la descrita para otras proteínas NADH oxidasas, tal y como se demuestra en este trabajo, sin embargo en mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53 esta actividad se encuentra muy reducida ya que la proteína reacciona muy débilmente con el oxígeno molecular ( $k_{\text{cat}}=0.2-0.01 \text{ s}^{-1}$ ) formando complejos de transferencia de carga diméricos FADH<sub>2</sub>-NAD(P) muy estables e inefectivos para la transferencia electrónica (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Se ha sugerido que la dimerización de AIF puede ser uno de los factores que estabilicen los complejos de transferencia de carga FADH<sub>2</sub>-NAD(P)<sup>+</sup>, los cuales tendrían un papel fisiológico en la función de esta proteína (Churbanova y Sevrioukova, 2008). La diferencia de comportamiento entre mAIF  $\Delta$ 1-120 y las proteínas mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53 se ha atribuido tanto a la presencia de la cola de histidinas introducidas para su expresión mediante el vector pET como al sistema de plegamiento de la proteína durante su purificación (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Sin embargo hAIFsh2, en idénticas condiciones de purificación que las anteriores mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53 presenta una actividad NADH oxidasa similar a la de mAIF $\Delta$ 1-120 (Delettre *et al.*, 2006). También se han observado diferencias entre mAIF $\Delta$ 1-101 y mAIF $\Delta$ 1-53, donde mAIF $\Delta$ 1-53 se oxida a la mitad de velocidad que mAIF $\Delta$ 1-101, atribuibles a la diferencia de longitud del extremo N-terminal (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Por ello se podría deducir que la diferencia de comportamiento de mAIF  $\Delta$ 1-120 respecto a las anteriores parece deberse a la diferencia en la extensión de la porción N-terminal, la cual se encuentra localizada en el dominio de dimerización. Por tanto, parece existir una relación entre la longitud del extremo N-terminal, la dimerización de AIF y la formación y estabilización de los complejos de transferencia de carga FADH<sub>2</sub>-NAD(P)<sup>+</sup>.

Las propiedades redox de hAIF  $\Delta$ 1-102 difieren en gran medida de mAIF  $\Delta$ 1-101, a pesar de tener una longitud del extremo N-terminal similar. En primer lugar hay

que señalar la diferencia de potencial redox que existe entre hAIF  $\Delta$ 1-102 y mAIF $\Delta$ 1-120. hAIF  $\Delta$ 1-102 presenta dos potenciales redox, correspondientes a dos transferencias de un electrón consecutivas: -326 y -360mV +/- 10mV a pH 7.5 y 20°C, mientras que mAIF $\Delta$ 1-120 un paso de reducción de dos electrones: -308±15mV a pH 7.5 (Figura 4B). Por tanto existe una significativa diferencia en el funcionamiento de estas dos proteínas, por su diferente electronegatividad y por el diferente mecanismo de reducción: a través de dos transferencias de un electrón en hAIF  $\Delta$ 1-102 o mediante una única transferencia de dos electrones en mAIF $\Delta$ 1-120.

En segundo lugar, como se ha mencionado anteriormente, mAIF  $\Delta$ 1-101 puede formar dímeros (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Estos no se han podido observar en hAIF  $\Delta$ 1-102 en las condiciones de estudio aunque se debería profundizar en su estudio. Si la dimerización modula la formación y estabilización de los complejos de transferencia de carga, es posible que explique esta diferencia en cuanto a transferencia electrónica.

En el presente trabajo se ha estudiado el posible mecanismo de transferencia electrónica de AIF mediante la caracterización de mutantes del sitio activo. Existen residuos conservados en BphA4 y diversos enzimas de la familia de la glutathion reductasa (GR), los cuales se han propuesto como residuos importantes en el mecanismo redox de estas proteínas. Entre ellos, en hAIF, estos residuos se corresponden con K176, E314, F310 y W483. En este estudio se ha demostrado mediante cinética rápida con flujo detenido que los residuos K176 y E314 son esenciales para la actividad redox de AIF, ya que su sustitución por triptófano y serina, respectivamente, prácticamente elimina la capacidad redox de la proteína. Por su localización en el sitio activo y debido a que pueden formar un puente salino entre ellos: el átomo N5 del anillo de isoaloxacina del FAD estabiliza un puente de hidrógeno con el N $\zeta$  de la lisina 176 (3.0Å), el cual forma un puente salino con el glutámico 313 (2.8Å) (Maté *et al.*, 2000), parecen estar implicados en la transferencia electrónica entre NADH y FAD. Estos residuos están conservados entre todas las ferredoxin reductasas dependientes de NADH acopladas a oxigenasa. En BphA4 estos residuos se corresponden con la lisina 53 y el glutámico 159, donde el átomo O4 del anillo de isoaloxacina forma un puente de hidrógeno con el átomo N $\eta$  de la lisina 53 (2.7Å) el cual forma un puente salino con el átomo O $\epsilon$  del glutámico 159 (2.7Å), el cual forma un puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo de nicotinamida del NADH (Senda *et al.*, 2000). En lipoamida deshidrogenasa de *E. Coli* este residuo se corresponde con la lisina 53 y al sustituirlo por arginina (K53R) las propiedades espectrales y redox del FAD así como la interacción de la flavina con el NAD<sup>+</sup> unido resultaron profundamente

afectadas por el cambio (Maeda-Yorita *et al.*, 1994). En este caso, a diferencia de las proteínas mutadas K177W y E314S de hAIF, el espectro de absorbancia en el visible y en el ultravioleta cercano fueron similares a los de la enzima.

La disposición espacial de los anillos de isoaloxacina y nicotinamida es similar entre BphA4 y GR (Senda *et al.*, 2000). Esta disposición parece ser favorable para la transferencia electrónica entre NADH y FAD. Dada la estructura de la proteína mAIF (Maté *et al.*, 2001) resulta poco probable la existencia de otro surco que permita la unión del NAD<sup>+</sup> para formar un complejo con el grupo FAD. Sin embargo, debido a las dimensiones favorables de la cavidad donde se aloja la nicotinamida sí que resultaría posible que ésta pueda adoptar distintas conformaciones en las condiciones restrictivas impuesta por las mutaciones. Así un modelo de interacción de la nicotinamida podría estar formado por la combinación de dos disposiciones diferentes de la nicotinamida en la proteína: según el modelo de la FNR (Figura 4.54) y según el modelo análogo a BphA4 y proteínas de la familia (Figura 4.55). El segundo modelo es homólogo a la interacción de NAD<sup>+</sup> con BphA4 (Senda *et al.*, 2000), glutation reductasa (GR) (Pai *et al.*, 1983), lipoamida deshidrogenasa (Mattevi *et al.*, 1992) y otras enzimas de la familia, y es el propuesto para la interacción de AIF con NAD<sup>+</sup> debido a su gran homología estructural y la conservación de los residuos del sitio activo. Además, según los datos aportados por este estudio, los residuos del sitio activo de AIF humana K177, E314, F310, P173 y W483G son esenciales para la actividad redox de la proteína.

Se ha sugerido que la fenilalanina 310 de hAIF (F309 en mAIF) podría desempeñar una función de “puerta”, similar a la descrita para la valina 155 en BphA4, la cual sufre un cambio conformacional en la unión del NADH, desplazándose 0.8Å (Maté *et al.*, 2002). De esta forma el anillo de nicotinamida queda en una disposición en sandwich respecto al anillo de isoaloxacina y la cadena lateral de la valina 155. En putidaredoxin reductasa y en glutation reductasa (GR) hay una tirosina. En esta última este residuo (Tyr 177) se mueve para dejar interaccionar la nicotinamida con el anillo de isoaloxacina. Se ha demostrado que la sustitución de este residuo por serina o glicina provoca una disminución importante en la actividad catalítica de la enzima (Berry *et al.*, 1989). Análogamente, en la FNR también hay un residuo tirosina con una función similar. La tirosina en el extremo C-terminal de la FNR (Tyr314 en espinaca, Tyr308 en guisante, Tyr303 en *Anabaena*) debe desplazarse para que la nicotinamida pueda alcanzar una posición adecuada para la transferencia de electrones al FAD. La sustitución de la Tyr308 en FNR de guisante reveló la importancia de este residuo en la estabilización del entorno del FAD, resultando en una conformación que optimiza la



transferencia electrónica entre los grupos prostéticos y sus sustratos redox (Calcaterra *et al.*, 1995). El residuo F310 de AIF se corresponde con el residuo I184 de lipoamida deshidrogenasa de *E. Coli*. Su cambio por tirosina (I184Y) demostró que es un residuo importante que modula las propiedades de la flavina (Maeda-Yorita *et al.*, 1991). Esta sustitución provoca cambios importantes en el espectro visible de la proteína oxidada y en el dicroísmo circular y datos por cinética rápida en flujo detenido indican que la reducción por NADH está ligeramente ralentizada, mientras que la transferencia electrónica de dos electrones al disulfuro está inhibida en gran parte.

Los datos de cinéticas rápidas con flujo detenido aportados por el presente estudio indican que un cambio de la F310 de hAIF a glicina provoca un dramático efecto sobre la semireacción de reducción de AIF con NADH, lo cual aporta evidencia sobre la importancia de este residuo para la función redox. Además la mutación F310G provoca un cambio drástico en la proteína hacia un potencial redox más electropositivo ( $E^{0'} = -20\text{mV}$ , aproximadamente), lo cual indica que la fenilalanina 310 está modulando el potencial redox de la flavina. Esta contribución al potencial redox del FAD es significativamente mayor que la descrita para el residuo H453 de mAIF $\Delta$ 1-77 (Churbanova y Sevrioukova, 2008), que se correspondería con la H454 de hAIF, ya que su sustitución por leucina (H453L) produce un cambio menor en el potencial redox de la flavina ( $E^{0'} = -285\text{mV}$ ).

La P173 de hAIF también es un residuo ampliamente conservado en todas las ferredoxin reductasas NADH dependientes acopladas a oxigenasa. Parece interactuar con el anillo de isoaloxacina desde el lado *si* como un soporte interno. Se corresponde con la P49 de BphA4 y se ha sugerido que es un residuo importante para el posicionamiento del anillo de isoaloxacina. El resultado de los análisis de las cinéticas rápidas respecto a la reducción de hAIF con NADH indican que este residuo es importante para la semireacción de reducción de la flavina, ya que su cambio por glicina reduce significativamente la actividad redox de la proteína.

Tanto en AIF como en las reductasas NADH dependientes similares a BphA4 está conservada la secuencia Trp-Ser-Asp en el lado *si* del anillo de isoaloxacina. En BphA4 este Trp (residuo 320) está bastante expuesto al solvente y se ha demostrado la implicación de este residuo en la transferencia electrónica desde el FAD reducido al cluster [2Fe-2S] de la ferredoxina (Senda *et al.*, 2007). Además la pteridina del FAD presenta una interacción de van der Waals con la cadena lateral del Trp 320 y, por otra parte, en la formación del complejo BphA4:NADH el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena principal del Trp 320 forma un puente de hidrógeno con el átomo N7 del anillo

de nicotinamida (Senda *et al.*, 2000). En AIF, sin embargo, este Trp parece estar protegido de su contacto con el solvente por mediación de la región helicoidal del extremo C-terminal (Maté *et al.*, 2002), la cual está ausente en BphA4 (Senda *et al.*, 2000). Este dato viene apoyado en este estudio por el espectro de emisión de fluorescencia del triptófano del mutante W483G, el cual no presenta ningún desplazamiento hacia el azul respecto a hAIF salvaje. Este mutante presenta una semireacción de reducción con NADH ralentizada, lo cual indica que puede intervenir en la estabilización de la flavina o en su reducción con NADH. El potencial redox del mutante W483G ( $E^{0'} = -292$  mV) es sólo ligeramente más electropositivo que la proteína salvaje, lo cual parece dirigir su función hacia la estabilización del complejo con  $\text{NAD}^+$ , en lugar de estabilizar la flavina y modular su potencial redox. Este resultado se correlaciona con la posible intervención de este residuo en la semireacción oxidativa, análogamente a la descrita para BphA4 (Senda *et al.*, 2007). Sin embargo, para su posible intervención en la semireacción de oxidación de la flavina tendría que haber un cambio conformacional en hAIF en presencia de su sustrato fisiológico, ya que este residuo no se encuentra expuesto al solvente, como indica la estructura tridimensional (Maté *et al.*, 2002) y los datos comparativos de este estudio de los espectros de emisión de fluorescencia del triptófano del mutante W483G respecto a la proteína salvaje. Estos cambios estructurales parecen bastante probables según lo observado para AIF en su reducción con NADH (Churbanova y Sevrioukova, 2008) y en la formación del complejo BpHA4:BpHA3, como modelo análogo (Senda *et al.*, 2007).

Los mutantes mostraron espectros de emisión de fluorescencia del triptófano sin una alteración significativa del rendimiento cuántico respecto a la forma salvaje. Una disminución del rendimiento cuántico se había observado previamente con los mutantes E313A y K176A en mAIF (Maté *et al.*, 2002) y se atribuyó a un incremento en la movilidad del anillo de isoaloxacina que reduciría la transferencia de la energía de Förster desde los residuos de triptófano a la flavina y justificaba la pérdida del grupo prostético FAD durante la purificación de las proteínas. Según los resultados obtenidos en este trabajo esta pérdida se justificaría por la interacción de los residuos E314 y K177 estabilizando la unión de la flavina.

En resumen, los residuos K176, E314, F310, P173 y W483G son esenciales para la actividad redox de la proteína hAIF  $\Delta 1-102$ , afectando a la semireacción de reducción de la flavina con NADH. Resulta necesario profundizar más en su estudio para determinar su función exacta en el mecanismo de transferencia electrónica y/o estabilización de la flavina y modulación de su potencial redox, sin embargo, por los

datos aportados en este estudio, es evidente que son residuos clave para la actividad redox de la proteína. El mecanismo a través del cual se realiza parece por tanto similar al descrito para BphA4 y enzimas de la familia de la glutation reductasa (GR), lo cual apoya la teoría que existe sobre el origen evolutivo de AIF, la cual habría evolucionado a partir de ferredoxin reductasas NADH dependientes, acopladas a oxigenasa de bacterias aeróbicas (Senda *et al.*, 2000). Además, la formación de los complejos de transferencia de carga CT1 y CT2 parece importante para la transferencia electrónica de hAIF $\Delta$ 1-102, lo cual se corresponde con lo descrito para mAIF $\Delta$ 1-101 (Churbanova y Sevrioukova, 2008).

#### *Hipótesis sobre la función redox de AIF*

En las bacterias, los compuestos hidrocarbonatos como el alcanfor, los n-alcanos y los bencenos/bifenilos se oxidan o hidroxilan mediante los sistemas enzimáticos del citocromo P450cam, la alcano hidroxilasa y la benceno/bifenilo dioxigenasa (Harayama *et al.*, 1992). Estos sistemas tienen distintos sustratos y reacciones catalíticas, sin embargo tienen varias características en común: 1) estas enzimas están formadas por una oxigenasa terminal y un sistema de transporte electrónico; 2) el sitio activo en la oxigenasa terminal contiene un átomo de Fe esencial para su reacción; 3) los electrones que se obtienen del NADH se transportan mediante un sistema de transporte electrónico al sitio activo; y 4) los electrones son necesarios para activar el oxígeno en el sitio activo. El sistema de transporte electrónico de estas oxigenasas (o hidrolasas) tiene generalmente dos componentes: una ferredoxina reductasa NADH dependiente acoplada a oxigenasa (ONFR), que en el caso del sistema de la benceno/bifenilo dioxigenasa es BphA4, y una proteína hierro-azufre, que en la mayoría de los casos es ferredoxina. La homología estructural y la relación filogenética entre BphA4 y AIF, así como la conservación de los residuos potencialmente funcionales en el sitio activo, llevó a sugerir que AIF podría ser el componente de un sistema de transporte electrónico similar al de BphA4 (Senda *et al.*, 2000). Por ello, debido a la localización mitocondrial de AIF, se ha establecido la hipótesis según la cual esta proteína podría estar implicada en la cadena respiratoria, la cual representa un sistema de obtención energética análogo al bacteriano. La implicación de AIF en la fosforilación oxidativa se demostró por Vahsen *et al.* en el año 2004. Según estos autores AIF se relaciona con el complejo I de la cadena respiratoria e interviene en la integridad y el mantenimiento de las estructuras de la misma. Sin embargo su función permanece sin resolver. Los datos aportados por Vahsen y cols se justificarían por la implicación de AIF en la formación de los supercomplejos respiratorios, aunque en este estudio los supercomplejos *a* y *b* no parecen estar afectados, o bien en el propio ensamblaje del complejo I. De acuerdo con

el modelo del estado sólido, actualmente reconsiderado (Rich, 1984), las asociaciones en estructuras supramoleculares implican que una alteración en uno de los complejos respiratorios puede afectar la estabilidad de otros complejos respiratorios. Se ha demostrado en *Paracoccus denitrificans* que el ensamblaje de los complejos respiratorios I, III y IV en el supercomplejo NADH oxidasa estabiliza el complejo I (Stroh *et al.*, 2004) y que se requiere el ensamblaje del complejo III para el ensamblaje/estabilidad del complejo I (Schägger, 2000). Sin embargo estos efectos pleiotrópicos también han sido observados en estudios con mutaciones en genes estructurales del complejo I y V y proteínas de ensamblaje de los complejos II y IV, y no se correlacionan con la formación de los supercomplejos (Marsy *et al.*, 2008). Estos autores justifican los efectos observados como una regulación negativa de la cadena respiratoria para evitar un incremento en el potencial de membrana o la acumulación de intermediarios reducidos. Dado que la apoptosis se encuentra asociada en gran medida a la depleción masiva de NADH/NADPH (Poot y Pierce, 1999), también se ha propuesto un modelo de AIF como proteína reguladora del balance redox NADH/NAD<sup>+</sup> mitocondrial (Churbanova y Sevrioukova, 2008). Por otra parte se ha demostrado que la actividad NADH oxidasa caracterizada en este trabajo está implicada en la actividad del complejo I respiratorio (Urbano *et al.*, 2005), lo cual parece relacionar AIF con el flujo electrónico a través de este complejo. Si abordamos este problema desde el punto de vista filogenético y estructural, por lo anteriormente citado, AIF debería interactuar con un componente tipo ferredoxina o con grupos sulfoferricos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial o con otra ferredoxina de una cadena de transporte electrónico cuyo componente final sea una oxigenasa. La ferredoxina del complejo citocromo *bc1* (ISP) es similar al componente ferredoxina BphA3 del sistema de la benceno/bifenilo dioxigenasa. BphA3 es una ferredoxina tipo Rieske y contiene un cluster [2Fe-2S] coordinado por dos residuos de cisteína y dos residuos de histidina, al igual que ISP del complejo citocromo *bc1*. Sin embargo el dominio globular de ISP se encuentra expuesto al espacio intermembrana y estudios topológicos sobre AIF han revelado su localización como proteína de la membrana interna, con el extremo N-terminal en el lado de la matriz y el C-terminal en el lado del espacio intermembrana (Otera *et al.*, 2005). El estudio de las posibles interacciones de AIF con subunidades ferredoxina de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial o componentes ferredoxina mitocondriales puede aportar una importante información sobre la función redox de AIF.

## *6. CONCLUSIONES*



1. mAIF $\Delta$ 1-120 es una flavoproteína que presenta un único grupo prostético, FAD, unido de forma no covalente y con una relación molar 1:1. No presenta ningún metal coordinado.
2. mAIF $\Delta$ 1-120 a concentración salina cercana a la fisiológica se encuentra en forma monomérica.
3. mAIF $\Delta$ 1-120 presenta tres grupos tiol accesibles por molécula que no forman puentes disulfuro. Estos grupos no parecen estar implicados en transporte redox a diferencia de los enzimas de la familia de la glutation reductasa (GR).
4. mAIF $\Delta$ 1-120, mAIF $\Delta$ 1-101 y hAIF $\Delta$ 1-102 muestran las características espectroscópicas de una flavoproteína con FAD, con máximos en el visible a 378 nm y 450 nm y un hombro a 467 nm. El coeficiente de extinción para mAIF $\Delta$ 1-120 es 12.12 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y para hAIF $\Delta$ 1-102 es 15.37 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.
5. mAIF $\Delta$ 1-120 une NADH y NADPH que, en cantidades equimoleculares, producen la reacción completa de la flavoproteína, sin formación del intermediario semiquinona. Se generan dos complejos de transferencia de carga muy estables con máximos a 637 y 774 nm para el NADH y 740 y 779 nm para NADPH.
6. El potencial redox de mAIF $\Delta$ 1-120 es dependiente del pH. mAIF $\Delta$ 1-120 presenta valores de potencial redox -264±12 mV a pH 6.5, -308±15mV a pH 7.5 y -373±15mV a pH 9, asumiendo una transferencia en un paso de dos electrones. La desviación de los valores teóricos (58 mV/unidad de pH) para este tipo de transferencia indica la posible presencia de otros grupos disociables cuyos valores de pK<sub>a</sub> son dependientes del estado redox del enzima.
7. hAIF $\Delta$ 1-102 presenta dos potenciales redox correspondientes a dos transferencias de un electrón consecutivas: -326 y -360mV +/- 10mV a pH 7.5 y 20°C.
8. mAIF $\Delta$ 1-120 presenta actividad diaforasa con aceptores de un electrón y de dos electrones.
9. mAIF $\Delta$ 1-120 tiene actividades NADH oxidasa, monodehidroascorbato reductasa, citocromo c reductasa y adrenodoxina reductasa. mAIF $\Delta$ 1-120 reducida puede generar anión superóxido en condiciones aeróbicas.
10. AIF nativa mitocondrial posee una actividad NADH oxidasa/NBT reductasa igual a la proteína recombinante.
11. La actividad redox de mAIF $\Delta$ 1-120 y mAIF $\Delta$ 1-101 es independiente de su actividad apoptogénica.

12. La presencia de NADH o NADPH, que puede inducir un cambio conformacional en mAIF $\Delta$ 1-120, no influye sobre la capacidad apoptogénica de la proteína.
13. La apoproteína de mAIF $\Delta$ 1-120 y mAIF $\Delta$ 1-101 presenta la misma capacidad apoptogénica que la holoproteína.
14. Hsp70 no afecta a la capacidad redox de mAIF $\Delta$ 1-120.
15. Los residuos K177, E314, F310, P173 y W483 están implicados en la transferencia electrónica de hAIF $\Delta$ 1-102.
16. El residuo F310 modula el potencial redox de la flavina. Su cambio por glicina produce un dramático efecto sobre el potencial redox de AIF humana ( $E^{0'}$  = -20 mV, aproximadamente) y también en el modo de transferencia de los electrones, que en AIF humana salvaje consiste en dos pasos con transferencia de un electrón y en el mutante F310G se observa un paso con transferencia de dos electrones.



## *7. BIBLIOGRAFIA*



**Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW.** (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 9(2):423-32.

**Adrain C and Martin SJ.** (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.* 26: 390-397.

**Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ.** (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J. Biol. Chem.* 274:20855-20860.

**Abrams JM.** (1999). An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends Cell Biol.* 9:435-440.

**Alano CC, Ying W and Swanson RA.** (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated cell death in astrocytes requires NAD<sup>+</sup> depletion and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 279(18):18895-902

**Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87(2):171.

**Anderson DH, Sawaya MR, Cascio D, Ernst W, Modlin R, Krensky A, Eisenberg D.** (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 325(2):355-65.

**Anel A, Gamen S, Alava MA, Schmitt-Verhulst M, Pineiro A, Naval J.** (1997). Inhibition of CPP32-like proteases prevents granzyme B- and Fas-, but not granzyme A-based cytotoxicity exerted by effector T cells. *Int. Immunol.* 8(7):1173-83.

**Arcari P, Masullo L, Masullo M, Cantazano F, Bocchini V.** (2000). A NAD(P)H oxidase isolated from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is not homologous with another NADH oxidase present in the same microorganism. Biochemical characterization of the enzyme and cloning of the encoding gene. *J. Biol. Chem.* 275:895-900.

**Arnoult D, Tatischeff I, Estaquier J, Girard M, Sureau F, Tissier JP, Grodet A, Dellinger M, Traincard F, Kahn A, Ameisen JC, Petit PX.** (2001). On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death. *Mol Biol Cell.* 12(10):3016-30.

**Arnoult D, Parone P, Martinou J-C, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen J-C.** (2002). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome *c* release in response to several proapoptotic stimuli. *J. Cell Biol.* 159(6):923-929.

**Ashkenazi A y Dixit VM.** (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281: 1305-8.

**Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G.** (2003). Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidant stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell. Biol.* 163:777-787.

**Auclair C., Torres M. and Hakim J.** (1978). Superoxide anion involvement in NBT reduction catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase: a pitfall. *FEBS Lett.* 89, 26-28.

**Auclair C. and Voisin E.** (1986). Nitroblue tetrazolium reduction. In CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Greenwald, R.A., ed), pp. 123-132. CRC Press, Boca Ratón, FL. USA.

**Barry M y Bleackley RC.** (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 401-9.

**Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, Bleackley RC.** (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-Lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell. Biol.* 20:3781-3794.

**Berry A, Scrutton NS, Perham RN.** (1989). Switching kinetic mechanism and putative proton donor by directed mutagenesis of glutathione reductase. *Biochemistry*. 28(3): 1264-9.

**Bilyy R, Kit Y, Hellman U, Stoika R.** (2008). AMID: new insights on its intracellular localization and expression at apoptosis. *Apoptosis*. 13(5):729-32.

**Blackstone NW.** (1995). A units-of-evolution perspective on the endosymbiont theory of the origin of the mitochondrion. *Evolution*. 49: 785-796.

**Blackstone NW and Green DR.** (1999). The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays*. 21: 84-88.

**Boekema EJ, Braun HP.** (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* 282(1):1-4.

**Böhme H and Schrautemeier S.** (1987). Comparative characterization of ferredoxins from heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 891, 1-7.

**Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA.** (2007). AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. *Cell Cycle*. 2007 Aug 1;6(21)

**Boulikas, T.** (1993). Nuclear localization signals (NLS). *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* 3: 193-227.

**Boya P, Roques B, Kroemer G.** (2001). Bacterial and viral proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 20:4325-4331.

**Bras M, Queenan B. y and Susin S.A.** (2005). Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Moscow)*. 70(2):231-239. Traducido de *Biokhimiya*. 70(2):284-293.

**Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C.** (2000). Hsp27

negatively regulates cell death by interacting with cytochrome *c*. *Nat Cell Biol.* 2: 645–52.

**Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N.** (2003). Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin. Immunol.* 15, 167-76.

**Calcaterra NB, Pico GA, Orellano EG., Ottado J, Carrillo N. y Ceccarelli E.A.** (1995). Contribution of the FAD binding site residue tyrosine 308 to the stability of pea ferredoxin-NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *Biochemistry* 34:12842-12848.

**Camins A, Pallas M, Silvestre JS.** (2008) Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 30(1):43-65.

**Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G.** (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF) : key to the conserved caspase independent pathways of cell death ?. *J. Cell Sci.* 115: 4727-4734.

**Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G.** (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene.* 26; 23(8): 1514-21.

**Candé C, Vahsen N, Metivier D, Tourriere H, Chebli K, Garrido C, Tazi J, Kroemer G.** (2004). Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *J. Cell Sci.* 117 (Pt 19): 4461-8.

**Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM, Clark RS, Graham SH, Chen J.** Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J. Neurosci.* 27(35): 9278-93.

**Cavallini D, Graziani MT, Drupe S.** (1966). Determination of disulphide groups in proteins. *Nature.* 212 (5059): 294-295.

**Cedano, J., P. Aloy, J.A. Pérez-Pons, and E. Quero.** (1997). Relation between amino acid composition and cellular location of proteins. *J. Mol. Biol.* 266(3):594-600.

**Cheung EC, Joza N, Steenaart NA, McClellan KA, Neuspiel M, McNamara S, MacLaurin JG, Rippstein P, Park DS, Shore GC, McBride HM, Penninger JM, Slack RS.** (2006). Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J.* 25(17):4061-73.

**Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, García I, Browning JL.** (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 32401-10.

**Chinnaiyan AM.** (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1, 5-15.

**Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC.** (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* 374(6524):733-6.

**Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC.** (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7(8):1127-38.

**Chomyn A y Attardi G.** (2003). MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:519-529.

**Christophe M, Nicolas S.** (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des.* 12(6): 739-57.

**Churbanova IY y Sevrioukova IF.** (2008). Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis inducing factor. *J. Biol. Chem.* 283(9): 5622-5631.

**Colbert CL, Couture MMJ, Eltis LD y Bolin JT.** (2000). A cluster exposed: structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins. *Structure.* 8(12), 1267-1278.

**Colussi PA, Harvey NL, Kumar S.** (1998). Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J. Biol. Chem.* 273(38):24535-42.

**Constantini P, Bruey J-M, Castedo M, Metivier D, Loeffler M, Susin SA, Ravagnan L, Zamzami N, Garrido C, Kroemer G.** (2002). Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ.* 9:82-88.

**Cregan SP, Dawson VL, Slack RS.** (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 12; 23(16): 2785-96.

**Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu S-W, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G and Slack RS.** Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* 158(3): 508-517.

**Crompton M.** (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341(Pt 2): 233-49.

**Culmsee C, Landshamer S.** (2006). Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res.* 3(4): 269-83.

**Dastoor Z and Dreyer J-L.** (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J. Cell Sci.* 114(9): 1643-1653.

**Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G.** (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters.* 476: 118-123.

**Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prévost M-C, Leber B, Andrews D, Penninger J and Kroemer G.** (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14(5): 729-739.



**DeLano, W. L.** (2002). The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.

**Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, Bras M, Lesbordes-Brion JC, Petres S, Bellalou J, Susin SA.** (2006a). AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) proapoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J. Biol. Chem.* 281(10):6413-27.

**Delettre C, Yuste VJ, Moubarak RS, Bras M, Robert N, Susin SA.** (2006b). Identification and characterization of AIFsh2, a mitochondrial Apoptosis-inducing Factor (AIF) isoform with NADH oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 281(27), 18507-18518.

**Deng Z, Aliverti A, Zanetti G, Arakaki AK, Ottado J, Orellano EG, Calcaterra NB, Ceccarelli EA, Carrillo N, Karplus PA.** (1999). A productive NADP<sup>+</sup> binding mode of ferredoxin- NADP<sup>+</sup> reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nature Struct. Biol.* 6, 847-853.

**Deonarain MP, Berry A, Scrutton NS, Perham RN.** (1989). Alternative proton donors/acceptors in the catalytic mechanism of the glutathione reductase of *Escherichia coli*: the role of histidine-439 and tyrosine-99. *Biochemistry.* 28(25):9602-7.

**Desagher S, Martinou JC.** (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 10(9):369-77. Review.

**Deveraux QL, Reed JC.** IAP-family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13(3):239-52.

**Devreese B, Vanrobaeys F, Smet J, Van Beeumen J, Van Coster R.** (2002). Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 23:2525-2533.

**DiMauro S. y Schon E.A.** (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 348:2656–2668.

**Doolittle WF.** (1998). A paradigm gets shifty. *Nature.* 392:15-16.

**Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X.** (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.

**Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:383-424.

**Ellis HM y Horvitz HR.** (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 44(6):817-29.

**Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR.** (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 7:663-98.

**Ellman, GL.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

**Elmore S.** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495-516.

**Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ.** (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15, 2286-7.

**Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43-50.

**Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, Krensky AM, Leippe M, Bloom BR, Ganz T y Modlin RL.** (2000). Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol.* 165(12):7102-8.

**Eskes R, Desagher S, Antonsson B y Martinou JC.** (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* 20(3):929-35.

**Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B.** (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.* 266(3):699-717.

**Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM y Bratton DL.** (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276:1071-7.

**Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Liebermann J.** (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* 112:659-72.

**Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES.** (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269(49):30761-4.

**Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L.** (2002). Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J. Immunol.* 169:4805-10.

**Ferri KF, Kroemer G.** (2000). Control of apoptotic DNA degradation. *Nat. Cell Biol.* 2(4):E63-4.

**Ferri KF, Kroemer GK.** (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biol.* 3:E255-E263.

**Fersht, A.** (1999). Structure and Mechanism in Protein Science. WH Freeman & Co., New York, NY.

**Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ.** (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.* 182, 41-9.

**Frade JM y Michaelidis TM.** (1997). Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? *Bioessays* 19: 827-832.

**Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET.** (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 275(50):39458-65.

**Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G.** (2008). No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.* 15(7): 1113-23.

**Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G.** (2006). Mitochondrial as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene.* 25(34): 4812-30.

**Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Kroemer G.** (2008). Targetting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.* Sep 24 [Epub ahead of print].

**García-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA.** (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 273:32608-32613.

**Ghisla S y Massey V.** (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* 181, 1-17.

**Glass GA, DeLisle DM, DeTogni P, Gabig TG, Magee BH, Marker M and Babior BM.** (1986). The respiratory burst oxidase of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 261, 13247-13251.

**Goto M, Yamada T, Kimbara K, Horner J, Newcomb M, Gupta TK, Chakrabarty AM.** (2003). Induction of apoptosis in macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* azurin: tumor-suppressor protein p53 and reactive oxygen species, but not redox activity, as critical elements in cytotoxicity. *Mol. Microbiol.* 47:549-559.

**Gounaris K.** (2002). Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity.* 70 (9): 4917-4924.

**Gounaris K, Thomas S, Najarro P and Selkirk ME.** (2001). Secreted variant of nucleoside diphosphate kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. 69(6): 3658-3662.

**Green DR y Kroemer G.** (1998). The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases? *Trends Cell Biol.* 8:267-271.

**Green DR y Reed JC.** (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281: 1309-1312.

**Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ.** (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274(2):1156-63.

**Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES.** (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277(16): 13430-13437.

**Gurbuxani S, Schmitt E, Candé C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, Kouranti I, Spahr C, Pance A, Kroemer G, Garrido C.** (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*. 2; 22(43): 6669-78.

**Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM.** (1999). Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol. Immunol.* 36(7):413-22.

**Haraguchi M, Torii S, Matsuzawa S, Xie Z, Kitada S, Krawski S, Yoshida H, Mak TW, Reed JC.** (2001). Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2. *J. Exp. Med.* 191:1709-1720.

**Harayama S, Kok M y Neidle EL.** (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565-601.

**Hatefi Y.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54:1015-1069.

**Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernoooy SY, Hay BA.** (2000). The Drosophila caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275(35):27084-93.

**Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** (2001). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts IAP-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 17:17.

**Hengartner MO.** (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 104(3):325-8.

**Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ.** (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* 23:2134-45.

**Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G.** (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15:1573-1582.

**Hong YS, Kerr DS, Liu TC, Lusk M, Powell BR, Patel MS.** (1997). Deficiency of dihydrolipoamide dehydrogenase due to two mutant alleles (E340K and G101del). Analysis of a family and prenatal testing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362(2-3):160-8.

**Horvitz HR.** (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59:1701s-1706s.

**Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 81:495-504.

**Hsu YT, Youle RJ.** (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 272(21):13829-34.

**Huang DC, Cory S, Strasser A.** (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene.* 14(4):405-14.

**Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T.** (2000). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* 275(35):26661-4.

**Igney FH y Krammer PH.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* 2:277-88.

**Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Marttman C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 388(6638):190-5.

**Jacobson MD, Burne JF, Raff MC.** (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13:1899-1910.

**Jarash ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW.** (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell.* 25:67-82.

**Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanfordk WL, Cho SK, Lik CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G y Penninger JM.** (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 410, 549-554.

**Joza N, Galindo K, J A Pospisilik JA, Benit P, M Rangachari M, Kanitz EE, Y Nakashima Y, Neely GG, Rustin P, J M Abrams JM, Kroemer G y Penninger JM.** (2008). The molecular archaeology of a mitochondrial death effector: AIF in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation.* 15, 1009–1018.

**Kalinowska M, Garnarcz W, Pietrowska M, Garrard WT, Widlak P.** (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: Involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis.* 10(4):821-30.

**Karplus PA, Daniels MJ, Herriott JR.** (1991). Atomic structure of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science.* 4;251(4989):60-6.

**Karplus PA, Schulz GE.** (1989). Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme:substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 210, 163-180.

**Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J.** (1998). FLIP prevents apoptosis induced by receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161, 3936-42.

**Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.** (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 73, 2013-26.

**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26(4):239-57.

**Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K, Durum SK.** (1999). Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(25):14476-81.

**Kim H.** (2002). Activity of human dihydrolipoamide dehydrogenase is reduced by mutation at threonine-44 of FAD-binding region to valine. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35(4):437-41.

**Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 14:5579-88.

**Klein JA and Ackerman SL.** (2003). Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 111: 785-793.

**Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL.** (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 419: 367-374.

**Kluck RM, Bossy-Wetzel F, Green DR, and Newmeyer DD.** (1997). The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275: 1132-1136.



**Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD.** (1997). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 16:4639-4649.

**Kluck RM, Ellerby LM, Ellerby HM, Naiem S, Yaffe MP, Margoliash E, Bredesen D, Mauk AG, Sherman F, Newmeyer DD.** (2000). Determinants of cytochrome c proapoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J. Biol. Chem.* 275:16127-16133.

**Kohler C, Gahm A, Noma T, Nakazawa A, Orrenius S and Zhirotovsky B.** (1999). Release of adenylate kinase 2 from mitochondrial intermembrane space during apoptosis. *FEBS Lett.* 447:10-12.

**Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT.** (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 278:294-8.

**Kotlyar AB, Sled VD, Burbaev DS, Moroz IA y Vinogradov AD.** (1990). Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles. *FEBS Lett.* 264:17-20.

**Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie ZH, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC.** (1999). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:5752-5757.

**Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC.** (1994). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res.* 54(21):5501-7.

**Krensky AM.** (2000). Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol.* 59(4):317-20.

**Kroemer G.** (1997). Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.* 4:443-456.

**Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M.** (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:619-642.

**Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C.** (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87:99-163.

**Kroemer G, Petit PX, Zamzami N, Vayssière J-L, Mignotte B.** (1995). The biochemistry of apoptosis. *FASEB J.* 9:1277-1287.

**Kroemer G, Reed JC.** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6:513-519.

**Kröger A y Klingenberg M.** (1973). Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin. *Eur. J. Biochem.* 39:313-323.

**Kumar S y Harvey NL.** (1995). Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett.* 20; 375(3):169-73.

**Kyte, J.** (1995). Flavin. En Mechanisms in protein chemistry. (Kyte, J., ed), pp.72-89. Garland Publishing Inc., New York.

**Lane, N.** (2006). Mitochondrial disease: Powerhouse of disease. *Nature.* 440, 600-602.

**Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C.** (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell Mol. Med.* 12(3): 743-61.

**Lantwin CB, Schlichting I, Kabash W, Pai EF, Krauth-Siegel RL.** (1994). The structure of *Trypanosoma cruzi* Trypanotione reductase in the oxidized and NADPH reduced state. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 18, 161-173.

**Le Bras M, Rouy I, Brenner C.** (2006). The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. *Med Chem.* 2(1):1-12.

**Leippe M.** (1995). Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell.* 83(1):17-8.

**Leist M y Jaattela M.** (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 2(8):589-98.

**Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ.** (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2(3):183-92.

**Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS.** (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 275: 25665–71.

**Li LY, Luo X and Wang X.** (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412(6842): 95-99.

**Li R, Bianchet MA, Talalay P y Amzel LM.** (1995). The three-dimensional structure of NAD(P)H :quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: Mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 8846-8850.

**Lieberman J y Fan Z.** (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* 15:553-9.

**Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB.** (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell.* 6(6):1389-99.

**Linke B, Henke W, Gerber G.** (1993). Identification of an external NADH oxidase in rat kidney cortex mitochondria. *Ren. Physiol. Biochem.* 16:244-248.

**Lipinska B, Zyllicz M, Georgopoulos C.** (1990). The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172:1791-1797.

**Lipton SA and Bossy-Wetzel E.** (2002). Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell*. 111: 147-150.

**Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A.** The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ*. 5(4):411-7.

**Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86(1):147-157.

**Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 89(2):175-84.

**Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104:487-501.

**Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen A-L, Brothers G, Penninger JM and Kroemer G.** (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*. 15: 758-767.

**López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Del Río LA.** (1999). Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J*. 337, 531-536.

**Lorenzo HK, Susin SA.** (2007). Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat*. 10(6):235-55.

**Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J and Kroemer G.** (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*. 6, 516-524.

**Lumper L, Schneider W, Staudinger H.** (1967). Studies on the kinetics of microsomal NADH:semidehydroascorbate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 348(3):323-8.

**Luo X, Budhardjo I, Zou H, Salughter C, Wang X.** (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94(4):481-90.

**Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.** (1982). *Molecular Cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

**Massey V.** (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269 (36): 22459-22462.

**Maté MJ, Ortiz-Lombardía M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G, Alzari PM.** (2002). The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol.* 9(6): 442-6.

**Maeda-Yorita K, Russell GC, Guest JR, Massey V, Williams CH Jr.** (1994). Modulation of the oxidation-reduction potential of the flavin in lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* by alteration of a nearby charged residue, K53R. *Biochemistry.* 33(20): 6213-20.

**Maeda-Yorita K, Russell GC, Guest JR, Massey V, Williams CH Jr.** (1991). Properties of lipoamide dehydrogenase altered by site-directed mutagenesis at a key residue (I184Y) in the pyridine nucleotide binding domain. *Biochemistry.* 30(51):11788-95.

**Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A.** (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signalling. *J. Cell Biol.* 140:1485-1495.

**Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J.** (2005). Fas-, caspase-8, and caspase-3-dependent signaling regulated the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 280:39460-7.

**Marchenko ND, Zaika A and Moll UM.** (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275:16202-16212.

**Margulis L.** (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1071-1076.

**Marshall KR, Gong M, Wodke L, Lamb JH, Jones D.J.L., Farmer PB, Scrutton NS, Munro AW.** (2005). The human apoptosis-inducing protein AMID is an oxidoreductase with a modified flavin cofactor and DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 280(35):30735-30740.

**Marsy S, Frachon P, Dujardin G, Lombès A, Lemaire C.** (2008). Respiratory mutations lead to different pleiotropic effects on OXPHOS complexes in yeast and in human cells. *FEBS Letters.* 582:3489-3493.

**Martin D, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ.** (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 273(8):4345-9.

**Martinou J-C, Green DR.** (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 140:1485-1495.

**Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J.** (2001). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a Reaper-like motif. *J. Biol. Chem.* 15:15.

**Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prévost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G.** (1998a). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 281(5385):2027-31

**Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G.** (1998b). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187(8):1261-71.

**Mattevi A, Obmolova G, Sokatch JR, Betzel C, Hol WGJ.** (1992). The refined crystal structure of *Pseudomonas putida* Lipoamide dehydrogenase complexed with NAD<sup>+</sup> at 2.45 Å resolution. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 13, 336-351.

**Medema JP, Scaffidi C, Kischkel C, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME.** (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J.* 16(10):2794-804.

**Melnikov A, Zaborina O, Dhiman N, Prabhakar BS, Chakrabarty AM and Hendrickson W.** (2000). Clinical and environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells. *Mol. Microbiol.* 36:1481-1493.

**Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G y Susin SA.** (2001). NADH-oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF). *J. Biol. Chem.* 276:16391-16398.

**Mittl PRE, Schulz GE.** (1994). Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocyte. *Protein Sci.* 3, 1504-1514.

**Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G.** (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell. Biol.* 16(5): 264-72.

**Mohazzab KM y Wollin MS.** (1994). Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO<sub>2</sub> sensor. *Am J Physiol.* 267(6 Pt 1):L823-31

**Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A.** (2001). Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation- induced death of human T cells. *J. Immunol.* 167(12):6736-44.

**Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW.** (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-XL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature.* 381(6580):335-41.

**Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J.** (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403:98-103.

**Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA *et al.*** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376(6535):37-43.

**Nicholson DW y Thornberry NA.** (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22(8):299-306.

**Niimura Y, Poole LB, Massey V.** (1995). *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J. Biol. Chem.* 270:25645-25650.

**Nijhawan D, Honarpour N, Wang X.** (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 23, 73-87.

**Nijhawan L P D, Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang.** (1997). Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.

**Niquet J, Seo DW, Wasterlain CG.** (2006). Mitochondrial pathways of neuronal necrosis. *Biochem Soc. Trans.* 34(Pt 6): 1347-51.

**Nohl H.** (1987). Demonstration of the existence of an organo-specific NADH dehydrogenase in heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 169:585-591.

**Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlén P, Orrenius S, Zhivotovsky B.** (2008). An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. Sep 19 [Epub ahead of print].



**Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jaattela M.** (2004). Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med.* 200: 425–35.

**Ohiro Y, Garkavtsev I, Kobayashi S, Sreekumar KR, Nantz R, Higashikubo BT, Duffy SL, Higashikubo R, Usheva A, Gius D, Kley N, Horikoshi N.** (2002). A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor (AIF). *FEBS Letters.* 524: 163-171.

**Ohnisni K, Niimura Y, Yokoyama K, Hidaka M, Masaki H, Uchimura T, Suzuki K, Uozumi T, Kozaki M, Komagata K y Nishimo T.** (1994). Purification and analysis of a flavoprotein functional as NADH oxidase from *Amphibacillus xylanus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 31418-31423.

**Opferman JT y Korsmeyer SJ.** (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol.* 4, 410-5.

**Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, 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.

**Pena SV, Hanson DA, Carr BA, Goralski TJ, Krensky AM.** (1997a). Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J. Immunol.* 158(6):2680-8.

**Pena SV y Krensky AM.** (1997b). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin. Immunol.* 9(2):117-25.

**Pai EF y Schulz GE.** (1983). The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from X-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol Chem.* 258, 1752-1757.

**Panner A, Murray JC, Berger MS, Pieper RO.** (2007). Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in human glioma. *Cancer Res.* 67: 9482–9.

**Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C.** (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 304: 505–12.

**Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM.** (2002). Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control. *Eur J Immunol.* 32(10):2881-7.

**Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ.** (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun Nterminal kinase. *EMBO J.* 20: 446–56.

**Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, Susin SA, Irinopoulou T, Koehler C and Kroemer G.** (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.* 7: 137-144.

**Penninger JM y Kroemer G.** (2003). Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution. *Nat. Cell Biol.* 5: 97-99.

**Peter ME y Krammer PH.** (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10:545-51.

**Peter ME, Scaffidi JP, Medema F, Kishkel F, Krammer PH.** (1999). The death receptors. *Results Probl. Cell Differ.* 23:25-63.

**Petros AM, Medek A, Nettekheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, Kesik SW.** (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(6):3012-7.

**Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW.** (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3):83-94. Review.

**Polster BM, Etxebarria A, Basañez G, Hardwick M y Nicholls DG.** (2005). Calpain I induces cleavage and release of apoptosis inducing factor from isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280(8):6447-54.

**Poot M y Pierce RH.** (1999). Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* 35:311-317.

**Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG y Gabai VL.** (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 283, 1-16.

**Punj V, Zaborina O, Dhiman N, Falzari K, Bagdasarian M and Chakrabarty AM.** (2000). Phagocytic cell killing mediated by secreted cytotoxic factors of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 68:4930-4937.

**Punj V and Chakrabarty AM.** (2003). Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionary conserved function in mitochondria and prokaryotes. *Cellular Microbiology.* 5(4): 225-231.

**Punj V, Sharma R, Zaborina O, Chakrabarty AM.** (2003). Energy-generating enzymes of *Burkholderia cepacia* and their interactions with macrophages. *J. Bacteriol.* 185(10):3167-3178.

**Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB.** (2003). Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem.* 278: 27828–35.

**Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jäättelä M, Penninger JM, Garrido C and Kroemer G.** (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3: 839-843.

**Ravagnan L, Roumier T and Kroemer G.** (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cellular Phys.* 192: 131-137.

**Rescigno M, Perham RN.** (1994). Structure of the NADPH-binding motif of glutathione reductase: efficiency determined by evolution. *Biochemistry*. 33(19): 5721-7.

**Rich PR.** (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim. Biophys. Acta*. 768(1), 53-79.

**Robinson KM and Lemire BD.** (1996). A requirement for matrix processing peptidase but not for mitochondrial chaperonin in the covalent attachment of FAD to yeast succinate dehydrogenase flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 271: 4061-4067.

**Rodkey, F.L.** (1955). Oxidation-reduction potentials of the diphosphopyridine nucleotide system. *J. Biol. Chem.* 213, 777-786.

**Rodkey, FL y Donovan JA Jr.** (1959). Oxidation-reduction potentials of the triphosphopyridine nucleotide system. *J. Biol. Chem.* 234, 677-680.

**Rossmann MG, Moras D, Olsen KW.** (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*. 250(463):194-9.

**Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer ML, Martinez-Climent JA.** (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 106:3214-22.

**Russell JH y Ley TJ.** (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev. Immunol.* 20:323-70.

**Saijo T and Tanaka K.** (1995). Isoalloxazine ring of FAD is required for the formation of the core in the hsp60-assisted folding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase subunit into the assembly competent conformation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 270: 1899-1907.

**Sakahira H, Enari M, Nagata S.** (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391:96-9.

**Sakurai T y Hosoya H.** (1966). Charge-transfer complexes of nicotinamide-adenine dinucleotide analogues and flavin mononucleotide. *Biochim. Biophys. Acta*. 112:459-468.

**Salvesen GS y Dixit VM.** (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 91(4):443-6.

**Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Ed.). Cold Spring Harbor, NY.

**Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW.** (1997). Structure of Bcl-XL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275(5302):983-6.

**Savoldi M, Malavazi I, Soriani FM, Capellaro JL, Kitamoto K, da Silva Ferreira ME, Goldman MH, Goldman GH.** (2008). Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* 70(1):44-59.

**Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 17: 1675-1687.

**Scaffidi C, Schmitz I, Kramer PH, Peter ME.** (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:1541-8.

**Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, Parcej DN.** (2007). Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> from bovine heart mitochondria. *Biochemistry*. 46(44):12579-85.

**Schägger H.** (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 1555: 154–159.

**Schägger H y Pfeiffer K.** (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19(8): 1777-1783.

**Schägger H y Pfeiffer K.** (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 276 (41): 37861-37867.

**Schimmer AD.** (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 64:7183-90.

**Schuler M and Green DR.** (2001). Mechanism of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29:684-688.

**Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Krammer PH.** (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J. Cell Biol.* 127:15-20.

**Senda M, Kishigami S, Kimura S, Fukuda M, Ishida T y Senda T.** (2007). Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin. *J. Mol. Biol.* 373:382-400.

**Senda T, Yamada T, Sakurai N, Kubota M, Nishizaki T, Masai E, Fukuda M y Mitsui Y.** (2000). Cristal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *J. Mol Biol.* 304:397-410.

**Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y.** (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399(6735):483-7.

**Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV.** (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity.* 6(6):751-63.

**Slee EA, Adrain C, Martin SJ.** (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:7320-6.

**Soberman RJ.** (2003). The expanding network of redox signalling: new observations, complexities, and perspectives. *J. Clinical Investigation.* 111 (5): 571:574.

**Spiess C, Beil A, Ehrmann M.** (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*. 97:339-347.

**Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES.** (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 410:112-116.

**Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V.** (2006). Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ*. 13(12):2140-9.

**Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD.** (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*. 280: 38729–39.

**Stehle T, Claiborne A y Schulz GE.** (1993). NADH binding site and catalysis of NADH peroxidase. *Eur. J. Biochem*. 211, 221-226.

**Stennicke, H.R., J.M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X.H. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, and G.5. Salvesen.** 1998. Pro-caspase-3 is a major physiological target of caspase-8. *J. Biol. Chem*. 273: 27084-27090.

**Stennicke HR, Salvesen GS.** (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ*. 6(11):1054-9.

**Strasser A, O'Connor L, Dixit VM.** (2000). Apoptosis signalling. *Annu. Rev. Biochem*. 69:217-45.

**Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B, Schagger H.** (2004). Assembly of respiratory complexes I, III y IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem*. 279(6):5000-7.

**Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK.** (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and independent pathways. *Oncogene*. 20:2122-33.

**Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW.** (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J. Biol. Chem.* 275:33777-33781.

**Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Constantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost M-C, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC and Kroemer G.** (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192 (4): 571-579.

**Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost M-C, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.** (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192:571-579.

**Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Larochette N, Alzari PM, Kroemer G.** (1999a). Mitochondrial release of caspases-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189:381-394.

**Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G.** (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature.* 397, 441-446.

**Susin, S.A., Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, and G. Kroemer.** 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1331-1342.

**Susin, S.A., N. Zamzami, N. Larochette, B. Dallaporta, I. Marzo, C. Brenner, T. Hirsch, P.X. Petit, M. Geuskents, and G. Kroemer.** 1997. A cytofluorometric assay of nuclear apoptosis induced in a cell-free system. Application to ceramide-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 236: 397-403.

**Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R.** (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell.* 8:613-621.



**Suzuki H, Kumagai T, Goto A y Sugiura T.** (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 542-545.

**Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC.** (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 273:7787-7790.

**Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC.** (1997). BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* 16(16):4887-96.

**Tejero J, Peregrina JR, Martínez-Júlvez M, Gutiérrez A, Gómez-Moreno C, Scrutton NS, Medina M.** (2007). Catalytic mechanism of hydride transfer between NADP<sup>+</sup>/H and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Anabaena* PCC 7119. *Arch Biochem Biophys.* 459(1):79-90.

**Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM.** (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 81(5):801-9.

**Thornberry NA.** (1999). Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 6(11):1023-1027.

**Thornberry NA y Lazebnik Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science.* 281(5381):1312-6.

**Toomey D y Mayhew SG.** (1998). Purification and characterisation of NADH oxidase from *Thermus aquaticus* YT-1 and evidence that it functions in a peroxide-reduction system. *Eur. J. Biochem.* 251:935-945.

**Trapani JA, Smyth MJ.** (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2:735-47.

**Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowel PC, Croce CM.** (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 226(4678):1097-9.

**Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwan JC, Ng PY, Guo K, Dhakshinamoorthy S y Porter A.** (2005). AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J.* 1-12.

**Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénil P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P y Kroemer G.** (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23, 4679-4689.

**Van Gorp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X and Vandenabeele P.** (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304(3): 487-497.

**Van Loo G, Saelens X, Van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ and Vandenabeele.** (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9: 1031-1042.

**Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S.** (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271(49):31075-85.

**Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102:43-53.

**Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL.** (2001). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonise inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* 16:16.

**Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P.** (2001). Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol. Med.* 7:36-48.

**Vonck J y Schäfer E.** (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1793(1):117-24.

- Wajant H.** (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 296:1635-6.
- Wallace D. C.** (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 283:1482–1488.
- Wallace D. C.** (1997). Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* 277:40–47.
- Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP.** (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr. Opin. Immunol.* 10(3):279-88.
- Walter PR, Sikorska M.** (1994). Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 72(11-12):615-23.
- Wang J, Silva JP, Gustaffson CM, Rustin P y Larsson N-G.** (2001). Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(7):4038-4043.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D.** (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 298, 1587-1592.
- Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome *c*. *Genes Dev.* 14(16):2060-71.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292(5517):727-30.
- Widlak P, Li LY, Wang X and Garrard WT.** (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 276(51): 48404-48409.

**Wilkinson JC, Wilkinson AS, Galbán S, Csomos RA, Duckett CS.** (2008). AIF is a target for ubiquitination through interaction with XIAP. *Mol Cell Biol.* 28(1):237-247.

**Wissing S, Ludovico P, Herker E, Buttner S, Engelhardt SM, Decker T, Link A, Proksch A, Rodrigues F, Corte-Real M, Frohlich KU, Manns J, Candé C, Sigris SJ, Kroemer G, Madeo F.** (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166(7):969-74.

**Witby, L.G.** (1953). A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 54, 437-442.

**Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schägger H.** (2006). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(9-10):1066-72.

**Wolf BB y Green DR.** (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274(29):20049-52.

**Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB.** (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br. J. Haematol.* 133, 124-40.

**Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y.** (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature.* 408:1008-1012.

**Wu M, Xu LG, Li X, Zhai Z, Shu HB.** (2002). AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277: 25617-25623.

**Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA.** (2005). Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280(20):19673-81.

**Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Chen ML, Kimbara K et al.** (2002a). Bacterial redox protein azurin, tumor supresor protein p53, ans regresión of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:14098-14103.

**Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Kimbara K, Das Gupta TK, Chakrabarty AM.** (2002b). The bacterial redox protein azurin induces apoptosis in J774 macrophages through complex formation and stabilization of the tumor suppressor protein p53. *Infect Immun.* 70:7054-7062.

**Yang YL, Li XM.** (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res.* 10(3):169-77.

**Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X.** (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science.* 275:1129-1132.

**Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani G, Larochette N, Dauga E, Garrido C, Kroemer G y Wu H.** (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9:680-684.

**Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL.** (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(48):18314-9.

**Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL.** (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 297(5579):259-63.

**Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 75(4):641-52.

**Yuste VJ, Moubarak RS, Delettre C, Bras M, Sancho P, Robert N, d'Alayer J, Susin SA.** (2005). Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death Differ.* 12(11):1445-8.

**Yuste VJ, Sánchez-López I, Solé C, Moubarak RS, Bayascas JR, Dolcet X, Encinas M, Susin SA y Comella JX.** (2005). The contribution of apoptosis inducing factor, caspase-activated DNase and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280(42):35670-83.

**Zaborina O, Misra N, Kostal J, Kamath S, Kapatral V, El-Azami El-Idrissi M, Prabhakar BS and Chakrabarty AM.** (1999). P2Z-independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* 67:5231-5242.

**Zaborina O, Dhiman N, chen ML, Kostal J, Holder IA and Chakrabarty AM.** (2000). Secreted products of a nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain induce two modes of macrophage killing: external-ATP-dependent, P2Z-receptor-mediated necrosis and ATP-independent, caspase-mediated apoptosis. *Microbiology.* 146:2521-2530.

**Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Diez J.** (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 35:1055-1061.

**Zamzami N y Kroemer G.** (2001). Mitochondria in apoptosis. How Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:67-71.

**Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B and Kroemer G.** (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182:367-377.

**Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, and Kroemer G.** (1996). Mitochondrial control on nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 187: 1113-1122.

**Zanetti G, Cidaria D, Curti B.** (1982). Preparation of apoprotein from spinach ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. Studies on the resolution process and characterization of the FAD reconstituted holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 126(3):453-458.

**Zhang W, Li D and Mehta JL.** (2004). Role of AIF in human coronary artery endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 286; H354-358.

**Zhou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang XD.** (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome *c*-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90:405-413.

**Zoccarato F, Cavallini L, Alexandre A.** (2004). Respiration-dependent removal of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brain mitochondria: inhibition by Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 279:4166-4174.

**Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB.** (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 15(12):1481-6.





## 8. *APÉNDICES*



## Abreviaturas y símbolos.

2'-P	Grupo fosfato en la posición 2' de la ribosa de la adenina del NADP <sup>+</sup> /H.
5-dRf	5-deazarriboflavina.
Å	Angstrom (1 <sup>-10</sup> cm).
Abs	Absorbancia.
Adx	Adrenodoxina.
ANT	Del Inglés: Adenin Nucleotide Translocator.
APS	Persulfato amónico.
ASC	Ascorbato.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CAD	Del Inglés: Caspase Activated DNase.
CARD	Del Inglés: Caspase Recruitment Domain.
CD	Dicroísmo circular (Circular Dichroism).
CT <sub>1</sub>	Primer complejo de transferencia de carga
CT <sub>2</sub>	Segundo complejo de transferencia de carga
CTC	Complejo de transferencia de carga.
Da	Dalton.
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro.
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol.
DDM	Dodecil-maltósido.
DED	Del Inglés: Death Efector Domain.
DHA	Dehidroascorbato.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
$E_{ox/rd}$	Potencial de reducción para la reacción entre especie oxidada y reducida.
$E_{ox/sq}$	Potencial de reducción para la reacción entre especie oxidada y semiquinona.
$E_{sq/rd}$	Potencial de reducción para la reacción entre especie semiquinona y reducida.
EDC	N-etil-N-[dimetilaminopropil]carbodiimida.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
ES	Células madre embrionarias.
ET	Transferencia electrónica (Electron Transfer).
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (y otros, y colaboradores).
FAD	Flavín adenín dinucleótido.
FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido en estado completamente reducido.
Fd	Ferredoxina.
FMN	Flavín mononucleótido.
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas.
GSH	Glutation reducido.
GSSH	Glutation oxidado.
H <sup>-</sup>	Ion hidruro.
<i>i. e.</i>	<i>id est</i> (es decir).
IAP	Del Inglés: Inhibitor of Apoptosis Protein.
ICAD	Del Inglés: Inhibitor of Caspase Activated DNase
ICE	Del inglés: Interleukin-1 $\beta$ Converting Enzyme; caspasa 1.
$k_{cat}$	Constante catalítica para procesos en estado estacionario.
$k_{obs}$	Constante observada.
$K_m$	Constante de equilibrio de Michaelis-Menten.
kDa	Kilodalton.
LB	Medio Luria-Bertani (Luria Broth).
MC	Complejo de Michaelis-Menten.
MDHA	Monodehidroascorbato.
MMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial.
NAD <sup>+</sup>	Nicotín-adenín dinucleótido (oxidado).
NADH	Nicotín-adenín dinucleótido (reducido).

NADP <sup>+</sup>	Nicotín-adenín dinucleótido fosfato (oxidado).
NADPH	Nicotín-adenín dinucleótido fosfato (reducido).
NBT	Azul de tetrazolio.
nm	Nanómetros.
ox	Forma oxidada.
p. ej.	Por ejemplo.
PCD	Del Inglés: Programmed Cell Death.
PCMPs	Acido para-cloromercurifenilsulfónico.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).
PDB	Banco de datos de estructuras de proteínas (Protein Data Bank).
pI	Punto isoeléctrico.
PM	Peso molecular.
PMSF	Fluoruro de metil fenil sulfonilo.
PTP	Poros de transición de permeabilidad.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
T	Temperatura
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina.
Tris	(Tris)-hidroximetil amino metano.
U.A.	Unidades arbitrarias.
UQ	Ubiquinona.
v <sub>max</sub>	velocidad máxima de la reacción.
VDAC	Del Inglés: Voltaje Dependent Anion Channel.
WT	Del Inglés: Wild Type; silvestre.
$\Delta$ Abs	Incremento de absorbancia.
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrana.
$\epsilon$	Coefficiente de extinción.
$\lambda$	longitud de onda.

## Denominación de los mutantes.

Los mutantes se nombran del modo “R<sub>1</sub>nR<sub>2</sub>”, donde R<sub>1</sub> es el residuo en la secuencia de la proteína silvestre, n la numeración del residuo en la proteína silvestre, y R<sub>2</sub> es el residuo que reemplaza a R<sub>1</sub> en la forma mutada de la proteína.

## Abreviaturas de los aminoácidos naturales

Nombre	Código de una letra	Código de tres letras
Alanina	A	Ala
Cisteína	C	Cys
Ácido aspártico	D	Asp
Ácido glutámico	E	Glu
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Lisina	K	Lys
Leucina	L	Leu
Metionina	M	Met
Asparagina	N	Asn
Prolina	P	Pro
Glutamina	Q	Gln
Arginina	R	Arg
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Valina	V	Val
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr

## Código genético

UUU **F** UCU **S** UAU **Y** UGU **C**  
 UUC **F** UCC **S** UAC **Y** UGC **C**  
 UUA **L** UCA **S** UAA **\*** UGA **\***  
 UUG **L** UCG **S** UAG **\*** UGG **W**

CUU **L** CCU **P** CAU **H** CGU **R**  
 CUC **L** CCC **P** CAC **H** CGC **R**  
 CUA **L** CCA **P** CAA **Q** CGA **R**  
 CUG **L** CCG **P** CAG **Q** CGG **R**

AUU **I** ACU **T** AAU **N** AGU **S**  
 AUC **I** ACC **T** AAC **N** AGC **S**  
 AUA **I** ACA **T** AAA **K** AGA **R**  
 AUG **M** ACG **T** AAG **K** AGG **R**

GUU **V** GCU **A** GAU **D** GGU **G**  
 GUC **V** GCC **A** GAC **D** GGC **G**  
 GUA **V** GCA **A** GAA **E** GGA **G**  
 GUG **V** GCG **A** GAG **E** GGG **G**

- Codon de terminación

## Secuencia aminoacídica de mAIF (codigo UniProtKB/Swiss-Prot Q9Z0X1)

**Sinónimos: AIF, PDCD8. Mus musculus.**

```
      10          20          30          40          50          60
MFRCGGLAGA FKQKLVPLVR TVYVQRPKQR NRLPGNLFQQ WRVPLELQMA RQMASSGSSG

      70          80          90         100         110         120
GKMDNSVLVL IVGLSTIGAG AYAYKTIKED QKRYNERVMG LGLSPEEKQR RAIASATEGG

      130         140         150         160         170         180
SVPQIRAPSH VPFLLIGGGT AAFAAARSIR ARDPGARVLI VSEDPELPYM RPPLSKELWF

      190         200         210         220         230         240
SDDPNVTKTL QFRQWNGKER SIYFQPPSFY VSAQDLPNIE NGGVAVLTGK KVVHLDVRGN

      250         260         270         280         290         300
MVKLNDGSQI TFEKCLIATG GTPRSLAID RAGAEVKSRT TLFRKIGDFR ALEKISREVK

      310         320         330         340         350         360
SITVIGGGFL GSELACALGR KSQASGIEVI QLFPEKGNMG KILPQYLSNW TMEKVKREGV

      370         380         390         400         410         420
KVMPNAIVQS VGVSGGRLLI KLKDGRKJET DHIVTAVGLE PNVELAKTGG LEIDSDFGGF

      430         440         450         460         470         480
RVNAELQARS NIWVAGDAAC FYDIKLGRRR VEHHDHAVVS GRLAGENMTG AAKPYWHQSM

      490         500         510         520         530         540
FWSDLGPDVG YEAIGLVDSS LPTVGVFAKA TAQDNPKSAT EQSGTGIRSE SETESEASEI

      550         560         570         580         590         600
TIPPSAPAVP QVPVEGEDYG KGVIFYLRDK VVVGIVLWNV FNRMPIARKI IKDGEQHEDL

      610
NEVAKLFNIH ED
```

**Secuencia aminoacídica de hAIF (AIFM1) (codigo UniProtKB/Swiss-Prot O95831-1). Sinónimos: AIF, PDCD8. Homo sapiens.**

Se han encontrado tres isoformas producidas por splicing alternativo. AIFM1 es la secuencia canónica y es la que se muestra a continuación. AIFM2 (O95831-2) y AIFM3 (O95831-3) son las otras isoformas descritas.

10	20	30	40	50	60
MFRCGGLAAG	ALKQKLVLPLV	RTVCVRSPRQ	RNRLPGNLFQ	RWHVPLELQM	TRQMASSGAS
70	80	90	100	110	120
GGKIDNSVLV	LIVGLSTVGA	GAYAYKTMKE	DEKRYNERIS	GLGLTPEQKQ	KKAALSASEG
130	140	150	160	170	180
EEVPQDKAPS	HVPFLLIGGG	TAAFAAARSI	RARDPGARVL	IVSEDEPELY	MRPPLSKELW
190	200	210	220	230	240
FSDDPNVTKT	LRFKQWNGKE	RSIYFQPPSF	YVSAQDLPHI	ENGGVAVLTG	KKVVQLDVRD
250	260	270	280	290	300
NMVKLNDGSQ	ITYEKCLIAT	GGTPRSLSAI	DRAGAEVKSR	TTLFRKIGDF	RSLEKISREV
310	320	330	340	350	360
KSITIIIGGGF	LGSELACALG	RKARALGTEV	IQLFPEKGNM	GKILPEYLSN	WTMEKVRREG
370	380	390	400	410	420
VKVMNPNAIVQ	SVGVSSGKLL	IKLKDGRKVE	TDHIVA AVGL	EPNVELAKTG	GLEIDSDFGG
430	440	450	460	470	480
FRVNAELQAR	SNIWVAGDAA	CFYDIKLGRR	RVEHHDHAVV	SGRLAGENMT	GAAPYWHQS
490	500	510	520	530	540
MFWSDLGPDV	GYEAIGLVDS	SLPTVGVFAK	ATAQDNPKSA	TEQSGTGIRS	ESETESEASE
550	560	570	580	590	600
ITIPPSTPAV	PQAPVQGEDY	GKGVIFYLRD	KVVVGIVLWN	IFNRMPIARK	I IKDGEQHED
610					
LNEVAKLFNI	HED				

## Secuencia genómica de hAIF (codigo NCBI: AF100928)

```

1 agaggaaagg gaaggaggag gtcccgaata gcggtcgccg aaatgttccg gtgtggaggc
61 ctggcgccgg gtgctttgaa gcagaagctg gtgcccttgg tgcggaccgt gtgctgccga
121 agcccgaggc agaggaaccg gctcccaggc aacttggtcc agcgaaggca tgttcctcta
181 gaactccaga tgacaagaca aatggctagc tctgggtgcat cagggggcaa aatcgataat
241 tctgtgtagc tccttattgt gggcttatca acagtaggag ctgggtgccta tgcctacaag
301 actatgaaaag aggacgaaaa aagatacaat gaaagaattt caggggttagg gctgacacca
361 gaacagaaaac agaaaaaggc cgcgttatct gcttcagaag gagaggaagt tcctcaagac
421 aaggcgccaa gtcatgttcc tttcctgcta attggtggag gcacagctgc ttttgctgca
481 gccagatcca tccgggctcg ggatcctggg gccaggggtac tgattgtatc tgaagatcct
541 gagctgccgt acatgcgacc tcctctttca aaagaactgt ggttttcaga tgacccaaat
601 gtcacaaaga cactgcgatt caaacagtgg aatggaaaag agagaagcat atatttccag
661 ccaccttctt tctatgtctc tgctcaggac ctgcctcata ttgagaatgg tgggtgtggc
721 gatggctctc ggaagaaggc agtacagctg gatgtgagag acaacatggt gaaacttaat
781 ctgggctctc aaataaccta tgaaaagtgc ttgattgcaa caggaggtac tccaagaagt
841 ctgtctgcca ttgatagggc tggagcagag gtgaagagta gaacaacgct tttcagaaag
901 attggagact ttgagaagct ggagaagatt tcacgggaag tcaaatcaat tacgattatc
961 ggtgggggct tccttggtag cgaactggcc tgtgctcttg gcagaaaggc tcgagccttg
1021 ggacacagaag tgattcaact cttccccgag aaaggaaata tgggaaagat cctccccgaa
1081 tacctcagca actggaccat ggaaaaagtc agacgagagg gggttaaggc gatgcccaat
1141 gctattgtgc aatccgttgg agtcagcagt ggcaagttac ttatcaagct gaaagacggc
1201 aggaaggtag aactgacca catagtggca gctgtgggcc tggagcccaa tgttgagttg
1261 gccaagactg gtggcctgga aatagactca gattttgggt gcttccgggt aatgcagag
1321 ctacaagcac gctctaacat ctgggtggca ggagatgctg catgcttcta cgatataaag
1381 ttgggaagga ggcgggtaga gcacatgat cacgctggtg tgagtggaag attggctgga
1441 gaaaatatga ctggagctgc taagccgtac tggcatcagt caatgttctg gagtgatttg
1501 ggccccgatg ttggctatga agctattggt cttgtggaca gtagtttgcc cacagttggt
1561 gtttttgcaa aagcaactgc acaagacaac cccaaatctg ccacagagca gtcaggaact
1621 ggtatccgat cagagagtga gacagagtcc gaggcctcag aaattactat tcctcccagc
1681 acccggcag ttccacaggc tcccgtccag ggggaggact acggcaaagg tgtcatcttc
1741 tacctcaggg acaaagtggc cgtggggatt gtgctatgga acatctttaa ccgaatgcca
1801 atagcaagga agatcattaa ggacggtgag cagcatgaag atctcaatga agtagccaaa
1861 ctattcaaca ttcatgaaga ctgaagcccc acagtggaat tggcaa

```

## Secuencia genómica de hAIF con sitios de restricción

```

EcoO109I          SseBI
PpuMI             BstMCI           Eco147I
BseRI            BsaOI           BsaWI           StuI
agaggaaaggaaggaggaggtcccgaatagcgggtcgccgaaatggttccgggtgtggaggcctggcggggggtgct
base pairs
tctcctttcccttccctcctccagggttatcgccagcggctttacaaggccacacctccggaccgccgccacga 1
to 75
Psp5II           Bsh1285I        AatI
DraII           BsiEI           Pme55I

Eco64I          BcoI
BanI  BssT1I  CpoI          Ama87I          Cfr10I
AlwNI  EcoT14I  RsrII        AvaI            BssAI
ttgaagcagaagctgggtgcccttgggtgcgaccgtgtgctccgaagcccagggcagaggaaccggctcccaggc
base pairs

```



aacttcgtcttcgaccacgggaaccacgcctggcacacgcaggttcgggctccgtctccttggccgaggggtccg 76  
to 150

BshNI ErhI CspI Eco88I BsrFI  
AccB1I Eco130I BsoBI Bse118I  
StyI

NspI XbaI BpmI PstNHI  
aacttggtccagcgatggcatgttcctctagaactccagatgacaagacaaatggctagctctgggtgcatcaggg  
base pairs  
ttgaacaaggtcgctaccgtacaaggagatcttgaggtctactgttctgtttaccgatcgagaccacgtagtccc  
151 to 225

GsuI NheI

Bsa29I  
BscI BspXI AccB1I  
BseCI Bsu15I BshNI  
ggcaaaatcgataattctgtgtagtccttattgtgggcttatcaacagtaggagctgggtgcctatgcctacaag  
base pairs  
ccgtttttagctattaagacacaatcaggaataacacccgaatagttgtcatcctcgaccacggatacggatgttc  
226 to 300

ClaI Bsp106I BanI  
BspDI Eco64I  
BanIII

ApoI  
actatgaaagaggacgaaaaagatacaatgaaagaatttcagggtagggctgacaccagaaacagaaacagaaa  
base pairs  
tgatactttctcctgcttttttctatgttactttcttaaagtcccaatcccgaactgtggcttctgtctttgtcttt  
301 to 375

AcsI

Eco64I Hsp92I  
BanI NarI EheI  
KasI Msp17I BbeI  
Eco57I  
aaggccgcgttatctgcttcagaaggagaggaagttcctcaagacaaggcgccaagtcagtctcctttcctgcta  
base pairs  
ttccggcgcaatagacgaagtcttcctctccttcaaggagttctgttccgcggttcagtaacagaaaggacgat  
376 to 450

BshNI Hin1I Bsp143II  
AccB1I BbiII BstH2I  
AcyI BsaHI HaeII

BstX2I BcoI FriOI BstX2I  
MspA1I PstI Ama87I BstI  
PvuII SfcI XhoII AvaI BanII MflI  
attggtggaggcacagctgcttttctgagcagatccatccgggctcggatcctggggccaggggtactgatt  
base pairs  
taaccacctccgtgtcgacgaaaacgacgtcgggtctaggtaggcccagacctaggaccccgggtcccatgactaa  
451 to 525

NspBII BstSFI BstYI Eco88I XhoII  
MflI BsoBI BamHI  
Eco24I BstYI

Eco57I  
MflI

XhoII NspI BseRI DrdI  
gtatctgaagatcctgagctgccgtacatgacgacctcctctttcaaaagaactgtggtttcagatgacccaaat  
base pairs  
catagacttctaggactcgacggcatgtacgctggaggagaaaagttttcttgacacccaaaagtctactgggttta  
526 to 600  
BstYI  
BstX2I

gtcaciaaagacactgcgattcaaacagtggaatggaaaagagagaagcatatatttcagccaccttctttctat  
base pairs  
cagtgtttctgtgacgctaagtttgtcaccttaccttttctctcttcgtatataaaggctcgggtggaagaagata  
601 to 675

AlwNI  
DraII MspA1I  
Psp5II BspMI PvuII  
gtctctgctcaggacctgcctcatattgagaatgggtggtgtggctgtcctcactgggaagaaggtagtacagctg  
base pairs  
cagagacgagtcctggacggagtataactcttaccaccacaccgacaggagtgaccttcttccatcatgtcgac  
676 to 750  
PpuMI NspBII  
EcoO109I

gatgtgagagacaacatggtgaaacttaatgatggctctcaaataacctatgaaaagtgcttgattgcaacagga  
base pairs  
ctacactctctgttgtaccactttgaattactaccgagagtttattggatacttttcacgaactaacgttgcct  
751 to 825

EarI  
BpmI Eam1104I  
ggtactccaagaagtctgtctgccattgatagggtggagcagaggtgaagagtagaacaacgcttttcagaaag  
base pairs  
ccatgaggttcttcagacagacggtaactatcccgacctcgtctccacttctcatcttgttgcgaaaagtctttc  
826 to 900  
GsuI Ksp632I

Eco13  
StyI  
HindIII  
EcoT14I  
attggagacttttagaagcttgagaagatttcacgggaagtc aaatcaattacgattatcggtgggggcttcctt  
base pairs  
taacctctgaaatcttcgaaacctcttctaaagtgccttcagtttagttaatgctaatagccacccccgaaggaa  
901 to 975  
BssT1I  
ErhI

OI  
Alw21I Ama87I BssT1I Eco88I  
Eco88I EcoT14I XmnI EarI  
BsoBI  
AspHI AvaI BsoBI MslI Eam1104I  
ggtagcgaactggcctgtgctcttggcagaaaggctcgagccttgggcacagaagtgattcaactcttccccgag  
base pairs  
ccatcgcttgaccggacacgagaaccgtctttccgagctcggaaaccgtgtcttcactaagttgagaaggggctc  
976 to 1050  
BsiHKAI XhoI BcoI Eco130I Asp700I Ksp632I  
Bbv12I Sfr274I ErhI AvaI  
PaeR7I StyI Ama87I

NcoI Bsp19I  
StyI BstDSI  
AlwNI EcoT14I  
MflI  
XhoII  
aaaggaaatattgggaaagatcctccccgaatacctcagcaactggaccatggaaaaagtacagacgagagggggtt  
base pairs  
tttcctttataccctttctaggaggggcttatggagtcgttgacctggtacctttttcagctgctctccccaa  
1051 to 1125  
BstYI BssT1I  
BcoI BstX2I ErhI Eco130I  
DsaI

aaagtgatgcccgaatgctattgtgcaatccgttggagtcagcagtggaagttacttatcaagctgaaagacggc  
base pairs  
ttccactacgggttacgataaacacggttaggcaacctcagtcgacacggttcaatgaatagttcgactttctgccg  
1126 to 1200

PflMI FriOI MscI  
DraIII NspBII Eco24I MluNI  
AccB7I PvuII BpmI XcmI EaeI  
aggaaggtagaaactgaccacatagtgagcagctgtggcctggagcccaatggtgagttggccaagactggtggc  
base pairs  
tccttccatctttgactggtgtatcacctcgacacccggacctcgggttacaactcaaccggttctgaccaccg  
1201 to 1275  
Esp1396I GsuI CfrI  
Van91I MspA1I BanII BalI

MslI  
ctggaaatagactcagatcttgggtggcttccgggtaaattgcagagctacaagcacgctctaactctgggtggca  
base pairs  
gacctttatctgagctctaaaaccaccgaaggccatttacgtctcgatggtcgtgagattgtagaccaccgt  
1276 to 1350

Ksp22I  
SphI Alw21I  
BbuI AspHI BclI  
ggagatgctgcatgcttctacgatataaagttgggaaggaggcgggttagagcaccatgatcacgctggtgtgagt  
base pairs  
cctctacgacgtacgaagatgctatatttcaacccttccctccgccatctcgtggtactagtgcgacaactca

1351 to 1425  
PaeI  
NspI  
BsiHKAI  
Bbv12I  
FbaI

BlpI  
CelII  
BpmI BpmI BglI BpmI  
ggaagattggctggagaaaatgatgactggagctgctaagccgtactggcatcagtcagtcaatgttctggagtgattg  
base pairs  
ccttctaaccgacctcttttatactgacctcgacgattcggcatgaccgtagtcagttacaagacctcactaac  
1426 to 1500  
GsuI GsuI GsuI  
Bsp1720I  
Bpu1102I

Eco24I  
DraII FriOI  
PspOMI BanII  
ggccccgatggttgctatgaagctattggtcttggtggacagtagttggccacagttggtgtttttgcaaaagca  
base pairs  
ccggggctacaaccgatacttcgataaccagaacacctgtcatcaaacgggtgtcaaccacaaaaacgttttcgt  
1501 to 1575  
Bsp120I  
EcoO109I  
ApaI

BsgI AlwNI AspI  
AtsI  
actgcacaagacaaccccaaactctgccacagagcagtcaggaactggtatccgatcagagagtgagacagagtc  
base pairs  
tgacgtgttctggtggggttagacgggtgtctcgtcagtccttgacataggttagtctctcactctgtctcagg  
1576 to 1650  
Tth111I

SseBI  
Eco147I  
StuI  
gaggcctcagaaattactattcctcccagcaccocggcagttccacaggctcccgtccagggggaggactacggc  
base pairs  
ctccggagtctttaatgataaaggagggtcgtggggccgtcaagggtgtccgagggcaggtcccctcctgatgccg  
1651 to 1725  
AatI  
Pme55I

CvnI  
AocI BsaMI  
Bsu36I DrdI  
Mva1269I  
aaaggtgtcatcttctacctcagggacaaagtggctcgtggggattgtgctatggaacatctttaaccgaatgcca  
base pairs  
tttcacagtagaagatggagtcacctgtttcaccagcaccctaacacgataccttgtagaaattggcttacggt  
1726 to 1800  
Eco81I BsmI  
Bse21I

BstX2I  
BstYI  
XhoII RcaI  
atagcaaggaagatcattaaggacggtgagcagcatgaagatctcaatgaagtagccaaactattcaacattcat

base pairs

tatcgttccttctagtaattcctgccactcgtcgtacttctagagttacttcatcggtttgataagttgtaagta  
1801 to 1875

BglIII  
MflI

BspHI

Bbv16II  
BbsI Eco57I XcmI  
gaagactgaagccccacagtggaattggcaa base pairs  
cttctgacttcgggggtgtcaccttaaccgtt 1876 to 1906  
BpiI  
BpuAI

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AatI	2	59 1654	agg/cct
AccB1I	3	90 283 423	g/gyrcc
B7I	1	1224	ccannnn/ntgg
AcsI	1	335	r/aatty
AcyI	1	424	gr/cgyc
Alw21I	2	996 1403	gwgw/c
AlwNI	4	87 690 1091 1618	cagnnn/ctg
Ama87I	4	123 497 1010 1045	c/ycgrg
AocI	1	1744	cc/tnagg
ApaI	1	1504	ggcc/c
ApoI	1	335	r/aatty
Asp700I	1	1031	gaann/nnttc
AspHI	2	996 1403	gwgw/c
AspI	1	1644	gacn/nngtc
AtsI	1	1644	gacn/nngtc
AvaI	4	123 497 1010 1045	c/ycgrg
BalI	1	1261	tgg/cca
<b>BamHI</b>	<b>1</b>	<b>501</b>	<b>g/gatcc</b>
BanI	3	90 283 423	g/gyrcc
BanII	3	498 1247 1504	grgcy/c
BanIII	1	233	at/cgat
BbeI	1	427	ggcgc/c
BbiII	1	424	gr/cgyc
BbsI	1	1881	gaagac
BbuI	1	1364	gcatg/c
Bbv12I	2	996 1403	gwgw/c
Bbv16II	1	1881	gaagac
BclI	1	1407	t/gatca
BcoI	4	123 497 1010 1045	c/ycgrg
BglI	1	1470	gccnnnn/nggc
BglII	1	1839	a/gatct
BlpI	1	1460	gc/tnagc
BpiI	1	1881	gaagac
BpmI	6	189 865 1245 1441 1456 1493	ctggag
Bpu1102I	1	1460	gc/tnagc
BpuAI	1	1881	gaagac
Bsa29I	1	233	at/cgat
BsaHI	1	424	gr/cgyc
BsaMI	1	1798	gaatgc
BsaOI	1	35	cgry/cg
BsaWI	1	47	w/ccggw

BscI	1	233	at/cgat
Bse118I	1	137	r/ccggy
Bse21I	1	1744	cc/tnagg
BseCI	1	233	at/cgat
BseRI	2	20 565	gaggag
BsgI	1	1582	gtgcag
Bsh1285I	1	35	cgry/cg
BshNI	3	90 283 423	g/gyrcc
BsiEI	1	35	cgry/cg
BsiHKAI	2	996 1403	gwgw/c
BsmI	1	1798	gaatgc
BsoBI	4	123 497 1010 1045	c/ycgrg
Bsp106I	1	233	at/cgat
Bsp120I	1	1500	g/ggcc
Bsp143II	1	427	rgcg/y
Bsp1720I	1	1460	gc/tnagc
Bsp19I	1	1097	c/catgg
BspDI	1	233	at/cgat
BspHI	1	1872	t/catga
BspMI	1	694	acctgc
BspXI	1	233	at/cgat
BsrFI	1	137	r/ccggy
BssAI	1	137	r/ccggy
BssT1I	4	95 972 1016 1097	c/cwggg
BstDSI	1	1097	c/crygg
BstH2I	1	427	rgcg/y
BstI	1	501	g/gatcc
BstMCI	1	35	cgry/cg
BstSFI	1	476	c/tryag
BstX2I	5	484 501 534 1067 1839	r/gatcy
BstYI	5	484 501 534 1067 1839	r/gatcy
Bsu15I	1	233	at/cgat
Bsu36I	1	1744	cc/
CelII	1	1460	gc/tnagc
Cfr10I	1	137	r/ccggy
CfrI	1	1259	y/ggcsr
ClaI	1	233	at/cgat
CpoI	1	104	cg/gwccg
CspI	1	104	cg/gwccg
CvnI	1	1744	cc/tnagg
DraII	3	20 687 1501	rg/gnccy
DraIII	1	1224	cacnnn/gtg
DrdI	2	598 1756	gacnnnn/nngtc
DsaI	1	1097	c/crygg
EaeI	1	1259	y/ggcsr
Eam1104I	2	878 1044	ctcttc
EarI	2	878 1044	ctcttc
Eco130I	4	95 972 1016 1097	c/cwggg
Eco147I	2	59 1654	agg/cct
Eco24I	3	498 1247 1504	grgcy/c
Eco57I	3	397 535 1886	ctgaag
Eco64I	3	90 283 423	g/gyrcc
Eco81I	1	1744	cc/tnagg
Eco88I	4	123 497 1010 1045	c/ycgrg
EcoO109I	3	20 687 1501	rg/gnccy
EcoT14I	4	95 972 1016 1097	c/cwggg
EheI	1	425	ggc/gcc
ErhI	4	95 972 1016 1097	c/cwggg
Esp1396I	1	1224	ccannnn/ntgg
FbaI	1	1407	t/gatca
FriOI	3	498 1247 1504	grgcy/c
GsuI	6	189 865 1245 1441 1456 1493	ctggag
HaeII	1	427	rgcg/y
HinII	1	424	gr/cgyc

HindIII	1	915	a/agctt
Hsp92I	1	424	gr/cgyc
KasI	1	423	g/gcgcc
Ksp22I	1	1407	t/gatca
Ksp632I	2	878 1044	ctcttc
MflI	5	484 501 534 1067 1839	r/gatcy
MluNI	1	1261	tgg/cca
MscI	1	1261	tgg/cca
MslI	2	1027 1342	caynn/nrntg
Msp17I	1	424	gr/cgyc
MspA1I	3	466 747 1231	cmg/ckg
Mva1269I	1	1798	gaatgc
NarI	1	424	gg/cgcc
NcoI	1	1097	c/catgg
NheI	1	205	g/ctagc
NspBII	3	466 747 1231	cmg/ckg
NspI	3	172 555 1364	rcatg/y
PaeI	1	1364	gcatg/c
PaeR7I	1	1010	c/tcgag
PflMI	1	1224	ccannnn/ntgg
Pme55I	2	59 1654	agg/cct
PpuMI	2	20 687	rg/gwccy
Psp5II	2	20 687	rg/gwccy
PspOMI	1	1500	g/ggccc
PstI	1	480	ctgca/g
PstNHI	1	205	g/ctagc
PvuII	3	466 747 1231	cag/ctg
RcaI	1	1872	t/catga
RsrII	1	104	cg/gwccg
SfcI	1	476	c/tryag
Sfr274I	1	1010	c/tcgag
SphI	1	1364	gcatg/c
SseBI	2	59 1654	agg/cct
StuI	2	59 1654	agg/cct
StyI	4	95 972 1016 1097	c/cwggg
Tth111I	1	1644	gacn/nngtc
Van91I	1	1224	ccannnn/ntgg
XbaI	1	177	t/ctaga
XcmI	2	1254 1896	ccannnnn/nnntgg
XhoI	1	1010	c/tcgag
XhoII	5	484 501 534 1067 1839	r/gatcy
XmnI	1	1031	gaann/nnttc

Las siguientes endonucleasas no cortan la secuencia de AIF:

AatII, Acc113I, Acc16I, Acc65I, AccBSI, AccI, AccIII, AclNI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, Alw44I, Aor51HI, ApaLI, AscI, AseI, AsnI, Asp718I, AspEI, AviIII, AvrII, BbrPI, BcgI, BfrI, BlnI, Bpu14I, BsaAI, BsaBI, BsaI, Bse8I, BseAI, BsePI, Bsh1365I, BsiI, BsiMI, BsiWI, BsmBI, Bsp119I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp68I, BspCI, BspEI, BspLU11I, BspTI, BsrBI, BsrBRI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BssSI, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstEII, BstPI, BstSNI, BstXI, BstZI, CciNI, Cfr42I, Cfr9I, Csp45I, DraI, EagI, Eam1105I, Ecl136II, EclHKI, EclXI, Eco105I, Eco255I, Eco31I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco72I, Eco91I, EcoICRI, EcoNI, EcoO65I, EcoRI, EcoRV, EcoT22I, Esp3I, FauNDI, FseI, FspI, HincII, HindII, HpaI, Kpn2I, KpnI, KspI, LspI, MamI, MfeI, MluI, Mph1103I, MroI, MroNI, MspCI, MunI, NaeI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NotI, NruI, NsiI, NspV, PacI, Pfl23II, PinAI, Ple19I, PmaCI, PmeI, PmlI, Ppu10I, PshAI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PvuI, SacI, SacII, SalI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfiI, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmiI, SnaBI, SpeI, SplI, SrfI, Sse8387I, SspBI, SspI, SstI, SstII, SunI, SwaI, Vha464I, VneI, VspI, XmaI, XmaIII, Zsp2I