

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Ciencias Biológicas**



**Estudio de Proteínas Solubles que Unen  
Lípidos (SLBP) intracelulares expresadas  
en sistemas que metabolizan grandes  
cantidades de lípidos.**

Caracterización biofísicoquímica, estructural y funcional de  
IFABP y LFABP de enterocito de mamífero e YLSCP2 de  
*Yarrowia lipolytica*

**Bioqco. Lisandro Jorge Falomir Lockhart**

Director: Dr. Betina Córscico

Trabajo de Tesis presentado para optar por el título de Doctor de  
la Facultad de Ciencias Exactas

**2009**



*A todos los que me acompañan y de los cuales no recibo otra  
cosa que un voto de confianza y apoyo incondicional.*



**El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado principalmente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad nacional de La Plata (UNLP)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONCIET), bajo la dirección de la Dra Betina Córscico.**

**Durante la realización de la misma se recibió apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Fundación Antorchas (Argentina), del FIRCA Program de los National Institutes of Health (NIH, USA) y de la Rutgers, the State University of New Jersey (RU, USA).**

**Parte de los resultados aquí presentados fueron publicados en el *Journal of Biological Chemistry* y el *Biophysical Journal*.**



## **Agradecimientos:**

- A Betina, por la dirección de mi tesis y guiarme en mi formación como investigador desde mis primeros pasos por la universidad, por no bajar los brazos nunca y despertar en los que te rodean esa necesidad, pasión y compromiso por el trabajo del laboratorio y la labor científica al tiempo que se disfruta de lo que a uno le gusta hacer, por dejarme dispersarme en infinidad de objetivos, aprender técnicas nuevas y traerme siempre de vuelta a tierra y a la realidad del laboratorio, por generar un ambiente de discusión y razonamiento donde todos tienen voz y voto, por su confianza y comprensión, por apostar en mi.**
- A mis compañeros del laboratorio: Gisela, Lisandro, Eduardo, Ximena, Marina, Florencia, Luciana, Natalia y Jorge, por su compañía y apoyo tanto dentro como fuera de las horas de trabajo, por hacer del laboratorio un segundo hogar, por aguantarme.**
- A Ariel, Natalia, Matías y Carolina, por su tiempo, dedicación y paciencia, por trasmitirme sus experiencias y conocimientos, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por su generosidad desinteresada.**
- A Judy, Bill, Zhi, Su-Hyoun, Yin Xiu y Sarala, por su recibimiento y apoyo, por hacerme sentir como en casa.**
- A todos los miembros de los laboratorios de los Dra Ermácora, Delfino y Rossi, por su asistencia y apoyo técnico, por abrirme sus puertas.**
- A Mabel, Picky, Cacho, Rubén, Dr Brenner, Horacio, Margarita, Patricia, Annie, Ricardo y sus becarios y técnicos, por su apoyo y camaradería durante tantos años en el INIBIOLP.**
- A mis amigos (por suerte son demasiados para ser nombrados todos), por su compañía y apoyo incondicional, por los momentos compartidos, por mantenerme cuerdo y no dejar que me encierre en el laboratorio todo el fin de semana.**
- A mis padres y hermanos, tíos, abuelos, primos y a Atlas. El 99% del trabajo detrás de este texto es mérito de ellos. Por su apoyo incondicional, por despertar mi interés y fomentar mis sueños, por estar cuando se los necesita, por enseñarme los frutos de la dedicación en la vida, dentro y fuera del trabajo. Por ser como son.**



## Resumen

Los lípidos son compuestos que cumplen una gran variedad de funciones en la biología celular, desde componentes estructurales o nutrientes de reserva hasta señales hormonales o incluso feromonas pasando por moduladores de la transcripción y pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, por definición, estos compuestos poseen una muy baja solubilidad en el medio acuoso celular. Por tal motivo, se cree que han evolucionado diferentes familias de proteínas solubles, capaces de unir lípidos en forma reversible en el citosol, las SLBP (*Soluble Lipid Binding Proteins*) intracelulares. Dentro de este conjunto de proteínas, las familias mejor caracterizadas corresponden a las proteínas que unen ácidos grasos (FABP) y las proteínas transportadoras de esteroides (SCP-2), ambas con capacidad de unir ácidos grasos de cadena larga.

Cada familia de proteínas SLBP posee varias isoformas que presentan un patrón de expresión y especificidad de unión de ligando hidrofóbicos únicos. Se cree que estas diferencias residen en una baja identidad de secuencia (tan sólo un 20%), a pesar de la cual adoptan estructuras tridimensionales prácticamente superponibles. A fin de contribuir en la identificación determinantes estructurales críticos y las funciones específicas de las SLBP se estudiaron tres proteínas modelo que participan de tipos celulares que muestran una capacidad de metabolismo lipídico extraordinario, como son las células de enterocito intestinal de mamífero y las levaduras *Yarrowia lipolytica*.

En el primer caso se coexpresan dos FABP en niveles prácticamente equivalentes. Por un lado se analizó *in vitro* el rol de residuos de Lys específicos de la IFABP en la transferencia de ácidos grasos, siendo estos importantes para el sentido de las características de las membranas aceptoras. Ensayos de interacción con membrana revelaron que tanto IFABP como LFABP muestran moduladores distintos de su interacción con bicapas fosfolipídicas, y que en particular las regiones  $\alpha$ -helicoidal serían críticas para este fenómeno. Asimismo, se demostró la transferencia *in vitro* de ligandos

entre ambas FABP intestinales. Finalmente, se comprobó que la expresión de LFABP en células Caco-2 en cultivo afecta la asimilación de ácidos grasos, así como su distribución a tiempos cortos. El análisis comparativo de estas proteínas parece indicar que cumplirían funciones diferentes dentro del entorno celular.

En el caso de *Y. lipolytica*, sólo una SLBP es expresada con capacidad de unir ácidos grasos libres, representante de la familia de las SCP-2, YLSCP2. El análisis *in vitro* de sus capacidades de unión y de transferencia de ligandos hacia membranas aceptoras en distintas condiciones demostró que la YLSCP2 podría cumplir un rol de transporte de ligando hidrofóbicos hacia estructuras intracelulares específicas.

En conclusión, estas proteínas no sólo son capaces de actuar como buffer citosólico de lípidos aumentando así su disponibilidad para los distintos procesos celulares, sino que también son capaces de modular o regular su metabolismo. Más estudios son necesarios para poder comprender mejor las funciones específicas de estas SLBP, pero los secretos que esconden sus estructuras podrían tener importantes aplicaciones en áreas diversas como medicina, nutrición, industria biotecnológica y el tratamiento de efluentes industriales.

## Abstract

Lipids are compounds with a wide range of functions within cell biology, from structural components or storage nutrients to hormonal signals or even pheromones, including transcription modulators and photosynthetic pigments. However, by definition, these compounds have very low solubility in the cellular aqueous media. Therefore, it is believed that different families of intracellular soluble lipid binding proteins (SLBP), that can reversible bind them in the citosol, have evolved. Among this group of proteins, the fatty acid binding proteins (FABP) and the sterol carrier protein type 2 (SCP-2), both able to bind long chain fatty acids, are the better characterized families.

Each family of SLBP has several isoforms that present unique expression patterns and hydrophobic ligand specificity. It is believed that these differences reside in the low sequence identity (as low as 20%). Nevertheless, they adopt almost superposable three-dimensional structures. With the objective of contributing to identify critical structural determinants and the specific functions of the SLBP, we studied three model proteins expressed in cell types that show an extraordinary lipid metabolism, like mammal intestinal enterocytes and the yeast *Yarrowia lipolytica*.

In the first case, two FABP are coexpressed in nearly equivalent levels. First we analyzed *in vitro* the role of Lys specific residues of IFABP in the collisional transfer of fatty acids, which resulted to be very important for sensing the acceptor membrane characteristics. Protein-membrane interaction assays revealed that both IFABP and LFABP show different modulators of their interaction with phospholipid bilayers, and that the  $\alpha$ -helical regions would be critical for this phenomenon. Furthermore, we demonstrated *in vitro* transfer of ligands between both intestinal FABP. Finally, we proved that the expression of LFABP in Caco-2 cells *in cultivo* affects the assimilation of fatty acids, as well of its distribution at short times. The comparative analysis of these proteins seems to indicate that they would have different functions within the cell.

In the case of *Y. lipolytica*, only one SLBP able to bind free fatty acids is expressed, a member of the SCP-2 family, YLSCP2. The *in vitro* analysis of its

ligand binding and transfer to membranes capacities under different conditions showed that YLSCP2 could play a role in transport of hydrophobic ligands to specific intracellular structures.

In conclusion, these proteins are not only able to act as cytosolic buffers of lipid concentration, increasing its accessibility for the different cellular processes, but are also able to modulate and regulate their metabolism. More studies are necessary to have a better understanding of the specific functions of the SLBP, but the secrets hidden in their structures could have important applications in diverse areas like medicine, nutrition, biotechnology industry and industrial effluent treatment.

## Lista de Abreviaturas

- <sup>125</sup>I-TID-PC:** 1-O-hexadecanoyl-2-O- [9- [[[2- [<sup>125</sup>I] iodo-4- (trifluoromethyl- (3H) - diazirin-3-yl) benzyl] oxy] carbonyl] nonanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine
- 2-MG:** 2-sn-Monoacilglicerol (2-sn-Monoacylglycerol)
- ACA:** Acil-CoA (Acyl-CoA)
- ACBP:** Proteína que Une Acil-CoAs (Acyl-CoA Binding Protein)
- ACC:** Acil-CoA Carboxilasa (Acyl-CoA Carboxylase)
- ACS:** Acil-CoA Sintasa (Acyl-CoA Synthase)
- Ala (A):** Alanina (Alanine)
- AOFA:** Antioxi Ácidos Grasos (Anthrhyoxy Fatty Acid)
- Asn (N):** Asparagina (Asparagine)
- BCA:** Ácido Bicinconínico (Bicinconinic Acid)
- CAT:** Carnitina-Acil Transferasa (Charnitine-Acyl Transferase)
- CD:** Dicoismo Circular (Circular Dichroism)
- Chol:** Colesterol (Cholesterol)
- CL:** Cardiolipina (Cardiolipin)
- CRABP:** Proteína que Une Ácido Retinóico Citosólica (Cytosolic Retinoic Acid Binding Protein)
- CRBP:** Proteína que Une Retinol Citosólica (Cytosolic Retinol Binding Protein)
- DG:** Diacilglicéridos (Diacylglycerides)
- DHE:** Dehidroergosterol (Dehydroergosterol)
- DPA:** Ácido Dipicolínico (Dipicolinic Acid)
- EC:** Ésteres de Colesterol
- EDTA:** Etilen-Diamino Tetra-Acetato de sodio
- EM:** Minimización de Energía (Energy Minimization)
- EML:** Enzimas del Metabolismo Lipídico
- EPC:** Fosfatidil Colina de Huevo (Egg Phosphatidyl-Choline)
- FA:** Ácidos grasos (Fatty Acids)
- FABP:** Proteínas que Unen Ácidos Grasos (Fatty Acid Binding Proteins)
- FAS:** Ácido Graso Sintasa (Fatty Acid Synthase)
- FAT/CD36:** Traslocasa de Ácidos Grasos (Fatty Acid Traslocase/Cluster Domain 36)
- FATP:** Proteína Transportadora de Ácidos Grasos (Fatty Acid Transpor Proteins)

**FFA:** Ácidos Grasos Libres (Free Fatty Acids)

**FRET:** Förster Resonance Energy Transfer

**Glu (E):** Glutámico (Glutamic)

**Ile (I):** Isoleucina (Isoleucine)

**LCFA:** Ácido Grasos de Cadena Larga (Long Chain Fatty Acid)

**Leu (L):** Leucina (Leucine)

**LUV:** Vesículas Unilamelares Grandes (Large Unilamellar Vesicles)

**Lys (K):** Lisina (Lysine)

**MG:** Monoacilglicéridos (Monoacylglycerides)

**MUFA:** Ácidos Grasos Monoinsaturados (Mono-Unsaturated Fatty Acids)

**NBD-PC:** N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidyl-choline

**NMR:** Resonancia Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)

**nsLTP:** Proteína Transportadora de Lípidos no específica (non specific Lipid Transfer Proteins)

**OA:** Ácido Oléico (Oleic Acid)

**PA:** Ácido Palmítico (Palmitic Acid)

**PAGE:** Electroforesis en Gel de Poli-Acrilamida (Poli-Acrylamide Gel Electrophoresis)

**PC:** Fosfatidil Colina (Phosphatidyl-Choline)

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

**PE:** Fosfatidil Etanolamina (Phosphatidyl-Ethanolamine)

**PI:** Fosfatidil Inositol (Phosphatidyl-Inositol)

**PL:** Fosfolípidos (Phospholipids)

**pmFABP:** Proteína que Une Ácidos Grasos de membrana plasmática (plasma membrane Fatty Acid Binding Protein)

**PPAR:** Receptor Activador de la Proliferación Peroxisomal (Peroxisome Proliferator Activated Receptor)

**PS:** Fosfatidil Serina (Phosphatidyl-Serine)

**PUFA:** Ácidos Grasos Poliinsaturados (Poly-Unsaturated Fatty Acids)

**PV:** Volumen Proteico (Protein Volume)

**rmsd:** desplazamiento cuadrático medio (root mean squared deviation)

**SCD:** Esteroil-CoA Desaturasa (Stearoyl-CoA Desaturase)

**SCP-2:** Proteína Transportadora de Esteroles tipo-2 (Sterol Carrier Protein type-2)

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)

**SLBP:** Proteínas Solubles que Unen Lípidos (Soluble Lipid Binding Proteins)

**SUV:** Vesículas Unilamelares Pequeñas (Small Unilamellar Vesicles)

**TG:** Triglicéridos (Triacylglycerides)

**Thr (T):** Treonina (Threonine)

**TLC:** Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography)

**Val (V):** Valina (Valine)

**WAS:** Superficie Accesible al Solvente (Water Accesible Surface)

**YLSCP2:** Proteína Transportadora de Esteroles tipo-2 de *Yarrowia lipolytica*  
(*Yarrowia lipolytica* Sterol Carrier Protein type-2)



# Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>v</b>
<b>Resumen</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xi</b>
<b>Índice</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1: ¿Por qué es importante estudiar las proteínas que unen lípidos?</b>	
<b><u>1.1. - Generalidades</u></b>	<b>9</b>
1.1.1. - Lípidos en la naturaleza	9
<b><u>1.2. - Participación de los lípidos en la biología celular</u></b>	<b>13</b>
1.2.1. - Metabolismo de ácidos grasos y glicéridos	13
1.2.2. - Síntesis de membranas y proliferación celular	15
1.2.3. - Patologías asociadas a los lípidos en humanos	17
<b><u>1.3. - Proteínas que Unen Lípidos</u></b>	<b>20</b>
1.3.1. - Proteínas extracelulares que unen lípidos	21
1.3.2. - Proteínas que unen lípidos de membrana	22
1.3.3. - Proteínas citosólicas que unen lípidos	23
<b><u>1.4. - Proteínas que Unen Ácidos Grasos (FABP)</u></b>	<b>26</b>
1.4.1. - Evolución y diversidad de las FABP	26
1.4.2. - Características estructurales de las FABP	30
1.4.3. - Funciones biológicas asociadas a las FABP	33
1.4.4. - FABP intestinales	34
1.4.5. - Estudios funcionales de IFABP y LFABP	40
<b><u>1.5. - Proteína Transportadora de Esteroles tipo 2 (SCP2)</u></b>	<b>46</b>
1.5.1. - Evolución y diversidad de las SPC-2	46
1.5.2. - Características estructurales del dominio SCP-2	47
1.5.3. - Funciones biológicas asociadas a la SCP-2	49
1.5.4. - Yarrowia lipolytica, una levadura muy particular.	50
1.5.5. - SCP2 de Yarrowia lipolytica	52
<b><u>1.6. - Hipótesis y objetivo generales</u></b>	<b>54</b>

## Capítulo 2: Rol de los residuos de Lisina de la región $\alpha$ -helicoidal de IFABP. Análisis inicial *in silico*.

<b><u>2.1. - Introducción</u></b>	<b>57</b>
<b><u>2.1.1 - Generalidades</u></b>	<b>57</b>
<b>2.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>60</b>
<b>2.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos</b>	<b>61</b>
<b><u>2.2. - Resultados y Discusión</u></b>	<b>63</b>
<b>2.2.1 - Obtención de modelos conformacionales de mutantes puntuales de IFABP</b>	<b>63</b>
<b>2.2.2. - Validación de los modelos conformacionales</b>	<b>64</b>
<b>2.2.3. - Comparación de los modelos conformacionales</b>	<b>66</b>
<b><u>2.3. - Conclusiones</u></b>	<b>75</b>

## Capítulo 3: Rol de los residuos de Lisina de la región $\alpha$ -helicoidal de IFABP. Efecto sobre el mecanismo colisional de transferencia de ligandos.

<b><u>3.1. - Introducción</u></b>	<b>79</b>
<b>3.1.1. - Generalidades</b>	<b>79</b>
<b>3.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>80</b>
<b>3.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos</b>	<b>81</b>
<b><u>3.2. - Resultados y Discusión</u></b>	<b>84</b>
<b>3.2.1. - Construcción de mutantes puntuales de IFABP</b>	<b>84</b>
<b>3.2.2. - Expresión y purificación de los mutantes puntuales de IFABP</b>	<b>86</b>
<b>3.2.3. - Controles estructurales de los mutantes puntuales de IFABP</b>	<b>87</b>
<b>3.2.4. - Transferencia de 12AO desde mutantes puntuales de IFABP</b>	<b>92</b>
<b>3.2.4.1. - Efecto de la concentración de EPC-SUV.</b>	<b>93</b>
<b>3.3.4.2. - Efecto de la composición de las SUV.</b>	<b>96</b>
<b><u>3.3. - Conclusiones</u></b>	<b>101</b>

## Capítulo 4: Análisis de la interacción de las FABP entre sí y con membranas.

<b><u>4.1. - Introducción</u></b>	<b>113</b>
<b>4.1.1. - Generalidades</b>	<b>113</b>
<b>4.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>115</b>
<b>4.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos</b>	<b>116</b>
<b><u>4.2. - Resultados y Discusión</u></b>	<b>118</b>
<b>4.2.1. - Interacción de FABP intestinales con membranas fosfolipídicas.</b>	<b>118</b>
<b>4.2.1.1. - Ensayos cualitativos de fotomarcación</b>	<b>118</b>
<b>4.2.1.2. - Ensayos cuantitativos</b>	<b>122</b>
<b>4.2.2. - Interacción entre FABP intestinales</b>	<b>124</b>
<b><u>4.3. - Conclusiones</u></b>	<b>127</b>

## **Capítulo 5: Efecto de la eliminación de la expresión de LFABP en células Caco-2 sobre el metabolismo de ácidos grasos.**

<b><u>5.1. – Introducción</u></b>	<b>133</b>
<b>5.1.1. - Generalidades</b>	<b>133</b>
<b>5.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>135</b>
<b>5.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos</b>	<b>136</b>
<b><u>5.2. - Resultados y Discusión</u></b>	<b>138</b>
<b>5.2.1. - Obtención de clones con la expresión disminuida de LFABP</b>	<b>138</b>
<b>5.2.2. - Proliferación y diferenciación celular</b>	<b>140</b>
<b>5.2.3. - Asimilación de FA</b>	<b>144</b>
<b>5.2.4. - Metabolismo de OA</b>	<b>148</b>
<b><u>5.3. - Conclusiones</u></b>	<b>151</b>

## **Capítulo 6: Primera Caracterización Biofísica- Funcional de la Proteína Transportadora de Esteroles de Yarrowia lipolytica (YLSCP).**

<b><u>6.1. - Introducción</u></b>	<b>155</b>
<b>6.1.1. - SLBP en levaduras</b>	<b>155</b>
<b>6.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos</b>	<b>156</b>
<b>6.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos</b>	<b>157</b>
<b><u>6.2. - Resultados y Discusión</u></b>	<b>160</b>
<b>6.2.1. - Capacidad de unión de análogos fluorescentes</b>	<b>160</b>
<b>6.2.2. - Partición de ligandos fluorescentes</b>	<b>162</b>
<b>6.2.3. - Transferencia de AOFA</b>	<b>163</b>
<b>6.2.3.1. - Efecto de la concentración de vesículas zwitteriónicas.</b>	<b>164</b>
<b>6.2.3.2. - Efecto de la carga superficial de las vesículas</b>	<b>165</b>
<b>6.2.3.3. - Efecto de la fuerza iónica del medio</b>	<b>166</b>
<b>6.2.4. - Cálculo de parámetros termodinámicos de la transferencia.</b>	<b>168</b>
<b><u>6.3. - Conclusiones</u></b>	<b>171</b>

## **Capítulo 7: Conclusiones finales y perspectivas futuras.**

<b><u>7.1. - FABP intestinales</u></b>	<b>179</b>
<b>7.1.1. - Conclusiones finales</b>	<b>179</b>
<b>7.1.2. - Perspectivas futuras</b>	<b>183</b>
<b><u>7.2. - SCP-2 de Yarrowia lipolytica</u></b>	<b>185</b>
<b>7.2.1. - Conclusiones finales</b>	<b>185</b>
<b>7.2.2. - Perspectivas futuras</b>	<b>186</b>

## **Apéndice A: Materiales y Métodos**

<b><u>A.1. - Protocolos de Bioinformática</u></b>	<b>189</b>
<b>A.1.1. - Modelado por homología</b>	<b>189</b>
<b>A.1.1.1. - Construcción de modelos virtuales de mutantes virtuales.</b>	<b>190</b>
<b>A.1.2. - Validación de los modelos</b>	<b>191</b>
<b>A.1.3. - Comparación de los modelos</b>	<b>193</b>
<b><u>A. 2. - Protocolos de Biología Molecular</u></b>	<b>195</b>
<b>A.2.1. - Minipreparación de Plásmidos.</b>	<b>195</b>
<b>A.2.2. - Digestión con enzimas de restricción.</b>	<b>196</b>
<b>A.2.3. - Electroforesis en geles de agarosa.</b>	<b>197</b>
<b>A.2.4. - Construcción de mutantes puntuales de IFABP de rata</b>	<b>197</b>
<b>A.2.4.1. - Reacción en cadena de la Polimerasa</b>	<b>198</b>
<b>A.2.4.2. - PCR de Solapamiento</b>	<b>199</b>
<b>A.2.5. - Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.</b>	<b>200</b>
<b>A.2.6. - Precipitación de ADN con etanol.</b>	<b>200</b>
<b>A.2.7. - Ligazón de fragmentos de ADN.</b>	<b>201</b>
<b>A.2.8. - Construcción del vector anti-mRNA hLFABP</b>	<b>201</b>
<b>A.2.9. - Obtención de células competentes.</b>	<b>202</b>
<b>A.2.10. - Transformación de Bacterias competentes.</b>	<b>203</b>
<b><u>A.3. - Protocolos de Bioquímica</u></b>	<b>205</b>
<b>A.3.1. - Screening de expresión de proteínas recombinantes</b>	<b>205</b>
<b>A.3.2. - Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida con SDS</b>	<b>205</b>
<b>A.3.3. - Expresión y purificación de proteínas recombinantes</b>	<b>207</b>
<b>A.3.3.1. - Expresión y Purificación de las FABP nativas y mutantes puntuales</b>	<b>207</b>
<b>A.3.3.2. - Expresión y purificación de las variantes estructurales de las FABP intestinales</b>	<b>209</b>
<b>A.3.3.3. - Expresión y purificación de YLSCP2</b>	<b>210</b>
<b>A.3.4. - Cuantificación de Proteínas.</b>	<b>211</b>
<b>A.3.4.1. - Coeficiente de Extinción Molar</b>	<b>211</b>
<b>A.3.4.2. - Bradford</b>	<b>212</b>
<b>A.3.4.3. - Ensayo de proteínas con ácido bicinonínico</b>	<b>212</b>
<b>A.3.5. - Obtención de anticuerpos policlonales anti-LFABP en conejo</b>	<b>214</b>
<b>A.3.6. - WesternBlot de Proteínas</b>	<b>214</b>
<b>A.3.7. - Ensayo de determinación de fósforo inorgánico</b>	<b>217</b>
<b><u>A.4. - Protocolos de Biofísica</u></b>	<b>218</b>
<b>A.4.1. - Control de la integridad estructural de los</b>	<b>218</b>
<b>A.4.1.1. - Dicroísmo Circular</b>	<b>218</b>
<b>A.4.1.2. - Rendimiento cuántico</b>	<b>219</b>
<b>A.4.1.3. - Determinación de la constante de afinidad por ácidos grasos naturales empleando el método de ADIFAB</b>	<b>220</b>
<b>A.4.2. - Determinación de la constante de disociación de AOFA y DHE</b>	<b>221</b>
<b>A. 4.3. - Ensayos de desplazamiento de 16AP</b>	<b>222</b>
<b>A.4.4. - Cálculo del coeficiente de partición</b>	<b>223</b>
<b>A.4.5. - Preparación de membranas artificiales</b>	<b>225</b>

<b>A.4.5.1. - Vesículas unilamelares pequeñas (SUV)</b>	<b>225</b>
<b>A.4.5.2. - Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV)</b>	<b>226</b>
<b>A.4.6. - Transferencia de antroiloxi- ácidos grasos (AOFA) desde SLBP hacia SUV.</b>	<b>226</b>
<b>A.4.6.1. - Efecto de la concentración de las vesículas aceptoras</b>	<b>227</b>
<b>A.4.6.2. - Efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras</b>	<b>228</b>
<b>A.4.6.3. - Efecto de la fuerza iónica</b>	<b>229</b>
<b>A.4.7. - Obtención de parámetros termodinámicos de la transferencia de AOFA</b>	<b>230</b>
<b>A.4.8. - Ensayo de fotomarcación con <sup>125</sup>I-TID-PC</b>	<b>321</b>
<b>A.4.8.1. - Síntesis <sup>125</sup>I-TID-PC</b>	<b>231</b>
<b>A.4.8.2. - Experimento de fotomarcación</b>	<b>233</b>
<b>A.4.9. - Ensayo de goteo del complejo Tb/DPA</b>	<b>234</b>
<b>A.4.10. - Transferencia de ligandos entre FABP nativas de intestino</b>	<b>235</b>
<b><u>A.5. - Protocolos de Biología Celular</u></b>	<b>237</b>
<b>A.5.1. - Propagación, mantenimiento y subcultivo de células Caco-2</b>	<b>237</b>
<b>A.5.2. - Congelado y descongelado de células Caco-2</b>	<b>238</b>
<b>A.5.3. - Obtención de clones Caco-2 con expresión disminuida de hLFABP</b>	<b>239</b>
<b>A.5.4. - Determinación de la capacidad de crecimiento</b>	<b>241</b>
<b>A.5.4.1. - Tiempo de duplicación</b>	<b>241</b>
<b>A.5.4.2. - Asimilación de <sup>3</sup>H-Timidina</b>	<b>242</b>
<b>A.5.5. - Diferenciación de células Caco-2</b>	<b>243</b>
<b>A.5.6. - Asimilación de ácidos grasos</b>	<b>244</b>
<b>A.5.7. - Distribución y Metabolismo de FA</b>	<b>246</b>
<b>A.5.7.1. - Extracción de lípidos totales</b>	<b>246</b>
<b>A.5.7.2. - Cromatografía en capa fina</b>	<b>247</b>
<b><u>A.6. - Análisis estadísticos.</u></b>	<b>249</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>253</b>







# Capítulo 1:

## ¿Por qué es importante estudiar las proteínas que unen lípidos?

### 1.1. - Generalidades

#### 1.1.1. - Lípidos en la naturaleza

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente muy diverso, cuya característica común y definitoria es su escasa solubilidad en soluciones acuosas. Esta heterogeneidad entre estos compuestos hidrofóbicos les permite cumplir funciones muy diversas. Así, por ejemplo, las grasas y aceites (triglicéridos, TG) son la reserva energética principal en animales y vegetales respectivamente. Los fosfolípidos (PL, del inglés *Phospholipids*), por otro lado, cumplen roles principalmente estructurales como la formación de membranas biológicas, junto con los esteroides que regulan la fluidez de las mismas. Éstos últimos además funcionan como cofactores de transcripción, hormonas y agentes emulsionantes en el tracto digestivo (sales biliares). Además, algunos PL participan de procesos de reconocimiento celular y transducción de señales. Los lípidos cumplen otros roles también cruciales, como cofactores de enzimas (grupo hemo, porfirinas), transportadores de electrones (quinonas), pigmentos fotosensibles (clorofilas, xantonas y carotenos), “chaperonas” de proteínas de membrana (PL y ácidos grasos), y segundos mensajeros (derivados de ácidos grasos poli-insaturados y fosfolípidos), sólo para mencionar algunos ejemplos.

Otras funciones de los lípidos incluyen el aislamiento térmico, eléctrico y mecánico de estructuras celulares o subcelulares; la lubricación e impermeabilización de superficies. También actúan como antioxidantes naturales, detergentes, pigmentos, feromonas y hasta participan en la flotabilidad de algunos organismos. Si bien las funciones y ejemplos de lípidos descritos anteriormente son los más conocidos, estudios recientes muestran que el papel de los mismos en la fisiología celular es mucho más amplio. En particular, vale la

pena resaltar que recientemente se ha observado que algunos lípidos cumplen funciones como moduladores de factores de transcripción de genes relacionados al metabolismo lipídico. La cantidad de moléculas lipídicas con reconocida función de mensajeros químicos ha crecido notablemente en los últimos años. Así, distintos tipos de lípidos, tales como los lisofosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos (FA, del inglés *Fatty Acid*) o sus derivados, intervienen en procesos celulares tan diversos como la regulación del metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la senescencia y la muerte celular, la angiogénesis y la vasoconstricción, entre otros (Cao, *Cell* 2008; Duplus, *Science* 2000; Chawla, *Science* 2001; Funk, *Science* 2001; Hla, *Science* 2001; Merrill, *J.Biol.Chem.* 2002; Hannun, *J.Biol.Chem.* 2002). Así, los mensajeros lipídicos resultan fundamentales para la correcta coordinación de los procesos celulares, orgánicos y sistémicos.

Sin embargo, la baja solubilidad de los lípidos representa un inconveniente central que la célula debe sortear, ya que dificulta la movilidad, el intercambio y la interconversión de los mismos, fenómenos necesarios para que los lípidos puedan cumplir tan diversas funciones. Así, las células expresan un conjunto de proteínas que unen lípidos y son capaces de reconocerlos, trasportarlos y transformarlos.

Los lípidos se clasifican de acuerdo a su estructura (adaptado de Lehninger, *Principles of Biochemistry* 2005) en:

- Lípidos Simples o No-Hidrolizables:
  1. **Ácidos Grasos:** Presentan una larga cadena carbonada alifática, generalmente con un número par de átomos de C, con un grupo carboxilo terminal. Se subdividen en Saturados, Mono-insaturados (MUFA) y Poli-insaturados (PUFA) de acuerdo al número de dobles enlaces C=C que presentan, generalmente en configuración *cis*.
  2. **Esteroles:** Este grupo presenta una estructura común casi planar formada por un policiclo de antraceno más un anillo de 5 carbonos fusionado en un extremo que se continúa con una cadena alifática, y un oxihidrilo alcohólico en el extremo opuesto. Ejemplos comunes son colesterol (Chol), dehidroergosterol (DHE), ácidos biliares, hormonas esteroideas, fitoesterols, etc.

3. **Hidrocarburos Terpenoides:** Este grupo de compuestos deriva de la condensación de unidades de 5 átomos de C (isopreno) y forma moléculas muy diversas como pigmentos (xantonas, carotenos, etc.), retinol, ácido retinóico, esencias, fitol, etc.
- Lípidos Complejos o Hidrolizables:
    1. **Ceras y ésteres de esteroides:** Este grupo está formado por éteres y ésteres entre FA y alcoholes grasos (i.e. con una porción hidrocarbonada mayoritaria). Las ceras son comunes en plantas donde cumplen una función de protección e impermeabilidad de frutos y demás estructuras. Cuando el alcohol participante es el colesterol y forma un éster con un FA obtenemos los ésteres de colesterol (EC), que funcionan como una reserva inerte de colesterol en las células animales.
    2. **Glicéridos:** La estructura básica de este grupo está determinada por un glicerol esterificado con FA y/o con ácido fosfórico. Monoacilgliceroles (MG), diacilgliceroles (DG) y triacilgliceroles (TG) están incluidos en este grupo junto con los fosfoglicéridos. En particular, estos últimos son los ladrillos básicos para la formación de membranas.
    3. **Esfingosina y derivados:** Este grupo es muy similar al de los fosfoglicéridos pero están formados a partir de esfingosina en lugar del glicerol. La esfingosina es un aminoalcohol graso, el cual forma un enlace tipo amida con un FA y una unión éster con un ácido fosfórico. Luego, este último puede ser nuevamente esterificado con sacáridos para formar gangliósidos y cerebrósidos de acuerdo al oligosacárido que se forma a sobre este.

Dada la amplia variedad de funciones que desempeñan los lípidos, es necesaria una precisa regulación del metabolismo de los mismos para mantener la homeostasis celular. Patologías como obesidad, diabetes, síndrome metabólico, aterosclerosis, trastornos malabsortivos y cáncer son sólo algunos ejemplos de enfermedades cuya aparición y/o progresión ha sido asociada a alteraciones en el metabolismo lipídico (*Lusis, Nature 2000; Shulman, J.Clin.Invest. 2000; Kopelman, Nature 2000; Khan, J.Clin.Invest. 2000; Shureiqi, Cancer Res. 2001; Ding, Mol.Cancer 2003*). Progresivos estudios en este campo permitirán una comprensión más completa de los procesos celulares en

condiciones fisiológicas y patológicas, anteriormente adscriptos exclusivamente a las proteínas, pero ahora compartiendo responsabilidades con los lípidos.

## **1.2. - Participación de los lípidos en la biología celular**

### **1.2.1. - Metabolismo de ácidos grasos y glicéridos**

Los FA son componentes básicos de los PL, TG y EC. Como tales, los FA constituyen la principal reserva de energía de la célula, son componentes integrales de las membranas celulares, precursores de segundos mensajeros intracelulares u hormonas y pueden modular la expresión de algunos genes asociados al metabolismo lipídico.

Los FA pueden ser obtenidos a partir de la dieta o ser sintetizados endógenamente. En este último caso participan un conjunto de enzimas citosólicas a partir de acetil-CoA: acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS), elongasas y desaturasas. Esta vía produce primeramente ácido palmítico (16:0), el cual luego puede funcionar como sustrato de las elongasas, transformándose entonces en ácido esteárico (18:0) (*Jayakumar, Proc.Natl. Acad.Sci. 1995; Matsuzaka, J.Lipid Res. 2002*). Los FA saturados palmítico y esteárico son los principales sustratos de la estearoil-CoA desaturasa o  $\Delta^9$ -desaturasa (SCD), que introduce una insaturación en configuración *cis* entre los átomos C9 y C10 generando los FA monoinsaturados (MUFA) palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9) (*Enoch, J.Biol.Cem. 1976*). Normalmente, el exceso de hidratos de carbono asimilados desde la dieta, que no pueden guardarse como glucógeno, se transforma en lípidos de reserva sintetizando estos FA para luego formar TG. Los microorganismos y plantas normalmente pueden sintetizar todo el rango de FA que requieren. Sin embargo, debido a que los animales no cuentan con enzimas que introduzcan insaturaciones más allá de la posición 9, los FA poliinsaturados (PUFA) deben ser incorporados obligatoriamente con la dieta, por lo que se los denomina “ácidos grasos esenciales”. Éstos corresponden a los FA de las series n-6 y n-3 que derivan de los ácidos linoleico (18:2 n-6) y  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) sintetizados por desaturasas vegetales que usan como sustratos las cadenas aciladas de los PL de membrana. Por acción de las elongasas y las desaturasas ( $\Delta^6$  y  $\Delta^5$ -desaturasas) los animales obtienen luego los miembros de cadena más larga de las series n-3 y n-6 (*Nakamura, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2003*).

Tanto los FA endógenos como los exógenos son activados por su unión a la Coenzima A por las acil-CoA sintetas (ACS), para participar luego en la síntesis de PL y TG. En la luz del intestino, los TG dietarios son hidrolizados a FA y *sn*-2-monoacilglicerol (2-MG). En los enterocitos, gran parte de los TG sintetizados provienen de la reacilación de este 2-MG (Lehner, *Prog.Lipid Res.* 1996). En contraste, el resto de los tejidos sintetizan TG y PL *de novo* a través de la ruta del ácido fosfatídico que parte de la acilación del *sn*-glicerol-3-fosfato en las posiciones *sn*-1 y 2 (Coleman, *Prog.Lipid Res.* 2004). El ácido fosfatídico luego es utilizado para la síntesis de fosfatidilinositol (PI, *Phosphatidylinositol*), fosfatidilglicerol (PG, *Phosphatidylglycerol*) y cardiolipina (CL), mediante la formación del intermediario común CDP-diacilglicerol en la formación de estos PL aniónicos (Bell, *Annu.Rev.Biochem.* 1980). Además, el DG es sustrato para la síntesis de fosfatidilcolina (PC, *Phosphatidylcholine*), fosfatidiletanolamina (PE, *Phosphatidylethanolamine*) y fosfatidilserina (PS, *Phosphatidylserine*), o puede ser fosforilado por la diacilglicerol kinasa para producir nuevamente ácido fosfatídico (Pelech, *Biochim.Biophys.Acta* 1984; Tijburg, *Biochim.Biophys.Acta* 1989; Jackowski, *J.Biol.Chem.* 2005; Kent, *Biochim.Biophys.Acta* 1997; Clement, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999). Para la síntesis de TG, sin embargo, el ácido fosfatídico es desfosforilado por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa-1 que libera diacilglicerol (DG), el cual se esterifica con un tercer FA gracias a la acción de la diacilglicerol aciltransferasas (DGAT1 y DGAT 2) (Cases, *Proc Natl Acad Sci.* 1998; Cases, *J.Biol.Chem.* 2001).

Los productos de hidrólisis de los glicerolípidos pueden reciclarse. Los lisofosfolípidos, ácido fosfatídico, DG, FA y compuestos de la cabeza polar de los PL son utilizados para la resíntesis de nuevos glicerolípidos. Por otro lado, los mismos productos de hidrólisis pueden entrar en el catabolismo con el fin de aportar energía para las funciones celulares. Los FA son activados por las ACS e introducidas en la mitocondria por acción de las carnitina-aciltransferasas (CAT1 y CAT2) y los transportadores específicos de carnitina y acil-carnitina. Dentro de la mitocondria de animales y plantas los acil-CoA se regeneran y se oxidan por  $\beta$ -oxidación para generar acetil-CoA que luego se degrada por completo en el ciclo de Krebs. Sin embargo, en levaduras, la vía de la  $\beta$ -oxidación tiene lugar sólo en

los peroxisomas. En paralelo, el glicerol liberado por la hidrólisis de TG puede ser empleado para la resíntesis de los mismos en el hígado activándolo gracias a la glicerol kinasa. Pero en condiciones de ayuno o de inanición el glicerol es una fuente importante de precursores gluconeogénicos. La degradación de TG aporta una gran cantidad de energía y precursores gluconeogénicos, muy importante para el caso de animales que hibernan por ejemplo.

### **1.2.2. - Síntesis de membranas y proliferación celular**

Las membranas biológicas están formadas por distintos tipos de componentes de acuerdo a las funciones que desempeñan y a la especie a la que pertenecen. Los componentes más abundantes son usualmente PL y proteínas, pero los esteroides y los lípidos y proteínas conjugados con azúcares también están presentes. La composición específica varía de especie a especie, y los microorganismos también presentan componentes poco frecuentes como parte de sus membranas, como FA ramificados y lipopolisacáridos en bacterias, o ácidos micólicos en hongos y levaduras.

Se cree que el advenimiento de un límite físico membranoso fue uno de los pasos críticos en la evolución prebiótica de los compuestos orgánicos hacia los orígenes de la vida. La membrana plasmática define dos compartimentos separados bien distintos y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el medio extracelular a la vez que encierra la célula y define sus límites. Más importante aún, la membrana celular está cubierta de receptores proteicos que son sensibles a señales externas y permiten a la célula reaccionar de acuerdo a los cambios de las condiciones del medio externo. Más adelante, las membranas resultaron de gran relevancia en la aparición de las células eucariotas que presentan un extenso sistema de endomembranas que compartimentaliza y organiza los componentes que desarrollan distintas funciones. En particular, la membrana plasmática es el límite de la célula con el entorno y, lejos de ser una pared rígida, participa activamente en la generación de gradientes y potenciales transmembrana, o del transporte de sustancias que con estos potenciales se impulsa. Por ejemplo, el transporte de iones a través de la membrana permiten su

acople a la síntesis de ATP, el movimiento selectivo de solutos y la transmisión y traducción de señales eléctricas

Por todo lo expuesto anteriormente, toda célula necesita duplicar sus membranas antes de dividirse. Esto es de particular importancia para algunos tejidos que presentan una tasa de crecimiento relativamente alta, como los epitelios descamativos (piel, mucosa intestinal, etc.), la línea eritroide o el hígado, que presenta una capacidad de regeneración sobresaliente. Es por eso que agentes que inducen la proliferación celular *in cultivo*, como la adhesión a sustratos y los factores de crecimiento, promueven la síntesis de todos los componentes de membranas (Page, *J.Biol.Chem.* 1997; Demoulin, *J.Biol.Chem.* 2004).

La PC, por ejemplo, es el PL mayoritario en las membranas celulares y su síntesis está coordinada según la fase del ciclo celular tal que su masa se incrementa durante la fase "S" y una disminución de la hidrólisis de este PL (Jackowski, *J.Biol.Chem.* 1994; Golfman, *J.Biol.Chem.* 2001). Estudios con inhibidores de la síntesis de PC y precursores demuestran que la síntesis de fosfatidilcolina es necesaria para la progresión del ciclo celular así como para la viabilidad celular (Yen, *FASEB J.* 1999; Finney, *Cancer Res.* 2000; Boggs, *J.Biol.Chem.* 1995; Miquel, *J.Biol.Chem.* 1998; Baburina, *J.Biol.Chem.* 1998; Anthony, *J.Biol.Chem.* 1999) y lo propio ocurre con la síntesis de colesterol (Siperstein, *J.Lipid Res.*1984). Asimismo, la tasa de síntesis de los principales componentes de las membranas celulares, PL y Chol, está coordinada entre sí y es proporcional a la tasa de proliferación celular, siendo mayor en células en crecimiento que en células diferenciadas o quiescentes (Cornell, *J.Cell Biol.* 1980).

Las membranas celulares contienen distintos tipos de FA, saturados e insaturados; y, de hecho, la composición de los PL de membrana puede afectar distintas funciones celulares, por lo que está altamente regulada. La composición de los PL de membrana puede alterar el transporte mediado por proteínas, la actividad de receptores y enzimas unidas a membrana, la fagocitosis y el crecimiento celular (Gould, *J.Biol.Chem.* 1982; Whitcomb, *J.Clin.Invest.* 1988;

*Field, J.Biol.Chem. 1990; Ledoux, Circ Res. 2003; Spector, J.Lipid Res. 1985*). El efecto se debería a la modificación de las propiedades físicas de las membranas, tales como la fluidez o la curvatura (*King, J.Biol.Chem. 1978, Maggio, Biochim Biophys Acta. 1985*). Los FA tienen asimismo un importante papel en la estructuración de los dominios de membrana, rafts y caveolas enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos acilados con FA saturados.

Cómo se mencionó anteriormente, los FA también son constituyentes fundamentales de los TG. La función más ampliamente aceptada y estudiada de éstos es la de reserva energética para el metabolismo celular y sistémico. Si bien los adipocitos son las células especializadas para el almacenamiento de los TG en animales, dónde su metabolismo está regulado por las demandas energéticas del organismo, todas las células poseen una pequeña cantidad de TG localizados en “gotas de lípidos” (“*lipid droplets*”) o cuerpos lipídicos. Estos TG pueden estar relacionados con funciones no convencionales, como la provisión de sustratos lipídicos, inactivación de hormonas y drogas y la señalización intracelular (*Coleman, Progr.Lipid Res. 2004; Caviglia, J.Lipid Res. 2003; Bagnato, J.Biol.Chem. 2003*). Éstos TG podrían servir como reservorio para la síntesis de PL, ya que el aumento de los intermediarios o la inhibición de la síntesis de PC canaliza los FA y el DG a la síntesis de TG (*Igal, J.Biol.Chem. 1996, Jackowski, Biochim Biophys Acta. 2000*). Por otro lado, recientemente se ha vinculado el metabolismo de lípidos en adipocitos, debido a su masa principalmente de TG, a funciones no convencionalmente asociadas al tejido adiposo como ser la secreción de ácido palmítico (16:1 n-7) como una citokina lipídica (*lipokines*) que modula el metabolismo y la acción de la insulina a nivel sistémico, hígado y músculo en particular (*Cao, Cell 2008*).

### **1.2.3. - Patologías asociadas a los lípidos en humanos**

Debido a la amplia variedad de funciones que cumplen los lípidos, la alteración de su metabolismo está asociada a una gran cantidad de patologías. Obesidad, Diabetes, Aterosclerosis, Cáncer o Síndrome Metabólico son sólo algunos ejemplos de las enfermedades en las que los lípidos tienen una

participación central; tanto en el establecimiento como en la evolución o el tratamiento de las mismas. Así, una dieta hipercalórica por un exceso de lípidos (lo que normalmente se denomina la “dieta occidental” de la industria de las “Comidas Rápidas”) se considera como uno de los factores más importantes para el advenimiento de la Obesidad, Diabetes, Aterosclerosis y Síndrome Metabólico debido a la acumulación de FA en forma de TG y EC, en el tejido adiposo en primer medida, pero también en forma anómala en macrófagos e hígado.

Así mismo, debido a su función estructural, los PL afectan el crecimiento celular. Así, la tasa de crecimiento neto de una población de células está dada por las velocidades de proliferación y de muerte celular. La apoptosis, o “muerte celular programada”, es un proceso fisiológico de crucial importancia durante el desarrollo embrionario así como en el postembrionario asociado a la organogénesis (*Ali-Khan, Toxicol Sci. 2006; Zucker, Methods Mol Biol. 2000*). La desregulación de este proceso tiene implicancias en la patogénesis de distintas enfermedades. Por un lado, la inhibición de la apoptosis puede llevar al desarrollo de tumores, mientras que la misma está exacerbada en enfermedades neurodegenerativas o autoinmunes.

Por otro lado, la lipotoxicidad es un proceso por el cual la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos deviene en disfunción y muerte celular (*Unger, Annu.Rev.Med. 2002; Unger Biochim Biophys Acta 2002; Schaffer, Curr. Opin Lipidol. 2003*). En modelos animales y humanos, el exceso de FA circulantes en plasma resulta en la acumulación de lípidos en células  $\beta$ -pancreáticas, en músculo esquelético y miocitos cardíacos relacionada al desarrollo de Diabetes (*Shimabukuro, J.Biol.Chem. 1998; Shimabukuro, Proc.Natl. Acad.Sci. 1998; Unger, Diabetes 2001; Lupi, Diabetes 2002*), insulinoresistencia (*Dresner, J.Clin.Invest. 1999; Storz, Eur. J. Biochem. 1999; Sinha, J. Biol. Chem. 2004*) y cardiomiopatías (*Zhou, Cancer Res. 2000; Dyntar, Diabetes 2001*), respectivamente. Sin embargo, existe un efecto diferencial de los distintos FA respecto a la citotoxicidad celular. Los FA saturados, principalmente el ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0) inducen apoptosis en distintos tipos de células: células  $\beta$ -pancreáticas, cardiomiocitos, células mesangiales, neuronas y células

de cáncer de mama (*Maedler, Diabetes 2001; de Vries, J. Lipid Res. 1997; Mishra, Cardiovasc Diabetol. 2005; Ulloth, J. Neurochem. 2003; Hardy, Cancer Res. 2000*). Mientras que, en los mismos modelos experimentales, los MUFA palmitoleico (16:1 n-7) y oleico (18:1 n-9) no sólo previenen la muerte celular inducida por los FA saturados, sino que promueven la proliferación de las células tumorales (*Hardy, Cancer Res. 2000*). Respecto de los PUFA existen discrepancias entre distintos modelos celulares, pero resultan pro-apoptóticos en células endoteliales normales, mientras que su acción es pro-mitótica en células tumorales. (*Artwohl, FASEB J. 2003; Hardy, J. Biol. Chem. 2003*)

Es bien conocido el efecto citotóxico de FA y sales biliares debido a su acción detergente sobre las membranas biológicas; y la presencia proteínas que ayuden a su transporte podría también contribuir neutralizando dicha acción. A pesar de que existen numerosas evidencias que apoyan la presencia de un fenómeno lipotóxico en diversos modelos experimentales, aún no está claro el rol que cumplen los TG en este mecanismo. La acumulación de TG está frecuentemente asociada a la apoptosis y disfunción celular (*Finstad, Biochem. J. 1998; Shimabukuro, J. Biol. Chem. 1998*), pero también se ha propuesto que la síntesis de TG podría proteger a las células de los efectos deletéreos del exceso de los FA libres (*Cnop, Diabetes 2001; Listenberger, Proc.Natl. Acad.Sci. 2003*). Esta diferencia podría ser debido al conjunto de proteínas intracelulares que unen los lípidos y canalizan su metabolismo a destinos específicos. Por tal motivo es importante estudiar el rol que estas proteínas desempeñan.

### **1.3. - Proteínas que Unen Lípidos**

Diversos procesos biológicos requieren de la movilización de lípidos a través de fases acuosas para cumplir diversas funciones. Debido a la escasa solubilidad en agua que los caracteriza, a lo largo de la evolución han surgido un grupo de proteínas, con motivos estructurales muy variados, con la capacidad de unir, no covalentemente y en forma reversible, lípidos para así facilitar su transporte o disponibilidad en sistemas acuosos (*Chmurzynska, J. Appl. Gen. 2006*). A estas proteínas se las conoce en conjunto como Proteínas Solubles que Unen Lípidos (SLBP, de sus siglas en inglés *Soluble Lipid Binding Proteins*) y se presentan tanto a nivel citosólico como extracelular. Estas proteínas están supuestamente asociadas a procesos de gran demanda metabólica de lípidos, ya sea para la obtención de energía, su almacenaje o como precursores biosintéticos. Asimismo, también existen proteínas de membrana capaces de reconocer y unir lípidos en forma específica. Dentro de este grupo se incluyen a la gran mayoría de las enzimas que emplean a los lípidos como sustratos.

En vertebrados, órganos como el intestino delgado, hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y corazón presentan rutas metabólicas que demandan un importante aporte de lípidos, FA en particular. Los FA deben ser transportados desde o hacia otros tejidos vía el torrente sanguíneo; o dentro del citosol entre distintos compartimentos o estructuras subcelulares. Así, podemos distinguir dos grandes grupos de SLBP, intracelulares y extracelulares.

Algunos ejemplos de los procesos intracelulares que involucran transporte de lípidos incluyen, por ejemplo, la absorción intestinal de FA provenientes de la dieta, su reestirificación a TG y su secreción como Quilomicrones a la linfa. A nivel del tejido adiposo, los FA asimilados desde el torrente sanguíneo son reestirificados a TG para su almacenamiento y serán luego movilizados como FA libres a sangre (para la obtención de energía por  $\beta$ -oxidación) según las necesidades energéticas de otros tejidos. Los FA también pueden ser utilizados por todos los tipos celulares para el crecimiento y así ser incorporados en lípidos más complejos como PL y EC, ser empleados en la acilación de proteínas

específicas o cumplir su función en la transducción de señales como segundos mensajeros intracelulares.

### **1.3.1. - Proteínas extracelulares que unen lípidos**

En la sangre, los lípidos son transportados unidos a proteínas específicas que los unen y mantienen en solución, o como partículas lipoprotéicas. Quizás la SLBP más ampliamente estudiada sea la Albúmina Sérica. En el plasma sanguíneo y los fluidos intersticiales de mamíferos, la Albúmina es la proteína más abundante y transporta los FA libres (FFA, *Free Fatty Acids*). La misma ha sido cristalizada en varias conformaciones con distintos ligandos unidos y se sabe que une no sólo FA sino también una gran variedad de drogas y demás lípidos (*Zunzain, BMC Struct Biol. 2003; Black, Bioorg. Med. Chem. 2008; Cupp, Biochemistry. 2004; Glatz, Prog. Lipid Res. 1996*). Sin embargo, en el plasma también están presentes una gran variedad de proteínas específicas que unen hormonas lipídicas como la proteína que une testosterona (TBP), la proteína que une estrógeno (EBP) o la proteína que une progesterona (PBP), para mencionar sólo unos pocos ejemplos. La gran variedad de proteínas con la función específica de transporte de sustancias lipídicas es un fuerte indicio de la importancia de estas para el correcto funcionamiento de los lípidos.

El transporte de TG, PL y EC se lleva a cabo bajo la forma de estructuras lipoprotéicas especializadas denominadas "lipoproteínas", y de las cuales, a pesar su gran importancia, no entraremos en mayores detalles en el presente trabajo de tesis. Bastará con tener en cuenta que las lipoproteínas son partículas con un núcleo altamente hidrofóbico, en el que se ubican TG y EC, y una superficie relativamente hidrofílica formada por una monocapa de PL más proteínas y colesterol libre. Cada partícula lipoprotéica esta asociada con una o más moléculas proteicas, las apolipoproteínas, que se encuentran en su superficie. El tipo de apolipoproteína y la proporción de TG determinan el tipo de lipoproteína y su función característica en el transporte de lípidos entre tejidos.

### 1.3.2. - Proteínas que unen lípidos de membrana

Originalmente se creía que la entrada de los FA de cadena larga a las células eucariotas se producía por difusión simple a través de la membrana plasmática. Actualmente existe amplia evidencia que demuestra la existencia de un mecanismo saturable de incorporación de FA en distintos tejidos, característico de un proceso de difusión facilitada. Dicho proceso coexistiría con el proceso de difusión simple de FA descrito inicialmente (*Stahl, Trends Endocrinol Metab. 2001*). Apoyando esta idea, se han identificado varias proteínas que participarían de este transporte de FA a través de membrana. Se han caracterizado tres grupos de proteínas receptoras y transportadoras de FA que se expresan en membranas: las Proteínas que Unen Ácidos Grasos de Membrana Plasmática (pmFABP) (*Stremmel, J. Clin. Invest. 1985*), las Traslocasas de Ácidos Grasos (FAT/CD36) (*Abumrad, J. Biol. Chem. 1981*) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (*Schaffer, Cell 1994*). Sin embargo, más recientemente, éste último grupo se asocia más a estructuras microsomales y no sólo a membrana plasmática, pero son capaces de trastocar a membrana bajo ciertos estímulos (*Stahl, Dev. Cell. 2002; Gimeno, J Biol Chem. 2003*).

Asimismo, deberíamos mencionar que la gran mayoría de las enzimas que participan a distintos niveles del metabolismo lipídico están dispersas en las distintas estructuras membranosas de la célula. Así, por ejemplo, la síntesis de FA se da a nivel citosólico por enzimas de la fracción microsomal (FAS, elongasas y desaturasas). Por otro lado, las enzimas del catabolismo de FA se reparten entre las fracciones mitocondrial y peroxisomal. Procesos aún no completamente comprendidos también tienen lugar a nivel de las invaginaciones que presenta la envoltura nuclear y en la propia matriz nuclear (*Ves-Losada, Lipids. 2001; Maté, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004; Maté, Lipids. 2007*). Asimismo, cada grupo de lípido requiere de un conjunto de enzimas específicas que unan PL, esteroides, TG, y cada uno de los intermediarios de síntesis y degradación de los mismos.

### 1.3.3. - Proteínas citosólicas que unen lípidos

La naturaleza intrínseca de los compuestos lipídicos, requiere de la presencia de un conjunto de proteínas solubles que los unan y faciliten su movilización entre distintos compartimientos subcelulares, rutas metabólicas o el sitio de almacenamiento (gotas de lípidos) en un entorno acuoso como el citoplasma. Éste es el rol asignado comúnmente a las SLBP intracelulares sin las cuales muchos de los procesos metabólicos en los sistemas biológicos no serían posibles. Ejemplos prominentes son las proteínas que unen ácidos grasos (FABP, de su siglas en ingles *Fatty Acid Binding Proteins*) (Storch, *Annu Rev Nutr.* 2008), la proteína que une acil-CoA (ACBP, del su nombre en inglés *Acyl-CoA Binding Protein*) (Kragelund, *Biochim Biophys Acta* 1999), las proteínas transportadoras de lípidos no específicas (nsLTP, *non-specific Lipid Transfer Proteins*) (Kader, *Annu Rev Plant Physiol. - Plant Mol Biol.* 1996), la proteína transportadora de esteroides tipo 2 (SCP2, *Sterol Carrier Protein-2*) (Edqvist *J. Mol. Evol.* 2006), y una familia de proteínas llamadas CRAL\_TRIO, que incluye a la proteína transportadora de fosfatidilinositol de levadura (Sec14) y la proteína transportadora de tocoferol (TTP) (Schaaf, *Mol Cell* 2008; Morley *J. Biol. Chem.* 2008). Recientemente se han reportado nuevas proteínas de helmintos que se incluirían en el conjunto de familias de las SLBP. Algunas pertenecen a la familia de las FABP, pero además se han identificado al menos dos nuevas familias con motivos estructurales y especificidad de ligandos exclusivos.

Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en los distintos reinos. Por ejemplo, las nsLTP son específicas de plantas superiores. FABP, ACBP y SCP2 se expresan en animales, aunque las últimas dos familias también lo hacen en hongos y plantas. Además, frecuentemente se encuentra, en organismos eucariotas superiores, representantes de varias de estas familias de proteínas coexistiendo en un mismo tipo celular, o incluso isotipos de una misma familia. Esto estaría indicando una especialización en las funciones de cada una o una redundancia funcional. Teniendo en cuenta la importancia del metabolismo lipídico para las células, no sería difícil justificar la selección de dicha superposición funcional.

Por otro lado, las distintas SLBP difieren en su estructura, filogenia, localización tisular e intracelular y propiedades de unión de ligandos hidrofóbicos. Esto es fácil de entender en organismos pluricelulares donde se observa una división de tareas entre distintos tejidos o compartimentos intracelulares. Sin embargo, es interesante mencionar que distintos organismos unicelulares logran cumplir con todas sus funciones vitales con una dotación única de SLBP. Por ejemplo, se sabe que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expresa una sola SLBP perteneciente a la familia de la ACBP, y, sin embargo, *Yarrowia lipolytica*, que posee una capacidad extraordinaria para metabolizar compuestos hidrofóbicos, posee sólo dos SLBP, una perteneciente a la familia ACBP y otra de la familia de la SCP-2 (*Dell'Angelica, Comp. Biochem. Physiol. 1992*). Esta distribución desigual en organismos relacionados podría estar sugiriendo también un solapamiento funcional entre distintos tipos de SLBP y justificar las diferencias observadas en relación al metabolismo lipídico de cada especie.

El descubrimiento de las SLBP intracelulares es relativamente reciente en comparación con la albúmina sérica. Aunque hay una gran cantidad de información estructural y genómica disponible, aún no está claro cuáles podrían ser las funciones específicas que estas SLBP estarían desarrollando. Inicialmente se las asoció a funciones de transporte de lípidos intracelular, por analogía con las extracelulares, y a la protección contra el efecto deletéreo que presentan FA y sales biliares, en particular en tejidos como el epitelio intestinal, hígado o tejido adiposo que deben manejar grandes cantidades de estos lípidos. Sin embargo, más recientemente nuevas funciones han comenzado a proponerse gracias a estudios más recientes. La gran estabilidad, el pequeño tamaño y la fácil producción en forma recombinante que caracteriza a las SLBP intracelulares, han sido de gran ayuda para estudios a nivel teórico (por simulación), estructural y biofísico; que, en combinación con los recientes reportes de ratones *knock-out* y estudios de polimorfismos en poblaciones humanas, abren nuevas posibilidades para comprender mejor el rol que estas proteínas cumplen. Algunos de los resultados más destacados se presentan en la sección siguiente.

En las secciones siguientes se procura presentar, en forma general, algunas de las características más sobresalientes de las familias de FABP y SCP2, para luego enfocarnos sólo en algunos miembros que se expresan en sistemas en los que se manejan grandes cantidades de lípidos en forma extraordinaria. Por un lado, se contrastarán dos FABP que se coexpresan en el epitelio intestinal de mamíferos, a fin de comprender la participación, y la necesidad, de ambas proteínas para los procesos de asimilación y metabolismo de FA dentro del enterocito. Por otro lado, se presentará la primera caracterización biofísica-funcional de un miembro de la familia de SCP2 que se expresa en la levadura *Yarrowia lipolytica*, que presenta un metabolismo lipídico muy llamativo en ausencia de otras SLBP que unan FFA.

## **1.4. - Proteínas que Unen Ácidos Grasos (FABP)**

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABP) pertenecen a una familia multigénica de proteínas citosólicas pequeñas (entre 14 y 15 kDa) que presentan la capacidad de unir, principalmente, ácidos grasos de cadena larga (LCFA) pero también retinol, esteroides, etc. (*Storch, Annu. Rev. Nutr. 2008*). Desde el hallazgo de los primeros miembros de esta familia en 1972 (*Ockner, Science 1972*), se han identificado numerosos representantes de esta familia. Cabe mencionar, que las proteínas citosólicas que unen retinol (CRBP, *Cytosolic Retinol Binding Protein*) y las proteínas citosólicas que unen ácido retinóico (CRABP, *Cytosolic Retinoic Acid Binding Protein*) también pertenecen a la familia de las FABP ya que están estrechamente relacionadas a nivel estructural y génico (*Vogel, J. Biol. Chem. 2001*). Entre todos los miembros de esta familia de proteínas se observa una elevada conservación de la estructura terciaria, aún con identidades de secuencia que llegan tan solo al 20% en algunos casos.

### **1.4.1. - Evolución y diversidad de las FABP**

Los distintos integrantes de la familia de FABP se denominaron de acuerdo al tejido en el que fueron identificadas originalmente. Más recientemente se ha comprobado que varias de las FABP se expresan en más de un tejido, lo que podría volver a la nomenclatura original un tanto confusa y poco precisa. Por tal motivo, actualmente se prefiere la nomenclatura que se presenta en la **Tabla 1.1**, en la que se enumeran las proteínas y los genes. Asimismo, también se presenta un resumen de la distribución y la afinidad por ligandos hidrofóbicos de cada miembro y la denominación original. Sin embargo, a lo largo del presente trabajo de tesis mantendremos la nomenclatura original ya que es la empleada en la mayoría de la bibliografía disponible actualmente.

**Tabla 1.1. – Características generales y nomenclatura de los miembros de la familia de las FABP presentes en mamíferos.<sup>a</sup>**

Gen	Nombre	Nombre original	identific ada en:	Expresión	Ligandos naturales
<i>fabp1</i>	FABP1	LFABP	Hígado	<b>Hígado, intestino, riñón,</b> pulmón y páncreas (mamíferos)	LCFA, acil-CoA, MG, LisoPL, sales biliares y grupo hemo.
<i>fabp2</i>	FABP2	IFABP	Intestino delgado	<b>Intestino,</b> hígado (mamíferos)	LCFA
<i>fabp3</i>	FABP3	HFABP	Corazón	<b>Músculo esquelético, corazón, cerebro, riñón, pulmón, glándulas adrenales</b> y mamas, testículos, ovarios y estómago (mamíferos)	LCFA
<i>fabp4</i>	FABP4	AFABP o aP2	Tejido adiposo	<b>Tejido adiposo, macrófagos, piel y placenta</b> (mamíferos)	LCFA
<i>fabp5</i>	FABP5	EFABP ó KFABP	Piel	<b>Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, corazón, músculo esquelético, retina,</b> intestino, testículos, y riñón (mamíferos)	LCFA
<i>fabp6</i>	FABP6	IBABP ó ILBP	Intestino delgado	<b>Ileon, ovario</b> (mamíferos)	Sales biliares
<i>fabp7</i>	FABP7	BFABP	Cerebro	<b>Cerebro, células de la glia y retina</b> (mamíferos)	LCFA
<i>fabp8</i>	FABP8	MFABP	Células de la vaina de Mielina	<b>Cerebro y células de Schwann, bulbo olfativo, medula espinal.</b> (mamíferos)	LCFA
<i>fabp9</i>	FABP9	TFABP	Testículo	<b>Testículo,</b> glándula salival y mamaria (mamíferos)	LCFA
<i>fabp10</i>	FABP10	LbFABP	Hígado	<b>Hígado</b> (peces y aves)	LCFA, sales biliares, grupo hemo
<i>crbp1</i>		CRBP-I		<b>Hígado, riñón, Testículo, retina,</b> en menor medida en todos los otros tejidos, excepto Intestino	Retinol, retinaldehído, ác. retinóico
<i>crbp2</i>		CRBP-II		<b>Intestino</b>	Retinol, retinaldehído, ác. Retinóico
<i>crbp3</i>		CRBP-III		<b>Corazón, músculo esquelético, tejido adipocitos y glándulas mamas</b>	Retinol, retinaldehído, ác. Retinóico
<i>crabp</i>		CRABP			Ácido Retinóico

<sup>a</sup> Adaptado de Haunerland et al., 2004 y otros (Haunerland, *Progr. Lipid Res.* 2004; Storch, *Ann. Rev Nutr.* 2008; Piantadosi, *J. Biol. Chem* 2005; Li, *Annu. Rev. Nutr* 1996).

La expresión de miembros de la familia de las FABP ha sido verificada sólo en especies del reino animal, a diferencia de los pertenecientes a las familias de ACBP o SCP-2. Dentro de dicho reino, ha sido encontrada en especies pertenecientes a muchas clases de vertebrados como en numerosos invertebrados pertenecientes a diferentes *phyla* (*Santomé, Trends in Comparative Biochem. & Physiol. 1998; Haunerland, Biochim Biophys Acta. 1990; Alvite, Biochim Biophys Acta. 2001*).

Para la mayoría de las FABP, los genes han sido identificados y caracterizados y todos ellos presentan una estructura génica muy similar. La misma consiste en cuatro exones que varían en longitud pero presentan una posición similar dentro de la secuencia génica (*Glatz, Prog Lipid Res. 1996*). Esto sugiere la existencia de un gen ancestral para todas las FABP que habría dado origen a los distintos miembros conocidos en la actualidad mediante el proceso de duplicación génica (*Haunerland, Progr. Lipid Res. 2004*). Se ha propuesto que dicho gen ancestral habría surgido luego de la divergencia del grupo animal de aquellos de los hongos y las plantas; alrededor de 1.200-1.000 millones de años atrás, y que el mismo codificaría para una proteína capaz de unir numerosos ligandos hidrofóbicos. A partir de este gen ancestral, las FABP se habrían diversificado y especializado en su capacidad de unión de ligandos hidrofóbicos específicos, dando lugar a los distintos tipos de FABP (*Schaap, Mol Cell Biochem. 2002*). Esto da lugar a la idea de que la fuerza de selección podría haber sido, en parte, la necesidad de transportadores específicos para cada tipo de lípido. Considerando la estructura primaria, los miembros de esta familia muestran un moderado nivel de identidad de secuencia que varía entre un 20% y un 70% para un mismo organismo (**Tabla 1.2**) (*Banaszak, Adv Protein Chem. 1994*). Asimismo, cada tipo de FABP presenta una alta identidad de secuencia aminoacídica con sus ortólogos aislados de otros organismos dentro del grupo de los vertebrados. Por ejemplo, la FABP3 o HFABP (FABP de Corazón) presenta un porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre 85 y 96% al comparar las ortólogas humana, bovina, murina y de rata; mientras que la identidad de secuencia entre FABP3 y FABP1 (LFABP o FABP de Hígado) humanas es tan solo de un 27% (*Santomé, Trends in Comparative Biochem. & Physiol. 1998*). La identidad de secuencia disminuye si se comparan las

secuencias de los cDNA, pero se observa la misma relación entre la secuencia de nucleótidos.

**Tabla 1.2. - Identidad de secuencias de aminoácidos entre FABP <sup>a</sup>**

	AFABP	MFABP	KFABP	HFABP	IFABP	LFABP	CRBP-I
AFABP	100	67	51	64	28	22	36
MFABP		100	52	58	28	23	36
EFABP			100	46	23	18	27
HFABP				100	31	24	31
IFABP					100	24	29
LFABP						100	22
CRBP-I							100

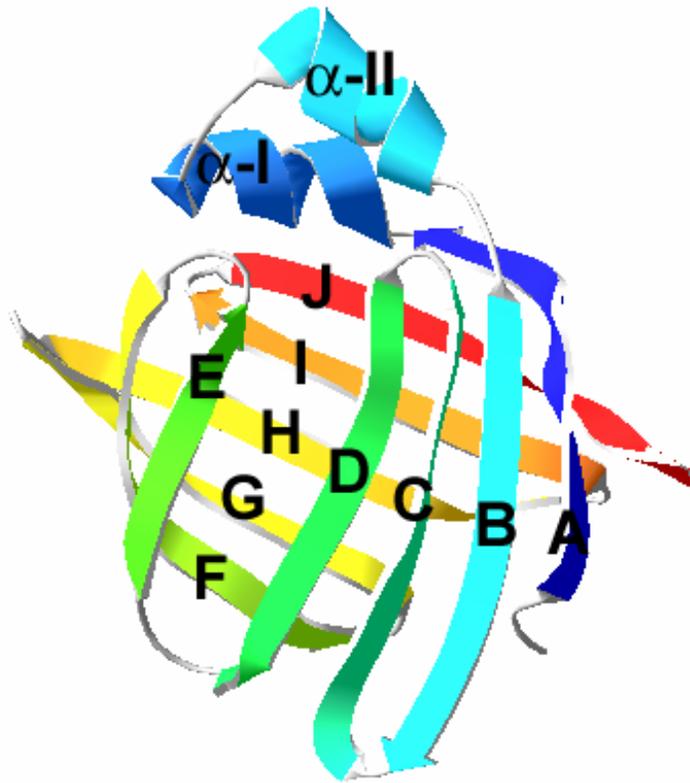
<sup>a</sup> Los porcentajes fueron calculados en base a una longitud promedio de 132 aminoácidos. Adaptado de Banaszak et al. (*Banaszak, Adv Protein Chem. 1994*).

El análisis evolutivo de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (*Huelsenbeck, Science 1997*) de los miembros de las FABP de vertebrados ha dado como resultado un árbol filogenético en el cual se distinguen claramente cuatro grupos o *clusters* (*Schaap, Mol Cell Biochem. 2002*). Estos grupos parecen reflejar la especificidad del tipo de ligando que unen los distintos miembros. El primer grupo está constituido por IBABP, LFABP y LbFABP, siendo sus principales ligandos LCFA, sales biliares, colesterol y grupo hemo. El segundo grupo incluye a las CRBP/CRABP y sus ligandos son los derivados de la vitamina A (retinol, ácido retinóico, etc.). El grupo más poblado es el que está compuesto por HFABP, AFABP, BFABP, KFABP, entre otros; y sus ligandos son principalmente LCFA, retinoides y eicosanoides. El último grupo está representado sólo por IFABP, que sólo presenta afinidad por un solo tipo de ligando, LCFA. Además, cabe destacar que la orientación de los FA es diferente dentro de cada *cluster* (*Hamilton, Prog Lipid Res. 2004*). Se estima que la primera duplicación del gen ancestral se habría producido aproximadamente hace 930 millones de años (*Santomé, Trends in Comparative Biochem. & Physiol. 1998*) generándose los dos primeros grandes grupos de FABP; uno de ellos incluía a

IFABP y las relacionadas a LFABP. Se ha propuesto que la separación entre el grupo de LFABP e IFABP ocurrió aproximadamente 630 millones de años atrás, antes incluso del surgimiento del grupo de los vertebrados (*Chan, J. Biol. Chem. 1985*).

### **1.4.2. - Características estructurales de las FABP**

A pesar del amplio rango de identidad de secuencia que se observa entre los distintos miembros de la familia de FABP, la característica estructural principal de este grupo de proteínas es una estructura tridimensional muy bien conservada, que resulta ser prácticamente superponible. La misma consiste en 10 cadenas  $\beta$  antiparalelas (nombradas desde  $\beta A$  hasta  $\beta J$  desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal) y dos  $\alpha$ -hélices cortas que se ubican entre  $\beta A$  y  $\beta B$  (denominadas  $\alpha$ -I y  $\alpha$ -II) (**Figura 1.1**). Las 10 cadenas se orientan en un motivo “*up-and-down*” y se agrupan en dos hojas- $\beta$  (de 5 cadenas cada una) que se enfrentan en forma casi perpendicular formando un barril- $\beta$  que encierra una cavidad central comprendiendo el sitio de unión de ligandos. Las  $\alpha$ -hélices forman un motivo hélice-giro-hélice que conecta las cadenas  $\beta A$  y  $\beta B$ ; mientras que el resto de las cadenas se unen por giros- $\beta$  entre sí. Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un dominio único que presenta un radio de giro promedio de 14 Å (*Banaszak, Adv Protein Chem. 1994*).



**Figura 1.1 – Estructura común de las FABP.** (Página siguiente) Modelo tridimensional de IFABP de rata basado en datos de cristalografía de Rayos-X en su forma holo (código pdb:1ICN). Se indica la nomenclatura de los elementos de estructura secundaria.

La cavidad que se observa en la estructura cristalográfica de estas proteínas es inusualmente grande para el tipo de ligandos que debe unir. El fondo del interior del barril contiene un núcleo de residuos hidrofóbicos y, aunque las secuencias no se conservan, la naturaleza hidrofóbica de estos residuos se mantiene, por lo que se cree dirigen el plegamiento de estas proteínas. A la vez, la parte superior del interior del barril- $\beta$  contiene un gran número de residuos hidrofílicos que se hallan involucrados en distintas redes de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Éstos, junto con el gran número de puentes de hidrógeno superficiales dan una enorme estabilidad a la estructura terciaria de las FABP (Thompson, *Mol Cell Biochem.* 1999). A estas interacciones se le suma un conjunto de moléculas de agua que intervienen también en la estabilidad de la estructura terciaria formando puentes de moléculas de solvente que forman dos o más puentes de Hidrógenos con los residuos de la proteína (Likić, *Protein Sci.* 2000; Likić, *Proteins* 2001). Otra característica que vale la pena mencionar es que

las hélices  $\alpha$ -I y  $\alpha$ -II son de la misma longitud en todas las FABP, y el motivo hélice-giro-hélice tiene una orientación tal que le permitiría funcionar como una “tapa” del barril- $\beta$ . Además, es de resaltar que las  $\alpha$ -I de IFABP, AFABP y HFABP tienen un fuerte carácter anfipático, con su cara hidrofóbica mirando hacia el interior del barril.

La cavidad interna total es de unos 850 Å<sup>3</sup>. Si consideramos las moléculas de agua internas, estas ocupan aproximadamente la mitad de este volumen. Sin embargo, la cavidad parece bastante inaccesible para los ligandos (*Scapin, J.Biol.Chem 1992*). Cuando se analizan las estructuras cristalográficas de las FABP, estas presentan aperturas por las cuales se podrían intercambiar moléculas de solvente; pero ninguno de estos “poros” parece ser lo suficientemente amplio como para permitir el pasaje de un FA sin que ocurra un cambio conformacional bastante importante (*Banaszak, Adv Protein Chem. 1994*). Además, todas las cadenas adyacentes del barril- $\beta$  están conectadas entre sí por puentes de hidrógeno, excepto las cadenas  $\beta$ D y  $\beta$ E que definen una hendidura en el barril que podría actuar como una puerta hacia el interior de la cavidad. Sin embargo, esta apertura tampoco parece actuar como el lugar de entrada/salida para los ligandos sin un cambio conformacional.

Por todo lo expuesto anteriormente, se ha sugerido que debería existir un movimiento concertado de varios elementos estructurales que permita la entrada/salida de los ligandos. La naturaleza de este cambio conformacional, sin embargo, es hasta el momento desconocida. Una posible explicación estaría dada por la hipótesis del “Dominio Portal”. Esta propone que la entrada del ligando al sitio de unión de las FABP tiene lugar a través de un área dinámica de la estructura nativa de estas proteínas. Basados en el análisis de las estructuras cristalográficas y de NMR de las formas apo- y holo- de IFABP, el “Dominio Portal” estaría constituido por los residuos de la hélice  $\alpha$ -II y los  $\beta$ -giros entre  $\beta$ C y  $\beta$ D, y  $\beta$ E y  $\beta$ F (*Sacchetti, J. Mol Biol. 1989; Sacchetti, Proc. Natl. Acad. Sci. 1989; Friedman, Biophys. J. 2006*). En las estructuras obtenidas por Rayos X, si bien los esqueletos de carbonos- $\alpha$  de ambas formas son casi superponibles, la forma apo- se encuentra en un estado un poco más expuesto al solvente que la

forma holo- (*Scapin, J.Biol.Chem 1992; Sacchettini, j. Biol. Chem. 1992*). Las estructuras en solución, obtenidas por NMR permiten observar, en concordancia con las observaciones anteriores, que la apo-IFABP posee una región discreta de desorden en la región C-terminal de la hélice  $\alpha$ -II y los giros entre las cadenas  $\beta$ C- $\beta$ D y  $\beta$ E- $\beta$ F, en comparación con la forma holo (*Hodsdon, Biochemistry 1997*). En base a estos resultados, se cree que IFABP posee un “Dominio Portal”, una región flexible capaz de ordenarse y desordenarse, y que posibilitaría la entrada/salida del ligando por la parte superior del barril- $\beta$  mediante un cambio conformacional en el que participarían, por lo menos, los elementos antes mencionados.

Sin embargo, estudios recientes *in silico* por Dinámica Molecular han sugerido posibles mecanismos diferentes para la unión de los ligandos a las FABP. Estos proponen puntos de entrada a través de distintas regiones de la estructura de las FABP. Por ejemplo, se observó que para el caso de AFABP la hendidura entre  $\beta$ D y  $\beta$ E se abre para permitir la entrada de ácido palmítico (*Friedman, Biochemistry 2005*). Algo similar ocurre para la LbFABP pero a través de Dominio Portal (*Tsfadia, FEBS Letters 2007*). Por otro lado, no ocurrió lo mismo cuando se intentó repetir el ensayo para IFABP, incluso orientando el ligando inicialmente cerca del Dominio Portal o de la hendidura del barril- $\beta$  (*Friedman, Biophys. J. 2006*).

### **1.4.3. - Funciones biológicas asociadas a las FABP**

A pesar de la abundante información disponible sobre la estructura, estabilidad, distribución tisular y propiedades de unión de ligando de las FABP, aún no está claro cuáles son las funciones específicas que estas proteínas desempeñan *in vivo*. Sin embargo, es de esperar que las SLBP tengan en general un importante impacto sobre todos aquellos procesos en los que participan los lípidos que son capaces de unir. De hecho, en los últimos años se han propuesto una serie de funciones para las FABP (*Glatz, Prog Lipid Res. 1996; Hertzell, Trends Endocrinol Metab. 2000; Haunerland, Prog Lipid Res. 2004; Stroch, Annu Rev Nutr 2008*), como por ejemplo:

- Selección, unión, solubilización, transporte y compartimentalización de lípidos en el citoplasma.
- Unión de grupos hemo, bilirrubina, prostaglandinas, sales biliares, hepatocarcinógenos, etc., además de LCFA (LFABP y LbFABP).
- Cofactores en reacciones que utilizan FA o sus formas activadas como sustrato o como moduladores de las enzimas intervinientes.
- Transporte vectorial de lípidos hacia estructuras subcelulares o rutas metabólicas específicas.
- Regulación de los procesos de mitosis, proliferación y diferenciación celular.
- Participación en mecanismos de transducción de señales, incluyendo la regulación de la expresión génica mediada por retinol y ácido retinóico (CRABP y CRBP) pero también por FA u otros lípidos (LFABP).
- Protección contra los efectos deletéreos que presentan las altas concentraciones de FA y sales biliares libres en el citoplasma celular.

A partir de este punto, nos enfocaremos específicamente en los estudios previos que aportan evidencias sobre las posibles funciones específicas de las FABP que se coexpresan en enterocitos, IFABP y LFABP.

#### **1.4.4. - FABP intestinales**

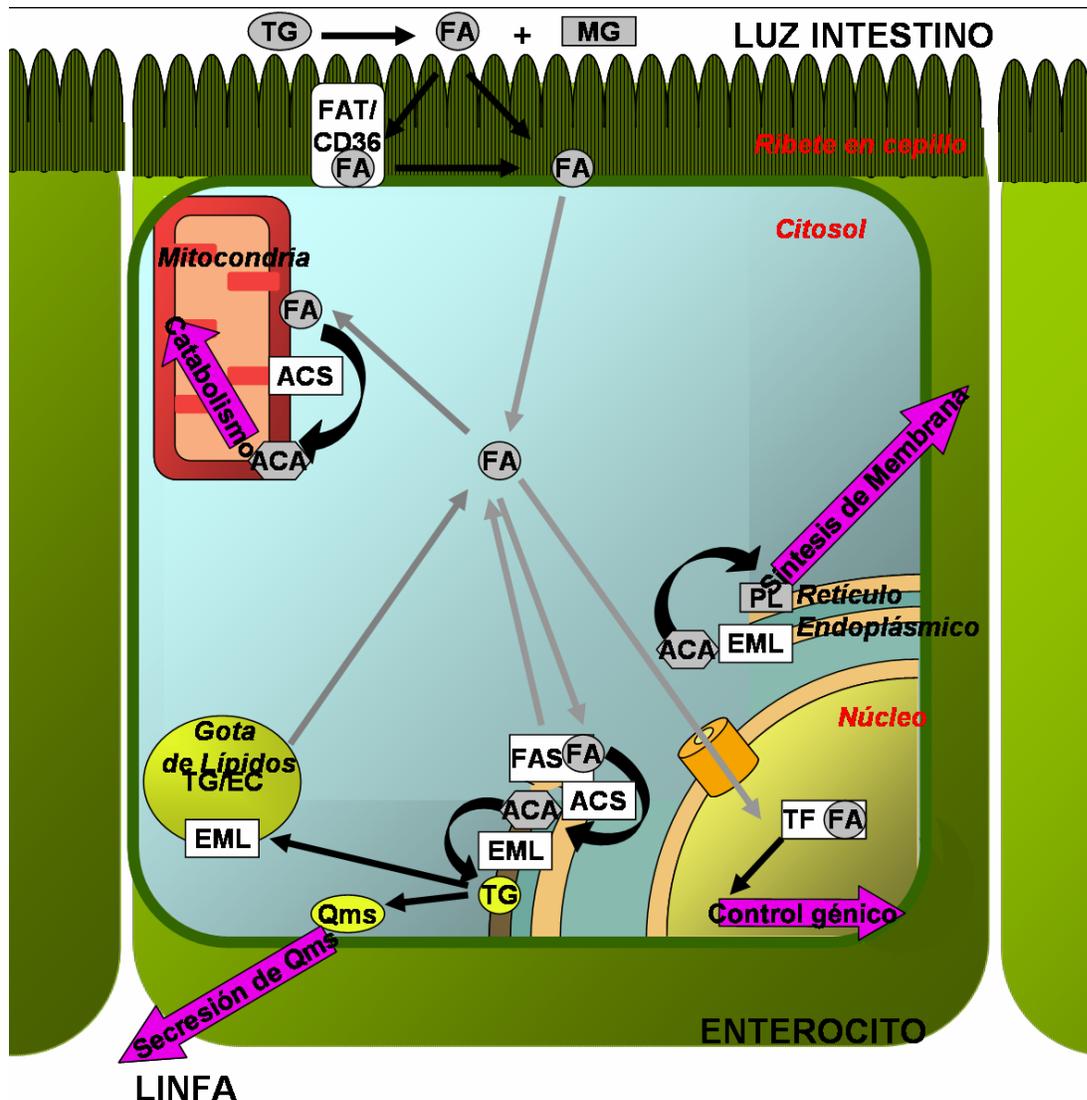
El intestino delgado tiene la función de asimilar los nutrientes provenientes de la dieta que se han hidrolizado con ayuda de las secreciones del hígado y el páncreas. Los hidratos de carbono son reducidos a disacáridos, las proteínas a aminoácidos, y los lípidos son emulsionados e hidrolizados a MG, FA y esteroides libres, moléculas que pueden ser absorbidas por la mucosa. Los lípidos de la dieta están constituidos principalmente por TG, EC y PL y forman micelas con las sales biliares, que actúan como detergentes y de este modo se incrementa enormemente la exposición de los lípidos a la acción de las lipasas en el entorno acuoso de la luz intestinal. El 2-MG y los FA libres son generados por la acción de la Lipasa Pancreática sobre los TG ingeridos con la dieta. Una vez asimilados, son reestirificados a TG y, en mucha menor medida, a PL y EC, para luego ser

secretados a la linfa como Quilomicrones (*Nelson, Lehninger's Principles of Biochemistry 2005*).

Los enterocitos, según se cree hasta la actualidad, incorporarían FA libres empleando dos mecanismos de transporte, a través de la membrana apical, que coexisten: un transporte facilitado de alta afinidad y una difusión pasiva que actúa a concentraciones mayores de FA. La absorción de los FA por el enterocito ha sido históricamente interpretada como un proceso de difusión simple a través de la membrana plasmática, pero trabajos recientes han demostrado la existencia de un conjunto de proteínas de membrana que estarían facilitando su asimilación. Algunas de estas proteínas que se han caracterizado son la pmFABP, FAT/CD36 (de sus siglas en inglés *Fatty Acid Traslocase* ó *Cluster Domain 36*) y la proteína transportadora de ácidos grasos 4 (FATP4, *Fatty Acid Transporter 4*). Más aún, trabajos realizados en las líneas celulares IEC-6 y Caco-2 han demostrado una cinética saturable de incorporación de FA al citoplasma para el caso de LCFA así como para el 2-MG (*Murota, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001, Murota, J. Nutr. 2005; Trotter, J. Lipid Res. 1996*). Ambos tipos de mecanismos de incorporación propuestos para los principales productos de la digestión de TG en el intestino, ocurrirían simultáneamente a altas concentraciones de FA y MG (*Murota, J. Nutr. 2005*).

Los enterocitos pueden resintetizar TG que son incorporados en los Quilomicrones, junto con PL, Colesterol libre y EC. Estas lipoproteínas pasan al sistema linfático al ser secretados por la cara basolateral de los mismos, llegan al torrente sanguíneo y así son puestos a disposición del resto de los tejidos que remueven sus componentes lipídicos (*Nelson, Lehninger's Principles of Biochemistry 2005*).

A modo de resumen de los datos presentados hasta el momento, la **Figura 1.2** muestra esquemáticamente la asimilación de FA a nivel del epitelio absortivo intestinal.



**Figura 1.2. - Esquema de metabolismo de FA en enterocitos.** Los FA que provienen de la hidrólisis de TG dietarios se incorporan en los enterocitos por dos mecanismos, uno mediado por proteínas de membrana y una difusión simple, para luego ser oxidados en la mitocondria o incorporados en PL y TG por distintas enzimas del metabolismo lipídico (EML), previa activación a acil-CoA (ACA) por las ACS. Los niveles de FA citoplasmáticos también pueden tener un efecto sobre la expresión de genes mediante la unión a factores de transcripción (TF).

Estudios realizados en células en cultivo y en animales enteros han permitido observar que los enterocitos pueden absorber FA desde la cara basolateral, además de hacerlo desde la luminal o apical (Gangl, *J Clin Invest.* 1975; Ho, *J. Biol. Chem.* 2002; Storch, *J. Lipid Res.* 2008). Además, los FA incorporados por vías diferentes son metabolizados de manera diferencial. Mientras que los FA incorporados por la cara luminal del intestino son

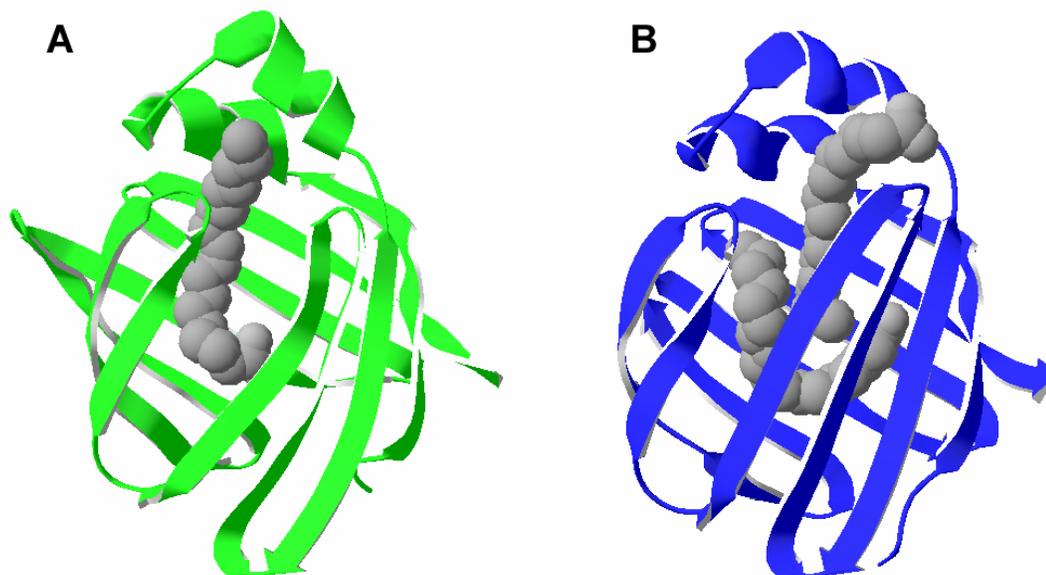
principalmente incorporados en TG, los FA incorporados a través de la cara basolateral son principalmente utilizados en la  $\beta$ -oxidación o en la producción de PL de membrana. Esta es una condición única inherente al epitelio intestinal y ha sido poco estudiada, pero se supone que las FABP intestinales podrían estar cumpliendo un papel crítico al respecto.

El intestino delgado de mamíferos expresa cuatro proteínas de la familia de las FABP: IFABP, LFABP, CRBP-II e IBABP. Si bien la distribución de las mismas se superpone, cada una presenta un patrón de expresión característico a lo largo del intestino delgado. Se comprobó que, en ratones, el mRNA de LFABP se detecta en los dos tercios proximales del intestino delgado; mientras que el mRNA de IFABP está presente en toda la longitud del órgano, con un máximo de expresión en la porción media, y el mRNA de IBABP está presente solamente en la porción distal o íleon (*Agellon, Mol Cell Biochem. 2002*). CRBP-II en particular es exclusivo del epitelio intestinal. De esta forma, gran parte de los enterocitos coexpresan, de manera abundante (hasta un 5% de las proteínas citosólicas), LFABP e IFABP, los únicos miembros de la familia presentes en intestino con capacidad de unir LCFA. Sin embargo, el mismo perfil de distribución no se repite en todos los mamíferos y en particular en humanos (*Maurice, Clin. Biochem. 2003*) Se supone que estas proteínas participan en el transporte y procesamiento intracelular de la gran cantidad de FA absorbida desde la dieta. Pero, hasta la actualidad, se desconoce por qué un único tipo celular necesita de la expresión conjunta de dos tipos de FABP con características tan similares.

Se han registrado una serie de diferencias entre IFABP y LFABP en cuanto al patrón de expresión de sus genes, a sus características estructurales, al número y tipo de ligandos capaces de unir en la cavidad del barril, y a la afinidad que manifiestan por los mismos. Para empezar, la distribución tisular de LFABP e IFABP es diferente (**Tabla 1.2**). LFABP se expresa tanto en hígado como en el intestino delgado, riñón, pulmón y páncreas; mientras que IFABP lo hace casi exclusivamente en intestino delgado, sólo en condiciones no fisiológicas también en hígado y a niveles más bajos que LFABP (*Bass, Int Rev Cytol. 1988*). A pesar de que IFABP y LFABP presentan un bajo nivel de identidad de secuencia (24%)

(*Banaszak, Adv Protein Chem. 1994*), los elementos de estructura secundaria son idénticos, con la excepción de que la hélice  $\alpha$ -I de IFABP tiene un fuerte carácter anfipático. Además LFABP presenta una región más laxa en el barril por la falta de la malla de puentes de hidrógeno que se forman entre  $\beta$ F y  $\beta$ G. En comparación con el resto de los miembros de la familia el giro- $\beta$  entre  $\beta$ G y  $\beta$ H tiene dos residuos menos. Así, sólo LFABP presenta una segunda hendidura en el barril- $\beta$  además de la existente entre  $\beta$ D y  $\beta$ E (*Thompson, Mol Cell Biochem. 1999*).

La cavidad hidrofóbica de LFABP es la más grande dentro de la familia de proteínas y presenta un volumen aproximado de  $610 \text{ \AA}^3$  (descontando el que ocupan las moléculas de solvente). Por otra parte, la cavidad de IFABP es mucho menor presentando un volumen aproximado de  $353 \text{ \AA}^3$ . Estas diferencias en el volumen de la cavidad probablemente sean las responsables de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que unen cada una de estas proteínas. La especificidad y afinidad por los distintos ligandos también se analizó, demostrando que LFABP presenta el rango más amplio de ligandos dentro de la familia de las FABP. LFABP puede ligar LCFA con muy alta afinidad, grupos hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (*Thompson, Mol Cell Biochem. 1999*). Por el contrario, IFABP es capaz de unir exclusivamente un LCFA, cuyo carboxilato interacción con la Arg<sup>106</sup>. Además, IFABP puede unir sólo una molécula de FA, mientras que LFABP presenta una estequiometría 2:1, única en la familia con esta característica (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3. – Unión de FA a FABP intestinales.** Se muestra la orientación de ácidos grasos en IFABP (**A**, verde) y LFABP (**B**, azul). Se observa que la orientación que presenta el oleato unido a IFABP es distinta a la de ambas moléculas unidas a LFABP. Se distingue bien que el ligando en posición 2 en LFABP está mucho más expuesto al solvente que el de la posición 1. Las estructuras están basadas en la estructura obtenida para cada proteína en sus formas holo (códigos pdb: 1ICN y 1LFO, respectivamente).

Estudios de afinidad de competencia con la sonda fluorescente ADIFAB por distintos FA demostraron que las constantes de disociación para toda la familia de FABP es submicromolar (*Richieri, J Biol Chem. 1994*). La IFABP mostró la mayor variación de los valores de  $K_D$  de acuerdo a las características del FA analizados (largo de la cadena hidrocarbonada y número de insaturaciones), observándose valores de  $K_D = 6$  nM para el ácido esteárico hasta  $K_D = 480$  nM para el ácido linolénico. De este modo, la IFABP presenta mayor afinidad por LCFA saturados y la afinidad disminuye con el aumento del número de insaturaciones y, por ende, con su mayor solubilidad en agua. LFABP, por otra parte, mostró una gran afinidad tanto por LCFA saturados como por los insaturados, variando su afinidad desde  $K_D = 9$  nM para el ácido esteárico hasta  $K_D = 69$  nM para el ácido linolénico para el sitio de mayor afinidad. El segundo sitio de unión descrito para LFABP se ubica más superficialmente en el barril y muestra también alta afinidad por los distintos ligandos. La afinidad resulta equivalente en el caso de los FA saturados, pero 10 veces más débil para los insaturados que los observados para el primer sitio (*Richieri, J Biol Chem. 1994*).

Teniendo en cuenta estas diferencias, se ha propuesto que IFABP y LFABP desempeñarían funciones diferentes dentro del enterocito, tal vez contribuyendo al transporte vectorial y a la compartimentalización de los lípidos.

### **1.4.5. - Estudios funcionales de IFABP y LFABP**

La caracterización más exhaustiva de las FABP proviene de los ensayos de transferencia de ligandos hacia membranas fosfolípicas modelo. Mediante el empleo de un ensayo de transferencias de energía de resonancia Föster (FRET, de sus siglas en inglés *F*öster *R*esonance *E*nergy *T*ransfer) se monitorea directamente la transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA, de *A*nthroyl*O*xy-*F*atty *A*cids) (análogos fluorescentes de los ligandos naturales) desde las FABP hacia membranas unilamelares pequeñas (SUV, de *S*mall *U*nilamellar *V*esicles), que contienen NBD-PC como aceptor FRET (*Storch, Mol. Cell Biochem. 1990*), se han caracterizado gran parte de los miembros de la familia de FABP en cuanto a sus propiedades de transferencia de ligandos. Estos estudios han permitido definir dos subgrupos dentro de la familia de las FABP. Por un lado se reconocen las proteínas “difusionales” como la LFABP, LbFABP o CRABPII, ya que muestran un mecanismo de transferencia de ligandos cuyo paso limitante parece ser la disociación del ligando hacia el medio acuoso. Por otro lado, el resto de las FABP presenta un comportamiento de tipo “colisional”, ya que en este caso, el paso limitante sería la interacción del complejo proteína/ligando con la membrana aceptora.

El análisis comparativo entre IFABP y LFABP ha permitido detectar marcadas diferencias entre estas proteínas (*Hsu, J Biol Chem. 1996; Thumser, J Lipid Res. 2000*). En principio, la velocidad absoluta de transferencia de AOFA hacia membranas modelo es mayor desde IFABP que desde LFABP. Más aún, el mecanismo aparente de transferencia de FA en estas dos proteínas es diferente. Mientras que la transferencia de FA desde IFABP pareciera ocurrir mediante la colisión directa del complejo proteína/ligando con la bicapa fosfolípica, la transferencia desde LFABP estaría de acuerdo con un mecanismo

mediado por la difusión acuosa del ligando hacia la membrana. Estos resultados, apoyan la idea de que estas dos FABP podrían estar desempeñando funciones diferentes dentro del enterocito, regulando el transporte de los FA y, por ende, su utilización. La primera idea es que LFABP podría estar funcionando como un buffer citosólico de la concentración de FA libres, mientras que IFABP podría estar involucrada en el transporte vectorial de los FA desde y hacia estructuras subcelulares o vías metabólicas específicas.

Los resultados anteriores señalan en forma indirecta la Interacción de IFABP con membranas. Empleando una variante de IFABP que carece de la región  $\alpha$ -helicoidal (Helixless IFABP o IFABP-HL) (*Cistola, Biochemistry 1996*), se ha demostrado la importancia crítica del dominio  $\alpha$ -helicoidal en su interacción física con membranas y en su mecanismo colisional de transferencia de FA (*Córsico, Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, Wu, Biochemistry 2001*). Además la construcción de proteínas quiméricas en las que se intercambiaron las porciones N-terminal ( $\beta$ A y  $\alpha$ -I o el motivo hélice-giro-hélice completo) entre IFABP y LFABP, ha permitido corroborar que el dominio  $\alpha$ -helicoidal de ambas FABP es responsable del mecanismo característico de transferencia de ligandos respectivo (*Córsico, Biochemistry 2004, Franchini, Biochem Biophys. Acta 2008*).

Asimismo, se ha comprobado que la interacción de IFABP con membranas durante la transferencia de ligandos tiene un fuerte componente electrostático, que se ve intensificado cuando se emplean vesículas aceptoras con carga neta negativa, debido a la incorporación de Fosfatidilserina (PS, de sus siglas en inglés *Phosphatidyl-Serine*) o Cardiolipina (CL) en las vesículas zwitteriónicas de referencia de PC (*Hsu, J Biol Chem. 1996; Thumser, J Lipid Res. 2000*). Esto nos lleva a pensar que las cargas positivas en la superficie de la proteína serían relevantes para el mecanismo de transferencia colisional de IFABP. Más aún, la acetilación completa de los residuos de Lisina (Lys o K) ha permitido corroborar esta hipótesis y ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas tendrían su participación junto con las electrostáticas, posiblemente debido a la intervención de residuos superficiales no polares expuestos al solvente en la hélice  $\alpha$ -II o a la naturaleza anfipática de la hélice  $\alpha$ -I (*Córsico, J. Lipid Res. 2005*).

Los resultados anteriores *in vitro* han sido ampliados por ensayos a nivel celular. Se han alterado los contenidos celulares de IFABP y LFABP en células en cultivo por técnicas de biología molecular. La sobreexpresión de LFABP en fibroblastos de ratón, por ejemplo, provocó un incremento del 50 % en la absorción de los FA y una rápida reestirificación a TG y PL (*Prows, Lipids 1995*). Por otra parte, la sobreexpresión de IFABP en fibroblastos de ratón no provocó cambios en la absorción de los FA pero se observó un incremento en los niveles citoplasmáticos de TG y CE (*Prows, Lipids 1995; Prows, Chem Phys Lipids 1996*). Sin embargo, la sobreexpresión de IFABP en células embrionarias resultó en un aumento de la absorción de FA (*Atshaves, Am J Physiol. 1998*).

Por otro lado, la línea celular Caco-2 representa un modelo muy particular para el estudio de las FABP ya que son el modelo predilecto para estudiar el metabolismo a nivel intestinal debido a que expresan muchos de los marcadores específicos de los enterocitos normales. Sin embargo, a diferencia de lo observado en enterocitos normales, donde tanto IFABP como LFABP son expresadas abundantemente y en concentraciones equivalentes, las células Caco-2 expresan cantidades muy bajas de IFABP y sólo en condiciones especiales de crecimiento, mientras que los niveles son casi normales para LFABP (*Le Beyec, Exp. Cell Res. 1997*). La sobreexpresión en estas células del polimorfismo natural en humanos Thr<sup>54</sup>-IFABP (o A54T-IFABP), que posee mayor afinidad por los ligandos *in vitro*, repercutió en un notable incremento del transporte de LCFA y de la secreción de TG en comparación con las mismas células que sobreexpresaban la proteína salvaje (Ala<sup>54</sup>-IFABP o wtIFABP) (*Baier, J Clin Invest. 1995; Baier, J Biol Chem. 1996*). Más aún, la sobreexpresión de IFABP en células Caco-2, da como resultado una menor incorporación de FA, cambios en el patrón de marcadores de diferenciación y una inhibición de la proliferación celular (*Darimont, J. Lipid Res. 2000*), por lo que se ha propuesto que la IFABP participaría en el proceso de diferenciación de enterocitos. Finalmente, estudios de sobreexpresión de IFABP en un cultivo primario de epitelio intestinal humano no reportaron diferencias en la esterificación de lípidos, la síntesis de lipoproteínas, o el ensamblaje de lipoproteínas (*Montoudis, Biochem Biophys Res Commun. 2006*). Como se puede observar, los resultados

no son concluyentes y de difícil interpretación. En particular, no está claro aún si las diferencias observadas se deben a diferencias propias de las distintas líneas de cultivo empleadas para los ensayos, a una variabilidad clonal o realmente al efecto de IFABP en cada una de ellas (*Stroch, Annu Rev Nutr 2008*).

El rol específico que cumplirían cada una de las FABP intestinales también se ha estudiado en organismos vivos. La primera evidencia *in vivo* a favor de esta hipótesis es el ya mencionado patrón de expresión característico de cada uno observado a lo largo del eje céfalo-caudal del intestino delgado de mamíferos (*Poirier, Am J Physiol. 1997*), así como del eje cripta-vellosidad (*Shields, J. Lipid Res. 1986; Halldén, J. Biol. Chem. 1997*) en el cual se observa un aumento de la expresión de las FABP conforme la célula se diferencia en su trayectoria hacia el extremo de la vellosidad. Por otro lado, la expresión de LFABP también es importante en el hígado en relación con la alta metabolización de FA de dicho órgano (*Bass, Mol Cell Biochem. 1990*). Alteraciones en la actividad del metabolismo lipídico, ya sea producto de diversas patologías o manipulaciones experimentales, generalmente coinciden con cambios similares en el contenido de FABP del tejido (*Glatz, Prog. Lipid Res. 1996*). Así, por ejemplo, el incremento del aporte lipídico de la dieta resulta en un marcado incremento del contenido de las FABP expresadas en hígado, intestino, corazón y riñón en ratones (*Veerkamp, Biochim Biophys Acta. 1991*).

En algunos individuos de la población aborigen Pima de Norteamérica, se observó una alta tasa de oxidación de grasas que fue correlacionada con la incidencia del polimorfismo Thr<sup>54</sup>-IFABP (*Baier, J Clin Invest. 1995*). También se ha asociado este polimorfismo a altos niveles de colesterol en sangre, incidencia de ataques cardíacos, altos niveles de TG en ayuno y durante el período postprandial, resistencia a la insulina y altas concentraciones de FA libres en circulación (*Baier, J Biol Chem. 1996; Baier, J Clin Invest. 1995; Carlsson, J Clin Endocrinol Metab 2000; Georgopoulos, J Clin Endocrinol Metab. 2000; Weiss, Physiol Genomics. 2002; Pratley, J Lipid Res. 2000*). Estos hallazgos sugieren que el cambio de afinidad de IFABP debido al reemplazo de Ala<sup>54</sup> por Thr<sup>54</sup>, afectaría el metabolismo lipídico del enterocito ya que participaría en la absorción y metabolización de los FA en el intestino, lo que tendría un impacto sobre la

disponibilidad de lípidos a nivel sistémico. Sin embargo, un estudio reciente realizado en Mendoza (Argentina) y enmarcado en el Programa Regional de Prevención Cardiovascular, no logró comprobar la existencia de una correlación significativa entre este polimorfismo y factores de riesgo cardiovascular (*Gomez, BMC Med Genet. 2007*). Sin embargo, en individuos con otros factores de riesgo, como el alcoholismo crónico, la incidencia del polimorfismo T54A sí podría tener un rol relevante (*Salguero, Hepatol Res. 2005*), y más estudios son necesarios.

Una de las técnicas empleadas más recientemente para evaluar el rol *in vivo* de las FABP es la ablación del gen que codifica para la proteína en cuestión en el embrión. De esta manera se generan ratones *knock-out* o *null* para la expresión de una proteína en particular. Ninguno de los ratones *null* para las FABP construidos hasta el momento ha resultado ser embriológicamente no viable, lo que nos da cuenta de que, al menos durante el desarrollo embrionario, la expresión de las FABP no es indispensable. La ablación del gen que codifica para LFABP en ratones (ratones LFABP<sup>-/-</sup>) (*Martin, J. Biol. Chem. 2003; Newberry, J. Biol. Chem. 2003*) no ha dado como resultado alteraciones de apariencia, morfología, viabilidad u otras modificaciones fenotípicas sustanciales en estos animales respecto a las cepas salvajes, a menos que se sometan a situaciones de stress como ayuno prolongado. Los niveles totales de los lípidos hepáticos, FA no esterificados y TG se mantuvieron en sus valores normales. No obstante la capacidad de unión de FA por parte del citosol de las células hepáticas se vio significativamente reducida. Se ha observado una reducción de la absorción de FA del plasma sanguíneo y una clara reducción de los depósitos intracelulares de TG. Por otra parte, luego de 48 horas de ayuno la absorción de TG y su oxidación, así como también los niveles de colesterol fueron mucho menores para la línea knock-out con respecto a la cepa salvaje (*Newberry, J. Biol. Chem. 2003*). Otros estudios, en los cuales la cepa knock-out fue alimentada con una dieta estándar, una cetogénica o una diabetogénica dieron resultados muy similares a los descriptos anteriormente. En todos los casos se observaron tasas de oxidación de FA mucho más bajas que para la cepa salvaje en idénticas condiciones (*Erol, FASEB J. 2004*).

En el caso de los ratones *null* para IFABP (IFABP<sup>-/-</sup>), se demostró claramente que IFABP no es esencial para la absorción de la grasa de la dieta (Vassileva, *FASEB J.* 2000). Los ratones demostraron ser viables y fértiles. La característica más llamativa fue la diferencia de peso corporal de los machos IFABP<sup>-/-</sup> en relación con machos de la cepa salvaje; que no se observa entre las hembras. Para ambos sexos se observa un incremento de la concentración de insulina en sangre, aún con niveles normales de glucosa. Estudios más recientes mostraron que la pérdida de IFABP lleva a un aumento de la expresión de los genes *fabp1* (LFABP) y *fabp6* (IFABP), en machos y en hembras, lo que estaría indicando un posible efecto compensatorio atenuando los posibles efectos de la ablación de IFABP (Agellon, *Mol Cell Biochem.* 2006). También vale la pena mencionar que, a pesar de su abundante expresión en enterocitos, la ausencia de IFABP no determinó cambios drásticos en la morfología del tejido.

El intestino, como el hígado o el tejido adiposo, son los órganos en los que el metabolismo lipídico posee mayor complejidad. El estudio de proteínas asociadas con el metabolismo de estos órganos, no sólo proveerá información acerca de la bioquímica de los lípidos, sino que además puede establecer nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabolismo de lípidos en intestino, como problemas malabsortivos. Teniendo en cuenta la relación que se ha establecido recientemente entre la AFABP y procesos de señalización intracelular e inflamación (Cao, *Cell* 2008), también habrá que prestar atención a la posible conexión de IFABP y LFABP con este tipo de procesos en el enterocito.

## **1.5. - Proteína Transportadora de Esteroles tipo 2 (SCP2)**

El dominio proteico conocido como SCP-2 está presente en una familia multigénica de proteínas presentes en todos los reinos de la vida. Originalmente la proteína SCP-2 de mamíferos se denominó proteína transportadora de lípidos no específica debido a su gran diversidad de ligandos. Pero, finalmente, se impuso su denominación como proteína transportadora de esteroides en la bibliografía, a pesar de su amplia capacidad de unir lípidos: esteroides, isoprenoides, PL, lisofosfolípidos, etc. Aún más, recientemente se ha comprobado la capacidad de unir LCFA y Acil-CoA con afinidades similares a las FABP y ACBP. Además, el dominio SCP-2 forma parte de un conjunto de proteínas multidominio, enzimas relacionadas al metabolismo de FA presentes, en particular, en el compartimiento peroxisomal.

### **1.5.1. - Evolución y diversidad de las SPC-2**

En animales y un gran número de eucariotas, el dominio SCP-2 está fusionado normalmente como el dominio del extremo C-terminal de un conjunto de proteínas multidominio. Por ejemplo, en humanos hay cuatro genes que incluyen este dominio en las proteínas que codifican: *scpx*, *hsd17B4*, *hSDL2* y *stoml1*; pero en plantas y hongos, también existe un gen que codifica para una proteína que no posee este dominio SCP-2 fusionado a otros. Los últimos tres genes humanos codifican para una serie de proteínas relacionados al metabolismo de FA y demás lípidos (*Adamski, Biochem J. 1995; Leenders Mamm Genome. 1998; Dai Biochem Genet. 2003; Seidel, Gene 1998*). Así, el dominio SCP-2 es expresado como una parte integral (el dominio C-terminal) de las proteínas DBP (80 kDa), HSDL2 (45 kDa) y STOML1 (43 kDa).

Por otro lado, el gen *scpx* (o también llamado *scp2*) codifica para la proteína SCP-x (58 kDa) que posee un dominio con actividad 3-cetoacil-CoA tiolase fusionado al dominio C-terminal SCP-2 (*Ohba, Genomics. 1994*). Esta proteína cataliza el último paso de cada ciclo de  $\beta$ -oxidación. Gracias a la existencia de un promotor alternativo en el gen *scpx*, se expresa

independientemente la proteína pro-SCP-2, que consiste en prácticamente el dominio SCP-2 como una proteína aislada (Ohba, *Biochemistry* 1995), que incluye la secuencia de localización peroxisomal PTS1, más una secuencia N-terminal de unos 30 aminoácidos que es removida durante su maduración. Así, en mamíferos, el 100% de la SCP-2 citosólica se obtiene por proteólisis postraduccional de los productos de transcripción alternativos del *scpx*.

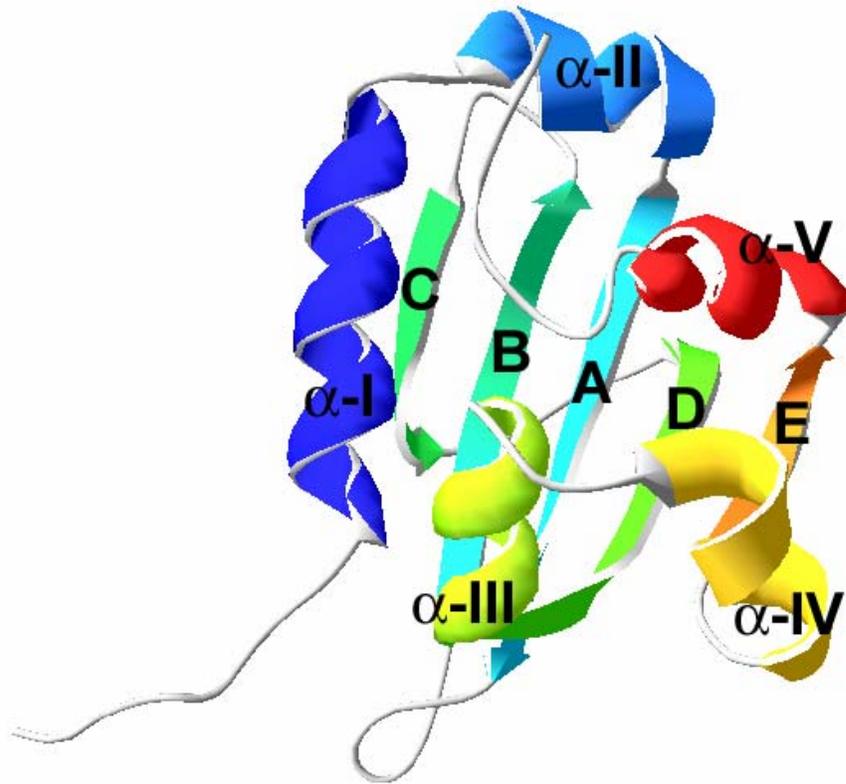
Proteínas multidominio similares a las de mamífero que llevan el dominio SCP-2 también han sido identificados en otros organismos eucariotas como el nematode *Caenorhabditis elegans*, el hongo *Arbuscular mycorrhizal* o amebas de la especie *Dictyostelium spp.* (Barnes, *J Neurochem.* 1996; Requena, *Mol Plant Microbe Interact.* 1999; Matsuoka, *Eukaryot Cell.* 2003). Así mismo, el vector transmisor de la Fiebre Amarilla *Aedes aegypti* expresa la SCP-x y varias proteínas símil SCP-2 sin fusionar (Krebs *Insect Mol Biol.* 2003; Lan, *Insect Mol Biol.* 2004). Sin embargo, en plantas (Edqvist, *J Biol Chem.* 2004), en la levaduras (Szabo, *Gene* 1989; Hwang, *Gene* 1991, Ferreyra, *Arch Biochem Biophys.* 2006), en archaea (Kawashima, *Proc Natl Acad Sci.* 2000), y en bacterias, la SCP-2 parece ser codificada únicamente como una proteína de dominio único, resultado de genes no fusionados. Así, las SCP-2 de plantas, hongos y vertebrados se estima que se obtuvieron por fisión de un gen ancestral que codificaba para una proteína que contenía los dominio de la D-3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa y de la SCP-2 (Edqvist, *J Mol Evol.* 2006).

### **1.5.2. - Características estructurales del dominio SCP-2**

La SCP-2 es una proteína que presenta una estructura claramente distinta a las de la familia FABP. Presenta un motivo de plegado tipo  $\alpha/\beta$  compuesto por 5 hojas- $\beta$  y 5  $\alpha$ -hélices (**Figura 1.4**). No se incluyen en esta estructura los 20 aminoácidos de la presecuencia con la que comienza la pro-SCP-2 de mamíferos y que afectan drásticamente la estructura secundaria y terciaria del dominio SCP-2, así como posiblemente también la función y la localización intracelulares (Martin, *Biochemistry* 2008). Se destacan los 32 aminoácidos del extremo N-

terminal de la SCP-2 que forman una  $\alpha$ -hélice anfipática, que participaría en la interacción con membranas fosfolipídicas aniónicas gracias a residuos de aminoácidos con carga positiva. La cara hidrofóbica de esta hélice junto con las  $\beta$ D,  $\beta$ E y la  $\alpha$ -V forman una cavidad con la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos de estructuras muy variadas como FA, acil-CoA, Colesterol, PL, isoprenoides, etc. La mayoría de las SCP-2 parecen tener un único sitio de unión, independientemente del tipo ligando, aunque la orientación no es la misma cuando se comparan las estructuras de distintos *phyla*. Así, la unión del detergente Triton X-100 en la SCP-2 humana y los FA en la SCP-2 de mosquito tienen orientaciones casi ortogonales. Sólo la estructura dimérica de las proteínas similares SCP-2 2 (SCP2L2) de mosquito mostrará ser más flexible, con un segundo sitio en uno de los monómeros, con una orientación ortogonal al primero (*Dyer, J Lipid Res. 2008*).

Los estudios de NMR comparando las estructuras apo- y holo- de la SCP-2 muestran que el 60% de las señales de resonancia de grupos amida se mantienen esencialmente invariables. Sólo 12 señales asignadas muestran un cambio significativo debido a la unión del oleato a la proteína, pero sin alteración de la estructura secundaria (*Stolowich, Cell Mol Life Sci. 2002*). Estos 12 residuos se distribuyen en la unión entre  $\alpha$ -I y  $\alpha$ -II, la porción media de la hoja- $\beta$  y la interfase formada por las cadenas  $\beta$ D,  $\beta$ E y la  $\alpha$ -V.



**Figura 1.4. – Estructura tridimensional de I SCP-2 de conejo.** Modelo tridimensional de la SCP-2 de conejo basada en los datos de cristalografía de rayos-X (resolución de 1, 8 Å, código pdb: 1C44) (Choinowski, *Biochemistry* 2000).

### 1.5.3. - Funciones biológicas asociadas a la SCP-2

Las proteínas SCP-2 de mamíferos y demás animales han sido ampliamente estudiadas; y gracias a la gran recopilación de información disponible, recién se está comenzando a comprender el rol específico que podrían desempeñar estas proteínas *in vivo*. Quizás la propuesta más aceptada es la que indica que cumplirían la función de un transportador intracelular no específico de lípidos universal, debido a su expresión ubicua y amplio rango de ligandos que puede unir. Menos clara está aún la función que cumpliría la SCP-2 en plantas y microorganismos. Como al resto de las SLBP, se la asocian a procesos en los que la movilización de lípidos entre distintos compartimentos intracelulares o rutas metabólicas sea de crítica importancia. Basados en los

resultados publicados en los últimos años, se han propuesto la siguiente serie de funciones para la SCP-2 (Gallegos, *Prog. Lipid Res.* 2001; Zheng, *J Exp. Bot.* 2008):

- Selección, unión, solubilización, transporte y compartimentalización de un amplio rango de lípidos en el citoplasma (isoprenoides, colesterol, PL, FA y acil-CoA entre otros).
- Transporte vectorial de lípidos hacia estructuras subcelulares o rutas metabólicas específicas.
- Participación en el catabolismo de FA ramificados en el peroxisoma (junto a las proteínas fusionadas al dominio SCP-2, DBP y SCP-x).
- Cofactor o activador de enzimas del metabolismo lipídico (síntesis de EC, PL, TG, etc.).
- Participación en mecanismos de transducción de señales, incluyendo la regulación de la expresión génica relacionada al metabolismo de lípidos.
- Regulación de los procesos relacionados al metabolismo de colesterol y la regulación de sus niveles en membrana plasmática, incluyendo su interacción con caveolas.
- Compensación por la falta de proteínas de la familia FABP (LFABP en hígado en particular) en animales.
- Participación en la formación de las semillas y su germinación en plantas.

A partir de este punto, nos enfocaremos específicamente en los estudios previos que aportan evidencias sobre las posibles funciones específicas de la SCP-2 en un sistema carente de FABP, la levadura *Yarrowia lipolytica*.

#### **1.5.4. - *Yarrowia lipolytica*, una levadura muy particular.**

La levadura ascomicete *Yarrowia lipolytica* es un hongo dimórfico que se presenta en forma de levadura o como micelio, y la transición entre estas formas es regulada por la fuente de lípidos presentes en el medio de cultivo, entre otros factores (Mlčková, *Appl Environ Microbiol.* 2004). Es una levadura aeróbica

estricta que es fácil y eficientemente manipulable por técnicas clásicas, moleculares y genéticas. Además, presenta un metabolismo lipídico característico y es capaz de degradar muy eficientemente gran variedad de sustratos hidrofóbicos empleando vías metabólicas específicas (*Fickers, FEMS Yeast Res. 2005*). Parte de esta capacidad depende de la modificación de la superficie de la célula, de la expresión de enzimas específicas y de la secreción de un conjunto de lipasas y emulsionantes al medio extracelular que hidrolizan parcialmente aceites.

La levadura *Y. lipolytica* posee la capacidad de crecer a partir de alcanos lineales y FA como única fuente de carbono (*Barth, Nonconventional yeasts in biotechnology 1996*). Para esto son necesarios la interacción de la levadura con los sustratos hidrofóbicos, su asimilación y el transporte intracelular para luego ser oxidados en peroxisomas o almacenados como TG en los “cuerpos lipídicos”. Mientras que en animales la degradación de FA tiene lugar en mitocondria y peroxisoma vía  $\beta$ -oxidación; en levaduras las enzimas de esta vía sólo están presentes en peroxisomas. Así, la oxidación de FA es un proceso de etapas múltiples que requiere diferentes actividades enzimáticas, y los hidrocarburos deben ser oxidados previamente a alcoholes y luego a los FA correspondientes para entrar en esta vía. La primera reacción, y etapa limitante del proceso, es la catalizada por una Acil-CoA Oxidasa peroxisomal (AOX o POX) y las características sobresalientes de *Y. lipolytica* podrían en parte deberse a estas enzimas. *Saccharomyces cerevisiae* posee sólo una AOX, mientras que *Y. lipolytica* se diferencia por poseer cinco isoformas diferentes. Además, la modificación de la expresión de estas enzimas en *Y. lipolytica* afecta la asimilación de las gotas de lípido así como el número y el tamaño de los cuerpos de lípidos intracelulares (*Barth, Nonconventional yeasts in biotechnology 1996*).

En cuanto al metabolismo selectivo de nutrientes, al crecer *Y. lipolytica* a base de derivados industriales de grasa animal se ha observado que FA saturados de cadena media/larga (12:0, 14:0 y 16:0) eran rápidamente utilizados para abastecer las necesidades de crecimiento de la levadura. Por el contrario, FA de cadena larga como el esteárico (18:0) son metabolizados más lentamente

y son acumulados principalmente como TG y FA libres (*Papanikolau, Appl Microbiol Biotechnol. 2002; Papanikolau, Bioresour Technol. 2002*).

Por estas características, *Y. lipolytica* se considera una potencial candidata para procesos de bioremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos, fermentaciones biotecnológicas (como la obtención de ácido cítrico), modificación de aromas y sabores en la industria alimenticia, química fina, etc. Comprender el metabolismo lipídico de esta levadura es de crucial importancia a fin de perfeccionar su empleo en las distintas áreas. En este sentido, varias cepas y mutantes (creados por ingeniería genética) de *Y. lipolytica* han sido estudiadas a fin de optimizar la expresión de lipasas, producción de ácido cítrico o la producción de aceites a partir de bio-reactores (*Fickers, J Appl Microbiol. 2004; Papanikolau, J Appl Microbiol. 2002; Papanikolau, Curr Microbiol. 2006; Mlícková, Appl Environ Microbiol. 2004*).

Es importante mencionar que *Y. lipolytica* constituye un sistema de particular interés, ya que combina una capacidad metabólica extraordinaria con una dotación limitada de SLBP, al compararlo con el epitelio intestinal, el tejido hepático o el tejido adiposo de mamíferos. Estos tejidos deben manejar grandes cantidades de lípidos y se especializan en tres funciones que también son bien desempeñadas por las células de esta levadura, como son la asimilación de lípidos, su metabolismo, y la síntesis y almacenamiento de TG. De hecho, las levaduras expresan solamente a la ACBP, que une exclusivamente acil-CoA, además de la SCP-2, y por tal motivo nos interesa estudiar el rol que desempeñaría la YLSCP2 en la levadura, carente de FABP.

### **1.5.5. - SCP2 de *Yarrowia lipolytica***

La levadura *Y. lipolytica* crece profusamente a base de palmitato de sodio y exhibe componentes citosólicos con capacidad de unión de LCFA, lo que sería en parte debido a la expresión de un miembro de la familia SCP-2 (*Dell'Angelica, Comp. Biochem. Physiol. B. 1992; Dell'Angelica, Biochem Mol Biol Int. 1996*). A pesar de la gran cantidad de información disponible, la función específica que

cumple la SCP-2 en mamíferos y plantas aún es un enigma; pero aún menos se conoce acerca del rol que desempeñaría esta proteína en microorganismos.

Junto con el secuenciamiento del genoma completo de la levadura en cuestión (*Dujon, Nature. 2004*), se ha clonado recientemente la SCP-2 de *Yarrowia lipolytica* (YLSCP2), y se está estudiando su estructura, plegamiento, especificidad de ligandos y demás características biofísicas. Al igual que las otras SCP-2, YLSCP2 es una proteína de dominio único, y la predicción de su estructura por modelado por homología sugieren un plegado tipo  $\alpha/\beta$  con 5  $\alpha$ -hélices y una hoja- $\beta$  de 5 cadenas con las mismas características generales de las SCP-2 ya cristalizadas (Burgadt et al. Manuscrito en preparación). Sin embargo, a diferencia de las SCP-2 de mamíferos, el gen que codifica para la YLSCP2 no posee una secuencia N-terminal previa al dominio SCP-2 soluble. Su expresión se ve incrementada cuando se cultiva la levadura en un medio con metanol o palmitato como única fuente de carbono. Esta proteína une con afinidad submicromolar palmitoil-CoA y cis-parinámico (*Ferreyra, Archiv. Biochim. Biophys. 2006*). Se ha estudiado su localización intracelular por fraccionamiento celular y se ha comprobado que la proteína se reparte entre las fracciones citosólica y peroxisomal.

Muy poco se conoce por el momento del metabolismo en microorganismos de este tipo, y en particular en esta levadura. Pero aún menos se sabe sobre el rol que las SLBP podrían tener en estas vías, así como en su regulación.

## **1.6. - Hipótesis y objetivo generales**

Actualmente, se cuenta con gran cantidad de información que apoya la hipótesis de que cada una de las SLBP cumpliría funciones diferentes contribuyendo a la homeostasis celular y sistémica. Alteraciones en la estructura o el patrón de expresión de estas proteínas puede tener efectos locales o sistémicos, no sólo confinados al metabolismo de lípidos, sino también a procesos de diferenciación, proliferación, muerte celular, transducción de señales o regulación de la expresión génica; tanto en forma directa como indirecta a través de mensajeros lipídicos.

Por todo lo descrito hasta aquí, nos interesa estudiar la relación estructura-función de las FABP que se coexpresan en enterocitos intestinales por ser un sistema ideal para comparar las funciones específicas de dos SLBP de la misma familia. Por un lado se desea poder reconocer los determinantes estructurales responsables de las diferencias entre ellas, con el fin último de poder identificar el rol específico que desempeña cada una dentro del enterocito. En paralelo, también nos interesa analizar cómo se comporta un sistema carente de FABP en cuanto a la asimilación, metabolismo y almacenamiento de lípidos. Por tal motivo nos interesa caracterizar funcionalmente a la SCP-2 de *Yarrowia lipolytica*, y así poder también contribuir al estudio de las funciones específicas que desempeña la YLSCP2 en microorganismos.

***El objetivo general de la presente tesis doctoral es el análisis estructural y funcional de SLBP intracelulares que se expresan en sistemas con un alto metabolismo lipídico.***

El texto ha sido dividido en capítulos según los objetivos específicos que se presentan en cada uno de ellos. Para una lectura más fluida, todos los detalles técnicos de los experimentos se han reunido en el apéndice final.





## Capítulo 2:

# Rol de los residuos de Lisina de la región $\alpha$ -helicoidal de IFABP. Análisis inicial *in silico*

### 2.1. - Introducción

#### 2.1.1. - Generalidades

Las FABP intestinales son abundantemente producidas en los enterocitos de mamíferos, donde se cree que participan en el tráfico y procesamiento de las grandes cantidades de FA que son asimilados desde la dieta a lo largo del intestino delgado (*Bass, Chem.Phys.Lipids 1985*). La IFABP pertenece a un conjunto de proteínas de bajo peso molecular con la posible función general de transportadores de lípidos (*Glatz, Prog.Lipid Res. 1996*). En mamíferos, se expresan generalmente más de una SLBP en un mismo tejido o tipo celular. Posiblemente, la selección evolutiva de un patrón de expresión específico es debido a la especialización funcional de cada proteína. En particular, IFABP y la LFABP, se expresan en grandes y casi equivalentes cantidades en células diferenciadas de epitelio intestinal de rata. Se han encontrado un número de interesantes diferencias entre ambas FABP de expresión intestinal (ver **Capítulo 1**) pero, a pesar de ellas, las funciones fisiológicas específicas de estas proteínas aún no se han aclarado. Se ha hipotetizado sobre la importancia de las mismas en el transporte intracelular y el direccionamiento de los lípidos a compartimentos intracelulares o caminos metabólicos específicos.

Se cree que la región  $\alpha$ -helicoidal es parte de un “dominio portal” que regula la entrada y salida del ligando del sitio de unión interno en el barril

(Hodsdon, *Biochemistry* 1997; Córscico, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1998). Estudios realizados con una serie de variantes estructurales de IFABP y LFABP han demostrado la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en la determinación del mecanismo de transferencia del ligando para cada una de las FABP intestinales, sugiriendo un rol fundamental de dicho dominio en la formación del complejo proteína-membrana durante el proceso de transferencia del ligando. Se ha demostrado, empleando una variante carente de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP (Helixless-IFABP o HL-IFABP) (Kim, *Biochemistry* 1996), que esta región está involucrada en la interacción con las membranas, y jugaría un rol crítico en la transferencia colisional entre IFABP y membranas fosfolipídicas (Córscico, *Proc.Natl. Acad.Sci.* 1998; Wu, *Biochemistry* 2001). En efecto, en ausencia del dominio  $\alpha$ -helicoidal de IFABP, la transferencia colisional de FA no ocurre, y estos llegan a la membrana por un mecanismo difusional (Córscico, *Proc.Natl. Acad.Sci.* 1998). También hemos podido demostrar, empleando un par de proteínas quimeras generadas intercambiando la región N-terminal ( $\beta$ A y el dominio hélice-giro-hélice) entre IFABP y LFABP, que el dominio helicoidal de LFABP imparte el mecanismo difusional de transferencia de FA al dominio de unión de IFABP (Córscico, *Biochemistry*, 2004).

Existen abundantes evidencias que indican que las interacciones electrostáticas son uno de los mayores determinantes del mecanismo colisional de transferencia de FA desde el grupo de las FABP “colisionales”, Adiposito (AFABP), Corazón (HFABP), Cerebro (BFABP), Mielina (MFABP) e Intestinal (IFABP) (Herr, *Biochemistry* 1995; Herr, *Biochemistry* 1996; Liou, *Biochemistry* 2001; Liou, *J. Biol. Chem.* 2002; Thumser, *J. Mol. Neurosci.* 2001; Córscico, *J.Lipid Res.* 2005). Por ejemplo, mediante la modificación química de los residuos de Lisina por acetilación selectiva, se ha logrado resaltar la importancia de los residuos cargados positivamente de la IFABP en la transferencia de ligandos vía el mecanismo colisional de transferencia de FA (Córscico, *J.Lipid Res.* 2005).

Si revisamos los trabajos estructurales, vemos que la cristalografía de rayos-X de IFABP ha demostrado que el segmento  $\alpha$ -I es anfipático y que existe una variación conformacional particular en la región  $\alpha$ -II y las vueltas entre  $\alpha$ -II y

$\beta$ B,  $\beta$ C y  $\beta$ D y entre  $\beta$ E y  $\beta$ F, denominado “dominio portal”, al comparar las estructuras de la apo- y holo-IFABP (Hodsdon, *Biochemistry* 1997; He, *Biochemistry* 2007). Esta región se cree que podría participar en la entrada y salida de los ligandos del sitio de unión de las FABP. Por otro lado, todas las FABP “colisionales” presentan un potencial de superficie netamente positivo en la zona de la región helicoidal, mientras que las FABP “difusionales” no presentan dicho patrón (LiCata, *Proteins* 1998). Esto nos lleva a pensar que la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP podría ser crítica para el mecanismo colisional de transferencia de FA, y en particular los residuos cargados positivamente de esta región.

Según estos datos, el motivo hélice-giro-hélice de IFABP es de fundamental importancia para el transporte colisional de FA, y en particular los residuos cargados positivamente. En esta región existen 5 residuos cargados positivamente: Lys<sup>16</sup>, Lys<sup>20</sup>, Lys<sup>27</sup>, Arg<sup>28</sup> y Lys<sup>29</sup>. Se planea cambiar específicamente los residuos de Lys de a uno por residuos de Ile o Glu que neutralizan y revierten la carga del residuo, respectivamente, manteniendo el tamaño de la cadena lateral, y evaluar el efecto de cada mutación sobre la estructura de la proteína, su interacción con ligandos y la capacidad de transferencia de los mismos. En otras palabras, nos interesa analizar el rol de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP en la relación estructura-función.

Es de aceptación general la idea de que la estructura de las moléculas define sus características fisicoquímicas y, por lo tanto, su comportamiento y/o función en medios biológicos. La relación estructura-función de las biomacromoléculas es un área de interés generalizado y de implicancias varias en ámbitos como la biotecnología, nanotecnología, ingeniería química, medicina, veterinaria y agroindustrias. Así, se planea comenzar el análisis de mutaciones puntuales de residuos de Lys de la IFABP *in silico* previamente a los ensayos de experimentales. Los modelos obtenidos durante este análisis tienen una resolución atómica y nos brindarán un marco teórico útil para potenciar la interpretación de los experimentos que se detallan en el próximo capítulo.

Dentro de la biología estructural, las simulaciones o “experimentos *in silico*” permiten, aunque aún en forma bastante limitada para las biomoléculas más complejas, predecir y estudiar virtualmente la estructura y el comportamiento de las moléculas con un detalle a nivel atómico, en un entorno simplificado en el que rigen las leyes de la física. Es necesario tener en cuenta que para que la simulación de una biomacromolécula tenga validez se requiere comparar el modelo, resultados y sus predicciones con datos experimentales, ya sean bibliotecas de estructura. La materia prima para los estudios computacionales es la información experimental y la teoría que permiten configurar las condiciones iniciales del sistema. Así, las observaciones de los experimentos *in silico* son aproximaciones y sólo tienen relevancia a la luz de observaciones experimentales que acompañen las conclusiones que sustentan. Las SLBP, y en particular los miembros de la familia de proteínas FABP, representan casos especiales para este tipo de análisis teórico, ya que hay una gran cantidad de información estructural, biofísicoquímica y bioquímica con la cual contrastar las observaciones derivadas de las simulaciones.

En el presente trabajo de tesis se han llevado a cabo un serie de estudios a fin de dilucidar las funciones específicas de las SLBP. En este capítulo, en particular, se analizan *in silico* las posibles influencias de mutaciones puntuales sobre la estructura de la IFABP. La construcción de un mutante puntual, con la finalidad de evaluar la función del residuo mutado en el comportamiento de la proteína nativa, requiere de controles que aseguren que los cambios observados se deben exclusivamente al cambio de la cadena lateral, y no a una alteración conformacional de la proteína que se traslada a través del esqueleto peptídico

### **2.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos**

La estructura de las FABP presenta una gran estabilidad conformacional que ha permitido estudiar gran cantidad de variantes estructurales que mantienen la estructura tridimensional característica de esta familia de SLBP. Así, se desea corroborar que ***las mutaciones puntuales de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal no producen cambios drásticos sobre la conformación de la IFABP nativa***, De este modo se puede contar con una herramienta más para

validar los ensayos experimentales que se describen en los siguientes capítulos (junto con una serie de controles experimentales) y contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes responsables del comportamiento de la proteína nativa.

En particular, se plantea estudiar en detalle la influencia de los cambios en las propiedades de las cadenas laterales de las posiciones 16, 20, 27 y 29 sobre los puntos de contacto de largo alcance y su vinculación con las propiedades biofísicoquímicas observadas para la proteína. El objetivo general de este capítulo es ***analizar la factibilidad de la construcción de una serie de mutantes puntuales que permitan investigar la relación estructura-función de la IFABP y así acercarse a los roles específicos de cada miembro de la familia de FABP.*** Mediante técnicas de modelado por homología se busca lograr obtener modelos estructurales de mutantes puntuales de IFABP que puedan ayudar a validar y potenciar la interpretación de los experimentos que se describen en los siguientes capítulos. Los objetivos específicos que se abarcan en este capítulo son los siguientes:

- 1) Construir modelos estructurales de mutantes puntuales de la IFABP de rata.
- 2) Validar los modelos en comparación con la proteína nativa y valores de referencia de la bibliografía.
- 3) Analizar los cambios conformacionales relevantes y la alteración de puntos de contacto debido a la introducción de las mutaciones puntuales.
- 4) Analizar el efecto de la presencia del ligando natural sobre la conformación de los modelos de los mutantes puntuales.

### **2.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos**

Los objetivos propuestos para este trabajo de tesis son el primer paso en el estudio las FABP intestinales *in silico*. Además, las estructuras obtenidas se emplearán en nuevos ensayos por Dinámica Molecular que están siendo profundizados en nuevas colaboraciones y para las cuales los resultados de esta tesis doctoral representan el punto de partida. Sin embargo, la mayor relevancia

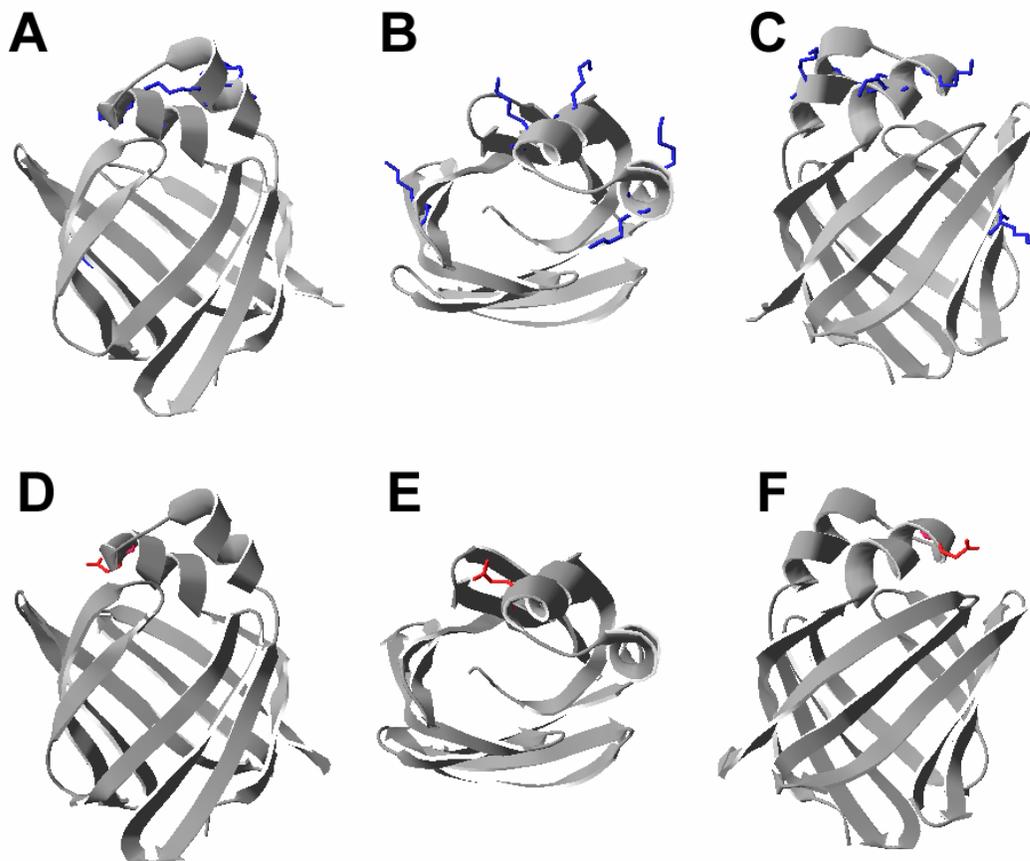
para el presente trabajo es la obtención, en forma relativamente inmediata, de modelos moleculares para 10 proteínas distintas; mientras que el uso de técnicas experimentales (Cristalografía de Rayos X o NMR) requeriría de más recursos humanos y económicos, y de mucho más tiempo. De este modo, este primer paso “teórico y virtual” en el análisis del rol de los residuos de Lys de IFABP nos puede ayudar a discernir qué mutantes serían más relevantes o apropiados para su posterior análisis mediante técnicas bioquímicas y biofísicas

## **2.2. - Resultados y Discusión**

### **2.2.1. - Obtención de modelos conformacionales de mutantes puntuales de IFABP**

Como ya se mencionó, el objetivo de este capítulo consiste en analizar la factibilidad de la construcción de mutantes puntuales de la IFABP empleando métodos computacionales, tomando como base la estructura cristalográfica de la proteína nativa.

Se obtuvieron modelos estructurales empleando el software INSIGHT II (Accelrys, San Diego, CA) para introducir, una a la vez, las mutaciones puntuales de reversión (K→E) y neutralización (K→I) de la carga de los cuatro residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal y de la Lys<sup>92</sup> del barril- $\beta$ , que se incluyó como un control. La minimización de energía conformacional de los mutantes de IFABP se realizó en primera instancia, tanto en la forma apo como holo, sin el agregado de una esfera de moléculas de agua alrededor; y se corroboró que la proteína tendía a relajarse perdiendo su estructura nativa por expansión. Esto se observaba por el aumento de todas las distancias interatómicas, incluso para la proteína nativa. Por tal motivo se decidió repetir el análisis con los modelos obtenidos “sumergidos en solvente” (SOAK) y continuar los análisis posteriores sólo con estos últimos, ya que mostraron ser más fieles a la estructura cristalográfica inicial gracias a la implementación de un modelo de solvente explícito envolviendo a la proteína. En la **Figura 2.1** se muestran los modelos obtenidos para la IFABP nativa y para un mutante (K20E, a modo de ejemplo) en forma holo. A primera vista se reconoce la estructura tridimensional típica de las FABP. En los paneles **A**, **B** y **C** se puede observar la posición relativa de los residuos de Lys mutados (resaltados en azul) en la IFABP. Como es esperable, los modelos por homología obtenidos para los mutantes puntuales mostraron estructuras indistinguibles en su estructura general y sin alteraciones visibles respecto a la estructura cristalográfica original.



**Figura 2.1 – Modelos moleculares obtenidos para IFABP y el mutante K20E.** En los paneles **A**, **B** y **C** se muestra en distintas orientaciones de modelo obtenido para la proteína nativa IFABP en su forma holo. En los paneles **D**, **E** y **F** se puede observar, en las mismas orientaciones, la estructura en forma holo del mutante K20E, obtenida por modelado por homología a partir de la estructura cristalográfica de la proteína nativa. El esqueleto peptídico se muestra en el formato de cintas (gris), los residuos de Lys mutados analizados están resaltados en azul, y la cadena lateral del residuo Glu<sup>20</sup> está resaltada en rojo.

### 2.2.2. - Validación de los modelos conformacionales

Los cálculos de minimización de energía (EM) para los mutantes de IFABP se realizaron para las formas apo y holo por separado, tanto solas como con el agregado de las moléculas de solvente explícito. En este último caso se observó que hay una contribución muy grande proveniente de las moléculas de agua inicialmente orientadas al azar que podría estar enmascarando cambios conformacionales de la proteína. Sin embargo, en todos los casos, los cambios de energía del sistema cayeron dentro del intervalo de confianza del 95% para la

distribución de valores resultantes para el conjunto de modelos obtenidos, incluidos los de la proteína nativa. Las diferencias en general fueron muy pequeñas, entre 0,01 y 1,87% para el caso de las proteínas sumergidas en moléculas del solvente (ver **Tabla 2.1**).

**Tabla 2.1 - Control de calidad de los modelos tridimensionales de mutantes puntuales de IFABP.**

Proteína	EM (kcal.mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		WAS (Å <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>		PV (Å <sup>3</sup> ) <sup>c</sup>	
	Apo	Holo	Apo	Holo	Apo	Holo
<b>WT</b>	-15304	-12026	7033	7075	19676	20190
<b>K16I</b>	-15302	-11934	7030	7028	19513	18805
<b>K16E</b>	-15418	-12064	6986	7013	19654	19374
<b>K20I</b>	-15227	-12251	7066	7027	19616	19201
<b>K20E</b>	-15359	-12012	6979	7031	19473	19437
<b>K27I</b>	-15333	-12005	7046	7013	19417	20274
<b>K27E</b>	-15425	-12035	7125	7068	19599	19544
<b>K29I</b>	-15302	-12017	7016	7019	19621	18973
<b>K29E</b>	-15429	-12122	7160	7168	19669	19204
<b>K92I</b>	-15175	-11934	6984	6986	19576	19242
<b>K92E</b>	-15209	-12058	6994	6998	19619	19295
<b>Intervalo de confianza del 95%</b>	-15317±231	-12042±232	7038±156	7039±132	19585±220	19413±1195

<sup>a</sup> Cálculos de minimización de Energía Libre para las proteínas enteras, la proteína nativa IFABP y sus mutantes puntuales, en formas apo y holo. Los cálculos se realizaron empleando el módulo Discover3 del software INSIGHT II (Silicon Graphics Inc., MSI, San Diego, CA, USA).

<sup>b</sup> Superficie Accesible al Solvente, agua en este caso (WAS), empleando los programas ACCESS y BINS.

<sup>c</sup> Cálculos del Volumen de la proteína (PV) empleando los programas VOLUME y VOLFMT. Ver detalles en **Apéndice A**.

Por otro lado, la comparación de los valores calculados de la superficie accesible al solvente (WAS) y del volumen de la proteína (PV) para los mutantes puntuales no muestra diferencias relevantes a los correspondientes a la proteína nativa. En conjunto se ve que las formas apo tienen un ínfimo aumento de WAS y PV (menor al 0,1%), mientras que las formas holo mostraron en promedio una leve disminución de los mismos parámetros. Estas modificaciones son más evidentes en los modelos de las formas holo que en las formas apo (alrededor del 0,5%); y, en particular, K27I mostró un PV un 0,42% mayor a la proteína nativa, mientras que el resto de los mutantes muestran una disminución en promedio del 4.75%. Al igual que con los cálculos de EM, al analizar la distribución de los

valores de WAS y PV, se comprueba que ninguno cae fuera del intervalo de confianza del 95% (**Tabla 2.1**).

Tomando todos estos datos en conjunto podemos suponer que no se observan cambios conformacionales globales significativos debido a las mutaciones puntuales introducidas. Sin embargo, es necesario un análisis más detallado para evidenciar cambios locales, potencialmente relevantes al momento de los experimentos *in vitro*, que hayan quedado enmascarados en el análisis global.

### **2.2.3. - Comparación de los modelos conformacionales**

Para examinar en particular el efecto de las mutaciones puntuales sobre la conformación espacial del dominio portal (residuos 24-33, 54-55 y 73-74), el esqueleto peptídico del resto de las proteínas mutantes (residuos 2-22, 35-52, 57-71 y 76-130) se superpuso al de la proteína nativa. Los resultados mostraron que pequeños cambios fueron introducidos en la conformación de la proteína por las mutaciones puntuales de IFABP. La **Tabla 2.2** muestra las desviaciones cuadráticas medias (rmsd) para todos los átomos pesados, agrupados en las distintas regiones estructurales. No es inesperado observar que mayores efectos se detectaron en el dominio portal para los mutantes de la región  $\alpha$ -helicoidal que para los mutantes control de la posición 92; y lo opuesto para los cambios en el barril- $\beta$ . Para identificar qué puede considerarse un cambio significativo, se tomaron como referencia los cambios conformacionales entre las estructuras cristalográficas apo y holo de la IFABP nativa, que resultaron ser en promedio 3 veces mayores a las observadas entre las mutantes y la nativa en forma holo. Estas estimaciones sugieren, como se esperaba, que los mutantes puntuales no afectaron la conformación global de la proteína en forma apreciable.

**Tabla 2.2. Desplazamiento promedio del dominio portal en la superposición de las formas holo de los mutantes puntuales de IFABP y la proteína nativa.<sup>a</sup>**

Proteína	rmsd (Å)		
	Átomos Pesados	Dominio No-Portal	Dominio Portal
<b>Residuos</b>	1-131	2-22, 35-52, 57-71, 76-130	24-33, 54-55, 73-74
<b>K16I</b>	0.55	0.53	0.73
<b>K16E</b>	0.6	0.61	0.63
<b>K20I</b>	0.62	0.62	0.69
<b>K20E</b>	0.51	0.46	0.8
<b>K27I</b>	0.51	0.46	0.69
<b>K27E</b>	0.5	0.47	0.61
<b>K29I</b>	0.46	0.43	0.67
<b>K29E</b>	0.52	0.44	0.93
<b>K92I</b>	0.43	0.43	0.35
<b>K92E</b>	0.45	0.47	0.35
<b>Promedio ± t0.975*DS</b>	0.52 ± 0.17	0.49 ± 0.19	0.65 ± 0.48
<b>Apo vs. Holo wtIFABP</b>	1.51	1.44	1.65

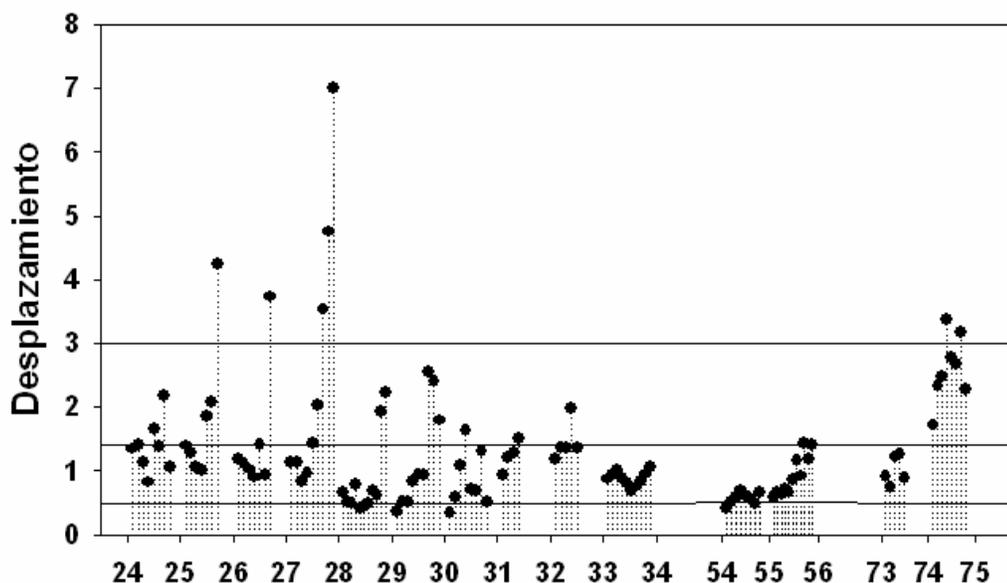
<sup>a</sup> Desplazamiento cuadrático medio (rmsd) en la superposición del esqueleto peptídico de la región no-portal de los modelos de las formas holo de los mutantes puntuales de IFABP y la proteína nativa. Como referencia se observan las diferencias que muestra la proteína nativa entre las formas apo y holo.

También se realizó un análisis estadístico por t-Test de Student de variancia desigual (F-Test:  $p < 0,01$ ) de una cola sobre el rmsd para las regiones portal y no portal por separado, pero no se pudo comprobar que algún mutante diera un comportamiento aberrante. Sin embargo, se demostró que los desplazamientos del dominio portal de todos los mutantes en promedio excedían a los del dominio no-portal ( $p < 0.02$ ), salvo para los mutantes control, K92I y K92E.

Estos cálculos se realizaron con los átomos pesados de las proteínas en su conjunto de acuerdo al dominio al que pertenecen. Un análisis más detallado puede realizarse graficando el desplazamiento individual de cada átomo y distinguir cambios puntuales en la orientación de ciertos dominios. Por tal motivo se graficaron los desplazamiento de cada átomo pesado (C, N, O y S) del

dominio portal para cada mutante puntual de IFABP en referencia a la proteína nativa. En la **Figura 2.2** se muestran los desplazamientos individuales entre las formas apo y holo de la proteína nativa, que luego se emplearon como referencia para el análisis de los modelos correspondientes a los mutantes puntuales. Tomando los cambios más notorios y los menos visibles, se definieron arbitrariamente cuatro magnitudes de desplazamientos: no significativos (desplazamiento  $< 0,5 \text{ \AA}$ ), pequeños ( $0,5 < \text{desplazamiento} < 1,4$ ), moderados ( $1,4 < \text{desplazamiento} < 3,0$ ) y grandes (desplazamiento  $> 3,0 \text{ \AA}$ ). En las **Figuras 2.3** se muestran los resultados para la comparación de cada mutante con la proteína nativa en forma holo. Ningún modelo mostró desplazamientos superiores a  $3 \text{ \AA}$ , por lo que ratificamos que no se han producido cambios significativos en el dominio portal debido a las mutaciones en los residuos de Lys. Sólo los mutantes control del barril- $\beta$  muestran desplazamientos notoriamente menores debido a la distancia al dominio portal y a que no forma parte del mismo.

El análisis detallado para toda la secuencia de las proteínas muestra cambios de la misma magnitud, y no vale la pena entrar en detalles. Sólo diremos que se observan cambios pequeños, con un aumento progresivo en el desplazamiento de los átomos a lo largo de la cadena lateral de cada residuo. Esto es perfectamente esperable debido al menor número de restricciones conformacionales de los mismos. Además, no se observan tendencias o patrones significativos en los desplazamientos relativos.

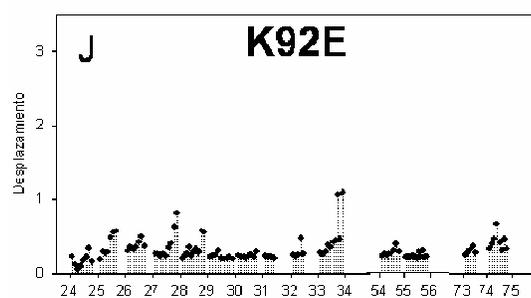
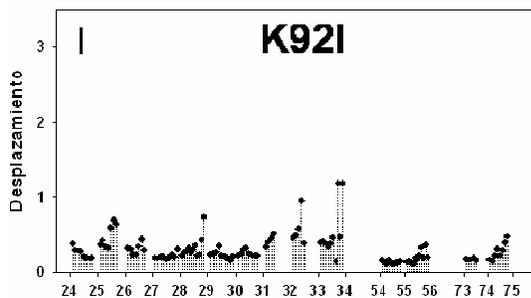
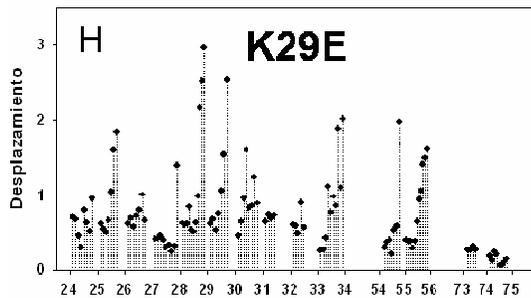
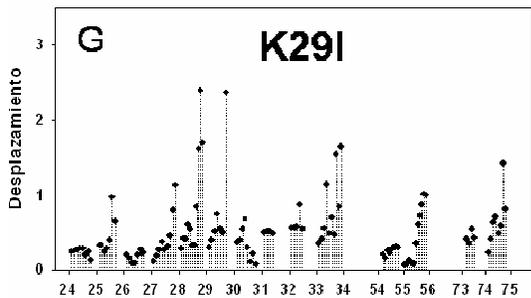
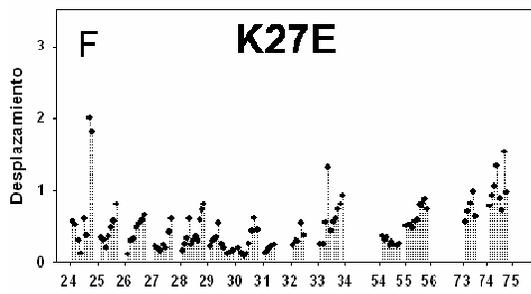
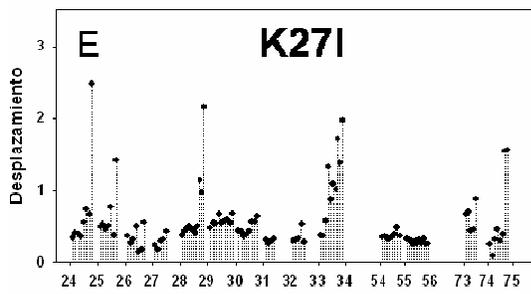
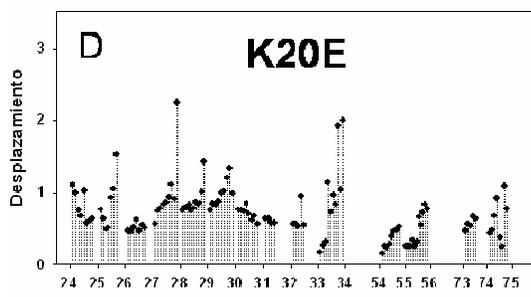
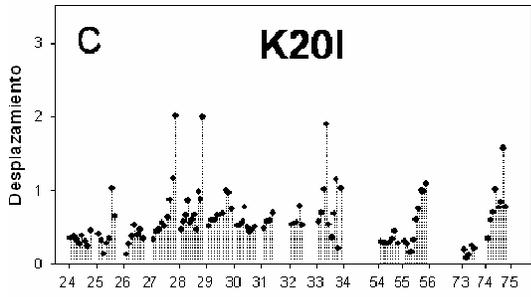
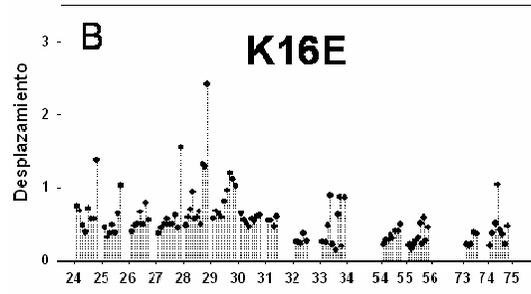
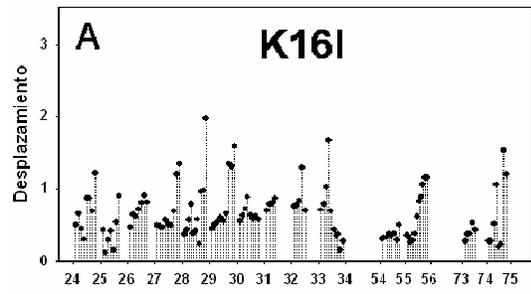


**Figura 2.2 – Configuración del dominio portal entre las formas apo y holo de IFABP nativa.** Se muestran las distancias relativas de los átomos del dominio portal debido a los cambios conformacionales que induce la unión del ligando. Las líneas horizontales corresponden a los valores de corte arbitrarios que se definieron para comparar luego el efecto de las mutaciones puntuales (ver texto y Figura 2.4)

Por otro lado, se analizó la distribución de los distintos tipos de superficie accesible al solvente de la proteína. Así, aprovechando los cálculos realizados con el programa ACCESS, se clasificó la superficie expuesta de cada aminoácido según su aporte a la superficie alifática, aromática, polar sin carga o polar cargada, y así evaluar el efecto de las mutaciones introducidas en la proteína nativa. En la **Figura 2.4** se muestran los resultados como porcentajes del total de área expuesta para las formas apo y holo de cada proteína. En general no se observaron grandes cambios, más que los esperables para las mutaciones sobre

---

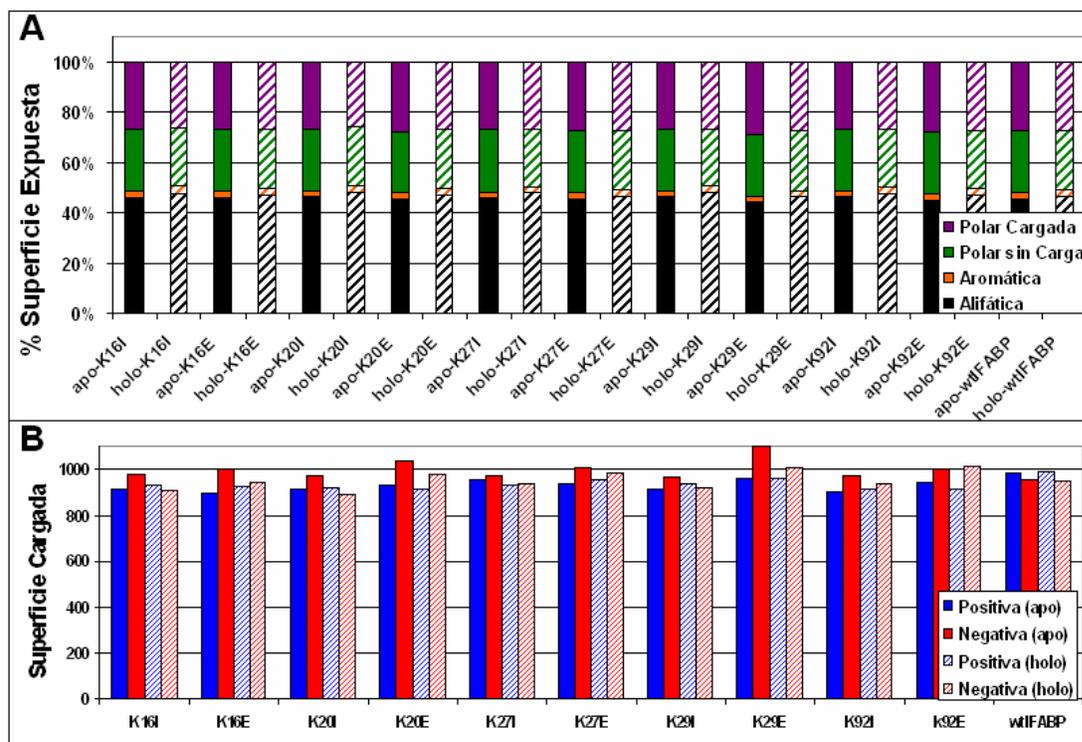
**Figura 2.3 – Efecto de las mutaciones puntuales sobre la configuración espacial del dominio portal.** (Página siguiente) Los distintos paneles muestran las distancias entre átomos pesados iguales luego de superponer cada uno de los mutantes puntuales a la proteína nativa en sus formas holo. Los paneles A, C, E, G, e I corresponden a los mutantes de neutralización, mientras que los paneles B, D, F, H y J a los mutantes de reversión. En todos los casos, los desplazamientos registrados fueron menores a los observados al comparar las formas apo y holo de la IFABP nativa, indicando que no hubo cambios significativos en el dominio portal por la introducción de las mutaciones puntuales.



un residuo de carga positiva (Lys) que se cambia por un aminoácido alifático (Ile) o por uno con carga opuesta (Glu). Vale mencionar que entre las formas apo y holo no parece haber diferencias significativas, pero si una pequeña diferencia, pero sistemática, en la contribución al área polar, que resulta ser levemente menor siempre en la forma holo. En particular, en cuanto a la carga superficial, la proteína nativa posee 21 residuos cargados positivamente (Lys y Arg) y 21 cargados negativamente (Glu y Asp). Al graficar el contenido de área cargada positiva y negativamente, se observa que las formas holo de los mutantes K20E, K27E, K29E y K92E invierten levemente la relación entre las mismas respecto a lo observado en la rIFABP, la cual presenta un leve predominio de superficie expuesta al solvente con carga positiva. Por otro lado, en las formas apo, la sola eliminación de la carga positiva del residuo de Lys mutado es suficiente para invertir esta relación. Sin embargo, sólo los cambios observados para la forma apo del mutante K29E son significativos a la luz del análisis estadístico. Esta observación puede tener importancia al momento de analizar interacciones de naturaleza electrostática entre las proteínas y con membranas fosfolipídicas.

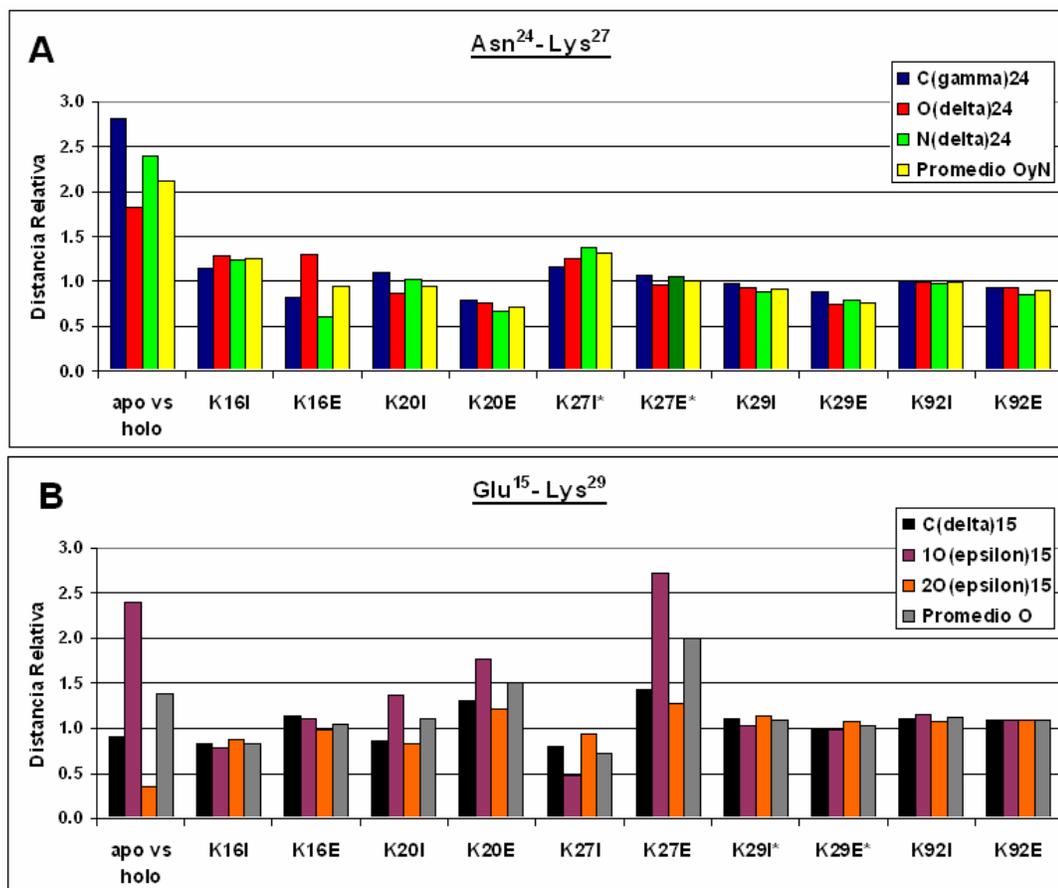
Asimismo, se analizaron las modificaciones de las interacciones de largo alcance. Ya que no se observaron modificaciones globales significativas, nos centramos en los contactos descritos para las cadenas laterales de las posiciones mutadas, es decir entre Glu<sup>15</sup> y Lys<sup>29</sup>, y entre Asn<sup>24</sup> y Lys<sup>27</sup>. En la **Figura 2.5** se muestran las distancias relativas en los mutantes puntuales respecto a la proteína nativa en forma holo. Para el caso del contacto entre Asn<sup>24</sup> y Lys<sup>27</sup> (panel **A**), no se observan grandes modificaciones en comparación con las detectadas para las estructuras apo y holo de la IFABP nativa. En cambio, para el caso de la interacción entre Glu<sup>15</sup> y Lys<sup>29</sup> (panel **B**) se observó cómo la introducción de una carga negativa en la posición 27 altera considerablemente la interacción de estos residuos. Este efecto también se observa, aunque en forma más discreta para la mutante K20E. Llamativamente, no parece ocurrir lo mismo al introducir la misma mutación de reversión de carga en la propia posición 29. Esto puede deberse a que en este caso se empleó el C( $\delta$ ) y no el N( $\zeta$ ) para el análisis, o a la posibilidad de que se establezca un puente de hidrógeno tanto con el grupo amino del residuo de Lys (nativo) como con el carboxilato del Glu

(mutante) en posición 29 que mantenga estos residuos a la misma distancia del Glu<sup>15</sup>.

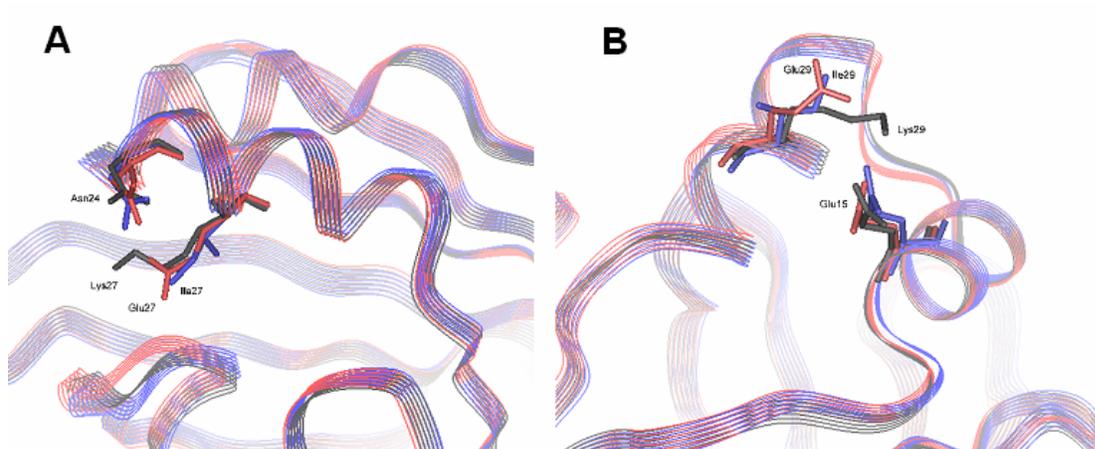


**Figura 2.4. Distribución de área accesible al solvente.** El panel **A** muestra la distribución de la carga superficial para cada mutante y para la wtIFABP según los modelos obtenidos para las formas apo y holo. El panel **B** muestra la relación entre la superficie cargada positiva y negativamente para las mismas proteínas. En ambos gráficos las barras rayadas corresponden a los modelos para las proteínas en su forma holo, mientras que las barras llenas a las formas apo.

**Figura 2.5. Distancias relativas de los puntos de contacto de los residuos de Lys de  $\alpha$ -II.** (Página siguiente) En el panel **A** se muestra cómo se alteran las distancias entre el Nitrógeno N( $\zeta$ ) del residuo 27 y los átomos C( $\gamma$ ) O( $\delta$ ) y N( $\delta$ ) del Asn<sup>24</sup> en forma relativa a la proteína nativa (formas holo) para los mutantes puntuales. El panel **B** muestra lo propio para las distancias entre el residuo 29 y los átomos C( $\delta$ ), O1( $\epsilon$ ) y O2( $\epsilon$ ) de Glu<sup>15</sup>. \*Debido a las mutaciones puntuales, las distancias de los mutantes 27, en el panel **A**, y 29, en el panel **B**, se calcularon desde el átomo pesado en común más alejado de C( $\alpha$ ), es decir desde el C( $\delta$ ).



Para completar el razonamiento del párrafo anterior, es importante tener en cuenta, no solo los desplazamientos físicos dentro de la estructura, sino también la naturaleza de los cambios introducidos. De este modo, en la **Figura 2.6** se muestran superpuestas las estructuras de los mutantes de las posiciones 27 y 29, orientadas de tal forma de mostrar la posición relativa de dichos residuos a los residuos Asn<sup>24</sup> y Glu<sup>15</sup>, respectivamente. Aquí se demuestra que incluso aunque no haya cambios conformacionales importantes, las propiedades superficiales de la proteína pueden ser afectados considerablemente, por ejemplo en el caso del mutante K29E concentrando cargas negativas en la región expuesta al solvente del dominio helicoidal de la proteína.



**Figura 2.6. Alteración de las interacciones de largo alcance por las mutaciones puntuales de Lys de la región  $\alpha$ -II.** Superposición de los modelos de los mutantes de la posición 27 (panel **A**) y 29 (panel **B**). En gris está coloreada la proteína nativa, en azul la mutante de neutralización y en rojo la de reversión.

La comparación de los modelos supone que no existirían aberraciones notorias en los mutantes puntuales de los residuos de Lys de IFABP. Las pequeñas modificaciones observadas no afectan la superficie, el volumen ni la distribución de carga en forma significativa; y se limitan al entrono inmediato del residuo mutados.

### **2.3. - Conclusiones**

Los modelos obtenidos por homología para los mutantes puntuales de IFABP muestran que la energía libre absoluta, la superficie accesible al solvente y el volumen proteico calculados para cada mutante son muy similares entre sí y con la proteína nativa, y caen dentro de los esperados para una proteína del tamaño de la proteína nativa (*Kajander, Structure 2000*). De la comparación de las estructuras obtenidas, queda claro que no hay cambios conformacionales globales apreciables, así como en la posición de las conformaciones de equilibrio del esqueleto peptídico y de las cadenas laterales. La alta estabilidad estructural de los mutantes puntuales era de esperarse, ya que cambios similares en otros miembros de la familia de FABP han sido asombrosamente estables y fieles al comportamiento y estructura de la proteína original (*Herr, Biochemistry 1996; Liou, J.Biol.Chem. 2002*). Asimismo, la incorporación de varios grupos de fluoresceína a la IFABP no alteró el plegamiento de la proteína o las propiedades de unión de ligandos (*Frieden, Biochemistry 1995*).

La hélice  $\alpha$ -II es un elemento estructural central del propuesto “Dominio Portal”, y forma interacciones de largo alcance con el  $\beta$ -giro entre las hojas- $\beta$  C y D. Los estudios de NMR de las formas apo y holo han demostrado una flexibilidad estructural aún mayor de este dominio del que inicialmente sugerían los estudios de cristalografía. Notablemente, la porción distal de  $\alpha$ -II y el  $\beta$ -giro entre las hojas- $\beta$  C y D son las regiones de la proteína que muestran los mayores cambios conformacionales, ambas regiones se encontraron en un estado más desordenado en ausencia del ligando y exhibieron un número menor de interacciones de largo alcance (*Hodsdon, Biochemistry 1997*). Esto sugiere que durante la entrada/salida del ligando, un cambio conformacional podría estar siendo llevado a cabo en esta región de la proteína, permitiendo así que el ácido graso atraviese el “Dominio Portal”. En particular, los residuos de Lys de  $\alpha$ -II analizados tienen contactos de largo alcance con otros residuos.

En la holoproteína, Lys<sup>27</sup> está orientada a través del dominio portal, interaccionando con la cadena lateral de la Asn<sup>24</sup>, que se ubica al final del giro entre las  $\alpha$ -hélices. En la apoproteína, en contraste, Lys<sup>27</sup> apunta hacia el medio

acuoso (Scapin, *J. Biol. Chem.* 1992; Sacchettini, Hsu, *J. Biol. Chem.* 1992). Es probable que la sustitución de la Lys<sup>27</sup> modifique la interacción de este residuo con Asn<sup>24</sup> y/o con membranas o proteínas. La Lys<sup>29</sup> está ubicada en la región más dinámica del esqueleto peptídico de la rIFABP pero, a diferencia de los otros residuos analizados, forma un puente salino con el Glu<sup>15</sup> de la región  $\alpha$ I, ambos altamente conservados a lo largo de la familia FABP (Scapin, *J. Biol. Chem.* 1992). El puente salino podría estar ayudando a mantener las dos  $\alpha$ -hélices juntas, manteniendo así la estabilidad de la “tapa” helicoidal. El rol de los puentes salinos superficiales en la estabilidad local y global de las proteínas ha sido descrito en otras proteínas (Hennig, *Structure* 1995; Yip, *Structure* 1995). Como se verá en el siguiente capítulo, los mutantes con una “tapa” helicoidal que carece del puente salino entre la Lys<sup>29</sup> y Glu<sup>15</sup> (K29I y K29E) resultó en un comportamiento diferencial en cuanto a la de transferencia de ligandos desde la proteína, al compararlos con los otros mutantes de la región  $\alpha$ -helicoidal y con la proteína nativa.

En los estudios presentes, se evaluaron los efectos de la eliminación y la reversión de la carga de residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de la IFABP de rata a fin de comprender mejor las bases estructurales responsables del mecanismo de transferencia de ligandos de esta proteína. Estos modelos serán tenidos en cuenta en la interpretación de los resultados que se presentan en los **Capítulos 3 y 4** del presente trabajo de tesis.





## **Capítulo 3:**

# **Rol de los residuos de Lisina de la región $\alpha$ -helicoidal de IFABP. Efecto sobre el mecanismo colisional de transferencia de ligandos**

### **3.1. - Introducción**

#### **3.1.1. - Generalidades**

Para estudiar las posibles funciones específicas de las FABP como transportadores de lípidos, se ha empleado un ensayo *in vitro* de transferencia de energía de resonancia (FRET) para examinar la velocidad y el mecanismo de transferencia de análogos fluorescentes de FA desde las FABP hacia membranas fosfolipídicas, así como los factores que modulan dicho proceso. Estos estudios demostraron que diferentes miembros de la familia FABP transfieren FA hacia vesículas lipídicas a través de mecanismos cinéticos distintos, y han permitido clasificar a las FABP en “colisionales” y “difusionales” (Wootan, *Biochemistry* 1993; Wootan, *J.Biol.Chem.* 1994; Kim, *J.Biol.Chem.* 1992 (a) y (b); Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Di Pietro, *Biochemistry* 2003, Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Storch, *Biochim.Biophys.Acta* 2000; Thumser, *J.Lipid Res.* 2000). En el caso de las FABP intestinales, se ha observado que la transferencia de FA desde IFABP ocurre aparentemente durante la colisión directa entre la proteína y la bicapa fosfolipídica. En contraste, la LFABP emplea un mecanismo de transferencia distinto, que involucra la liberación inicial del ligando al medio acuoso previo a su asociación a la membrana. Los elementos estructurales responsables del mecanismo colisional de los FA desde la IFABP hacia membranas aún no están completamente definidos, y su conocimiento podría tener importantes consecuencias fisiológicas ya que podrían dictar los patrones de tráfico intracelular de los FA dentro de la célula.

La transferencia de ligandos desde las FABP hacia vesículasceptoras ha sido ampliamente estudiada para varios miembros de la familia de FABP, lo que permitió clasificarlas de acuerdo a la dependencia que muestran en la velocidad de transferencia con las variaciones de la concentración y composición de las vesículas, y de las condiciones del medio en el que se estudia (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) (ver Capítulo 1). Ensayos más recientes en nuestro laboratorio han permitido identificar al motivo hélice-giro-hélice como uno de los determinantes principales del mecanismo de transferencia de ligandos, ya sea colisional o difusional, así como la importancia de los residuos con carga positiva de la proteína (Córsico, *Proc.Natl. Acad.Sci.* 1998; Córscico, *Biochemistry*, 2004; Córscico, *J.Lipid Res.* 2005; Franchini, *Biochim.Biophys.Acta* 2008).

La caracterización funcional de las FABP se basa en las características de su capacidad de intercambiar ligandos con membranas fosfolipídicas. En particular para IFABP, se ha demostrado que la región  $\alpha$ -helicoidal tiene un papel central en el proceso de transferencia de ligandos hacia membranas modelo (Córscico, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998). Más aún, los residuos superficiales con carga positiva de la IFABP afectan notoriamente la velocidad de transferencia de análogos fluorescentes de FA (Franchini, *Biochim Biphyc Acta* 2006). Por tal motivo, se estudiarán las propiedades de unión y transferencia de los mutantes puntuales de la región  $\alpha$ -helicoidal, analizados en el capítulo anterior.

### **3.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos**

Tomando en forma conjunta los trabajos antes descriptos que señalan la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal y de los residuos básicos en la transferencia colisional, se plantea la hipótesis de que **los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP participan en el mecanismo colisional de transferencia de FA de IFABP**. En este capítulo del presente trabajo de tesis se analizan *in vitro* las posibles funciones de la IFABP dentro de la célula como un transportador de ligandos hidrofóbicos. Se desea **estudiar el efecto que tienen mutaciones**

***puntuales de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal sobre la unión y la transferencia en distintas condiciones de FA hacia membranas fosfolipídicas, a fin de dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes.***

En particular, se plantea estudiar en detalle la influencia de cambios en la carga superficial de la proteína, en residuos específicos, sobre las propiedades biofísicoquímicas de la IFABP.

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto cuyo objetivo general es investigar la relación estructura-función de las FABP intestinales y así acercarse a los roles específicos de cada miembro de la familia. Mediante técnicas de biofísicas, bioquímicas y de biología molecular se busca lograr identificar el rol de residuos específicos en la transferencia de FA y así definir los determinantes estructurales responsables de dicha especificidad. Los objetivos específicos que se abarcan en este trabajo de tesis son los siguientes:

- 1) Construir, expresar y purificar mutantes puntuales de la IFABP de rata, específicamente K16I, K16E, K20I, K20E, K27I, K27E, K29I, K29E, K92I, y K92E.
- 2) Analizar el correcto plegamiento de los mutantes de IFABP en comparación con la proteína nativa.
- 3) Determinar la capacidad de unión de FA por los mutantes puntuales.
- 4) Determinar las constantes de partición de los análogos fluorescentes entre la proteína y membranas fosfolipídicas artificiales.
- 5) Determinar la velocidad y el mecanismo de transferencia de ligandos hidrofóbicos a membranas fosfolipídicas modelo, y los factores que modulan dicha transferencia desde los mutantes puntuales de IFABP.

### **3.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos**

Los FA proveen la mayor fuente energética en las dietas occidentales. Además, son componentes estructurales integrales en todas las membranas celulares, precursores de segundos mensajeros regulatorios y pueden modular la expresión de genes específicos. Los FA se obtienen como resultado de la hidrólisis de los triglicéridos dietarios y, junto con los monoacilgliceroles, son

absorbidos por los enterocitos intestinales. Estas células expresan grandes cantidades y aproximadamente equivalentes de dos proteínas homólogas que unen FA de cadena larga, IFABP (Ockner, *J.Clin.Invest.* 1974) y LFABP (Mishkin, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1972; Ockner, *Science* 1972). Se ha hipotetizado durante mucho tiempo que las FABP participan en el transporte intracelular y el procesamiento de las grandes cantidades de FA absorbidos por el intestino delgado, y los trabajos recientes han comenzado a elucidar los mecanismos por los que esto podría ocurrir; pero una de las preguntas que aún se mantiene esquivada es la razón por la cual un sólo tipo celular necesita expresar dos isoformas de FABP.

Uno de los motivos de nuestro interés en las FABP es que, a pesar de la baja identidad de secuencia entre sus miembros, la estructura tridimensional es prácticamente superponible y aún así escondería las diferencias responsables para una hipotética función específica. Además, a pesar de la gran cantidad de información estructural con la que se cuenta, aún no se han podido identificar los determinantes estructurales responsables de las características únicas observadas hasta el momento para cada miembro de la familia FABP. El estudio de las FABP intestinales es un caso de particular interés ya que las diferencias estructurales y funcionales entre ambas deberían estar asociadas al metabolismo de sus ligandos en una única célula.

Las FABP intestinales muestran patrones de expresión y características únicas que hacen suponer funciones específicas para cada una de ellas. Sin embargo, ninguna de las dos es esencial para el desarrollo embriológico ni para la supervivencia de los ratones *knock-out*, en los cuales se ha eliminado la expresión en forma independiente de estas proteínas (Newberry, *J Biol Chem.* 2003; Martin, *J Biol Chem.* 2003; Agellon, *Biochim Biophys Acta.* 2007); lo que podría estar indicando cierta redundancia funcional. Por estas razones nos proponemos estudiar las bases moleculares responsables de las características funcionales de la IFABP en la transferencia colisional de FA *in vitro*, a fin de elucidar las funciones específicas de esta proteína. Es probable que los resultados obtenidos de los ensayos propuestos en la siguiente sección tengan relevancia fisiológica y nos permitan plantear nuevas hipótesis más específicas

relacionadas al rol único de las FABP en el metabolismo celular, y en especial de la IFABP en el metabolismo lipídico del enterocito.

Se hipotetiza que las FABP participan del transporte intracelular de LCFA, lo que implica que estas proteínas podrían estar involucradas en la descarga de FA en los sitios de metabolismo posterior. Pero también participarían de la extracción de FA de sitios donores, como por ejemplo la remoción de los FA exógenos de la membrana plasmática luego del transporte a través de la misma. Por lo tanto, investigar los mecanismos de transporte de FA, así como los factores que gobiernan y modulan dicho proceso, podría contribuir al entendimiento preciso de sus funciones celulares. Por otro lado, teniendo en cuenta el rol clave del intestino delgado en el metabolismo de alta eficiencia de lípidos, además del interés académico en el conocimiento de las vías del tráfico, metabolismo y regulación de los FA a nivel intestinal, este proyecto también podría dejar abierta la posibilidad de desarrollo de nuevas estrategias para combatir afecciones de índole metabólico, como problemas malabsortivos, dislipemias, obesidad y diabetes.

## **3.2. - Resultados y Discusión**

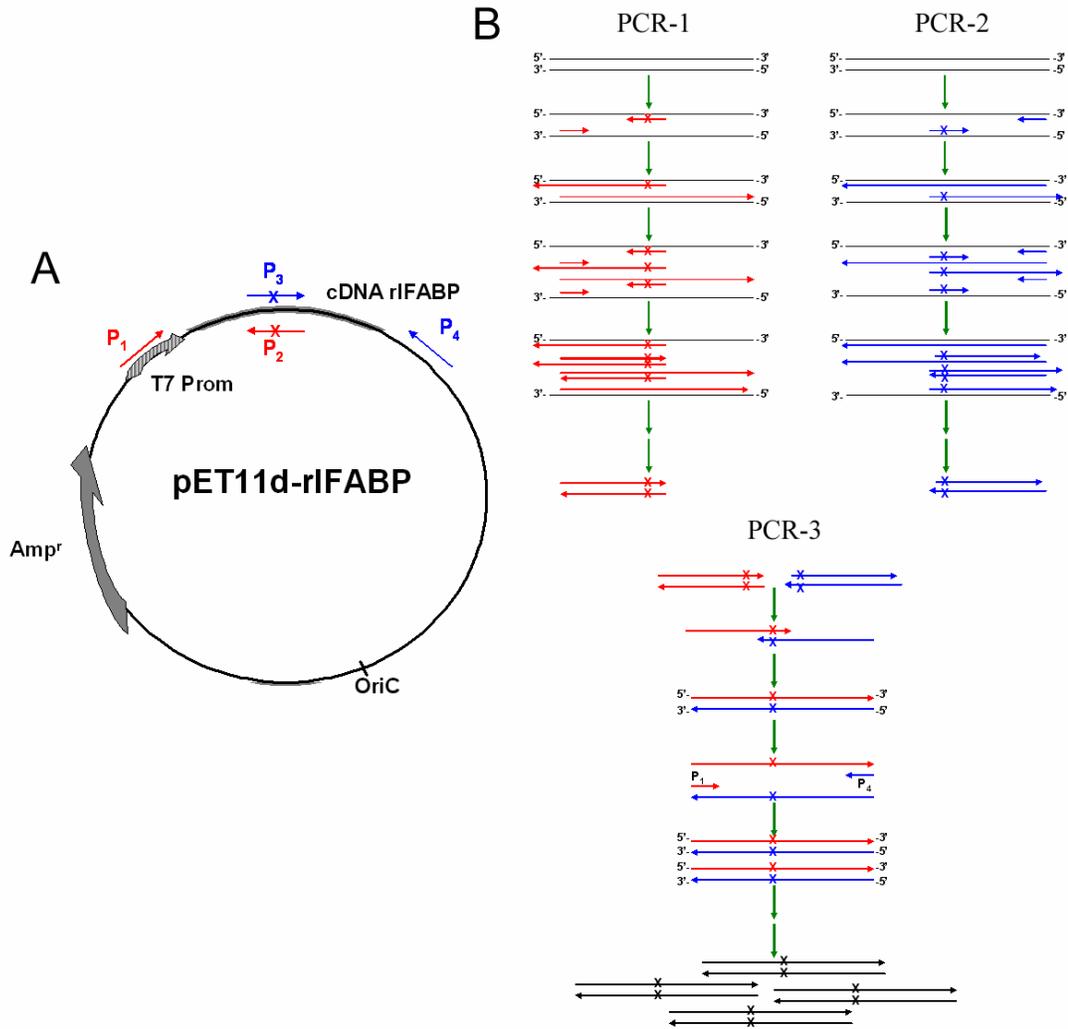
### **3.2.1. - Construcción de mutantes puntuales de IFABP**

Cómo se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la región  $\alpha$ -helicoidal y los residuos de Lys de la IFABP son de particular importancia en la transferencia de ligandos hidrofóbicos desde la proteína hacia membranas fosfolípicas. Teniendo esto en cuenta, y con el propósito de profundizar los conocimientos sobre las bases moleculares responsables de las diferencias funcionales entre I- y LFABP, se construyó la serie de mutantes puntuales de IFABP, analizados en el capítulo anterior, cambiando los cuatro residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal en forma independiente por Glu o Ile. También se incluyeron los mutantes del residuo de Lys<sup>92</sup>, que pertenece al barril- $\beta$ , a modo de control. Esto se logró introduciendo mutaciones de una o dos bases en la secuencia de cDNA de la IFABP de rata empleando la técnica de PCR de solapamiento (**Figura 3.1**) y los oligonucleótidos que se detallan en la **Tabla 3.1** como primers internos, junto a dos primers externos complementarios a las secuencias del vector que flanquean el sitio de clonado múltiple, Primer Externo-1 (*sense*) o P<sub>1</sub>: 5'-CGGATAACAATTCCCCTCTA-3'; y Primer Externo-4 (*antisense*) o P<sub>4</sub>: 5'-TTCCTTTCGGGCTTTGTTAG-3'.

**Tabla 3.1: Primers de oligonucleótidos empleados en la mutagénesis sitio dirigida**

<b>Mutante puntual de IFABP</b>	<b>Primer interno <i>sense</i> (P<sub>3</sub>)</b>
<b>K16I</b>	5'- GAACTATGAA <u>ATC</u> TTCATGGAGA -3'
<b>K16E</b>	5'- GAACTATGAA <u>GAG</u> TTCATGGAGA -3'
<b>K20I</b>	5'- TTCATGGAG <u>ATA</u> ATGGGCATT -3'
<b>K20E</b>	5'- TTCATGGAG <u>GAA</u> ATGGGCATT -3'
<b>K27I</b>	5'- AACGTGGTG <u>ATC</u> AGGAAGCTT -3'
<b>K27E</b>	5'- AACGTGGTG <u>GAG</u> AGGAAGCTT -3'
<b>K29I</b>	5'- GGTGAAGAGG <u>ATT</u> CTTGGAGCT -3'
<b>K29E</b>	5'- GGTGAAGAGG <u>GAG</u> CTTGGAGCT -3'
<b>K92I</b>	5'- CTTGTTGGA <u>ATA</u> TTCAAACGTG -3'
<b>K92E</b>	5'- CTTGTTGGA <u>GAA</u> TTCAAACGTG -3'

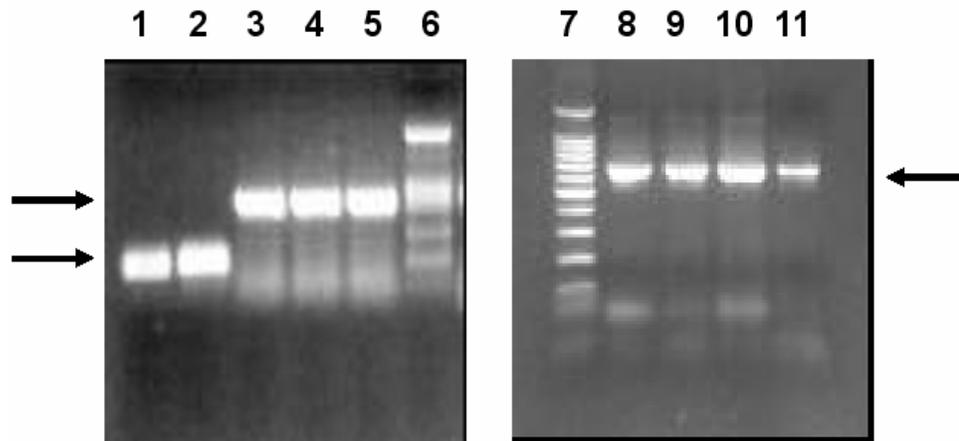
Primers internos *sense* (P<sub>3</sub>) empleados para construir los mutantes puntuales mediante PCR de solapamiento. Las mutaciones de simple o doble base están resaltadas en el codón que está subrayado. Los Primers internos *antisense* (P<sub>2</sub>) empleados fueron del mismo largo y complementarios a los primers *sense* en cada caso.



**Figura 3.1. - Técnica de mutagénesis sitio-dirigida.** Esquema de reacción de PCR de Solapamiento para la generación de mutantes puntuales. En el panel **A** se muestra la hibridación de los 2 pares de primers externos e internos con el vector que contiene el DNA molde. El panel **B** muestra las distintas etapas de la técnica y la obtención progresiva de los productos de PCR modificados.

En la **Figura 3.2** se observan los distintos productos de PCR intermedios en la construcción de uno de los mutantes puntuales en particular para evidenciar la lógica del procedimiento. Luego de obtenidos los productos de PCR con los cDNA mutantes, se trataron con las enzimas de restricción XbaI y BamHI y se purificaron de un gel de agarosa. Luego se ligaron en el vector pET11d, predigerido con las mismas enzimas de restricción que los productos de PCR, y purificado también de gel de agarosa. Los plásmidos así obtenidos fueron transformados inicialmente en *E.coli* JM109 (incapaz de

expresar el cDNA debido a la falta de la T7-RNAPol), se repicaron colonias aisladas y se chequeó la presencia del inserto adecuado en gel cortándolos con XbaI y BamHI. La presencia de las mutaciones deseadas fue verificada posteriormente por secuenciado bidireccional, con primers que hibridan con las secuencias del T7Promoter y el T7Terminator del vector.



**Figura 3.2. - PCR de solapamiento.** Geles de agarosa en los que se muestran los productos de PCR intermedios (flechas) en la obtención del mutante puntual K16I de IFABP. Calles 1 y 2 PCR-1; calles 3-5 PCR-2; calles 8-11 PCR-3. Las calles 6 y 7 contienen a los estándares de peso molecular conocido que sirven de referencia (100bp Ladder Standard, Invitrogen).

De este modo se obtuvieron los 10 mutantes puntuales de 5 residuos de Lys de la IFABP de rata, 4 de la región  $\alpha$ -helicoidal y el restante del barril- $\beta$ .

### 3.2.2. - Expresión y purificación de los mutantes puntuales de IFABP

Una vez confirmada la secuencia de los plásmidos recombinantes, se transforman en una cepa de *E.coli* capaz de expresar el cDNA mutante, como la BL21(DE3) que tiene incorporado en su genoma el gen de la T7-RNAPol bajo el promotor inducible del operón *lac*. Se repican colonias y se testea su capacidad de expresar las proteínas recombinantes en un screening de expresión (ver **Apéndice A**). Las colonias de mayor rendimiento se eligieron para la purificación de los mutantes puntuales y se guardaron como stocks de glicerol.

La expresión de las proteínas se realizó del mismo modo que con la proteína nativa, recuperando todas de las proteínas en la fracción soluble luego del sonicado y la ultracentrifugación que elimina los restos celulares; por lo que también se aplicó el mismo procedimiento para su purificación (ver **Apéndice A**). Brevemente, se realizó en primer lugar una precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 M que separa al grueso de las proteínas solubles mientras que se recuperan los mutantes de la fracción soluble, y a partir de esta se los purificó en su paso por la columna de exclusión molecular G-50. Una alícuota de cada paso se guarda para evaluar la eficiencia del procedimiento empleado y la pureza del producto final. La **Figura 3.3** muestra esquemáticamente la purificación de las FABP.

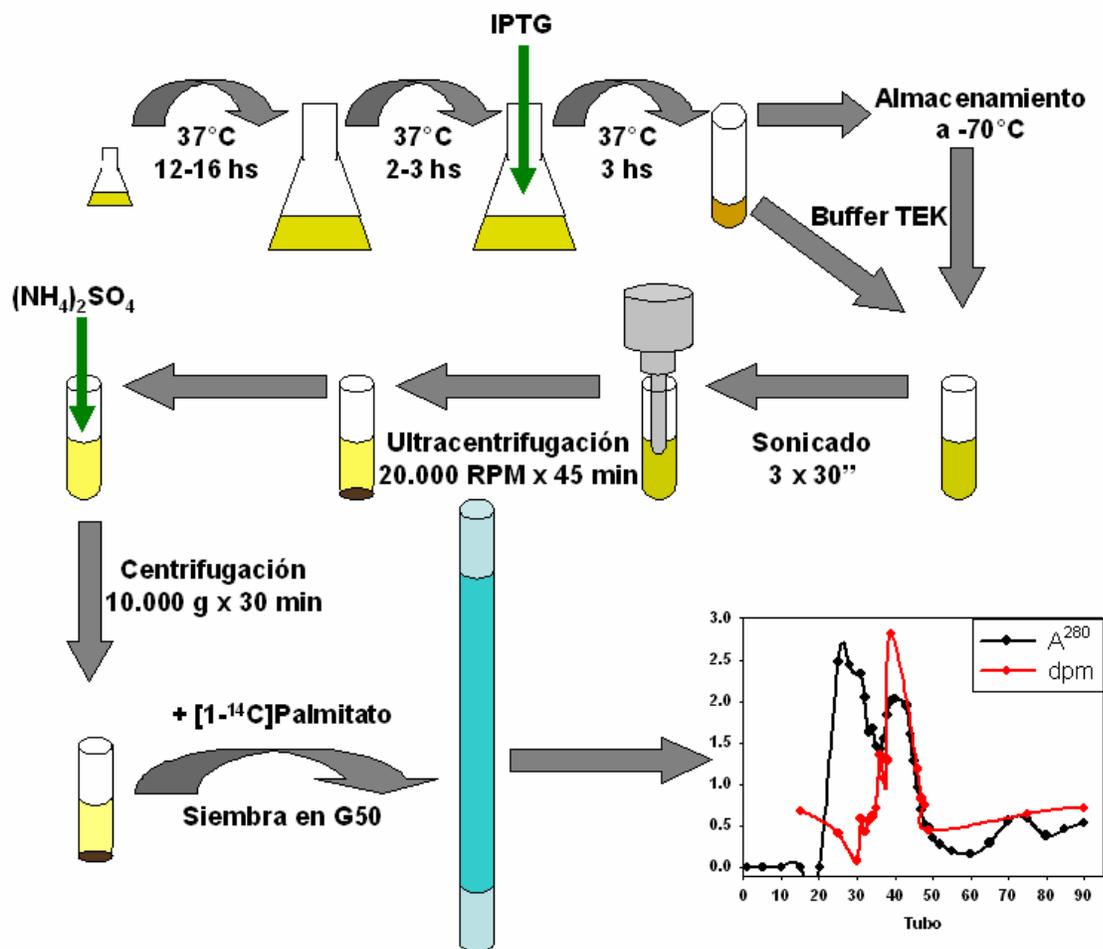
Las proteínas recombinantes se concentran a una concentración mayor a 1 mg/ml, se alícuotaron de a 500 y 1000  $\mu\text{l}$ , y se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  por más de un año sin pérdida de sus características iniciales.

### **3.2.3. - Controles estructurales de los mutantes puntuales de IFABP**

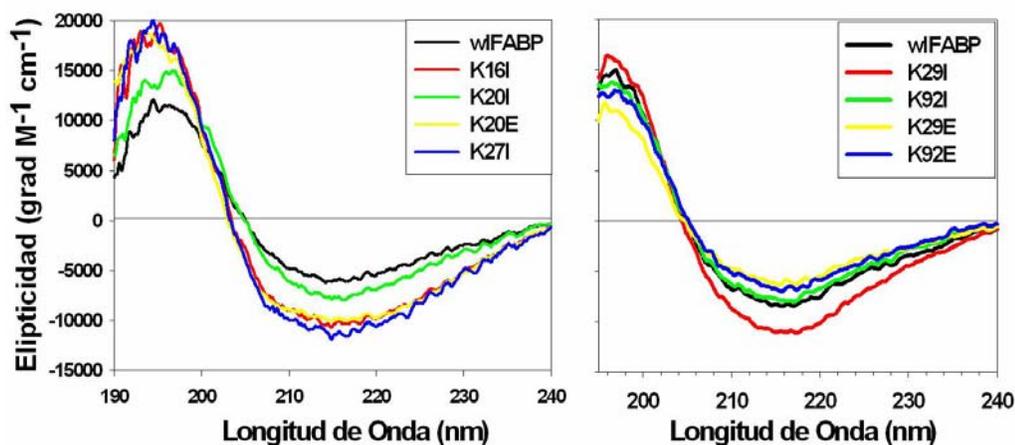
Debido a que se introdujeron variaciones no naturales en la estructura de IFABP es fundamental corroborar que ninguna aberración estructural fue inducida por las modificaciones realizadas. A partir de las simulaciones del Capítulo 2, la expresión y la purificación de las proteínas mutantes, tenemos indicios que indican que los mutantes puntuales se comportarían en forma fiel a la nativa, y esto se confirmó realizando una serie de experimentos destinados a corroborar su conformación, hidrofobicidad del sitio de unión y las capacidad de unión de ligandos absoluta y relativa:

---

**Figura 3.3. - Esquema de purificación de FABP.** (Página siguiente) El protocolo de purificación detallado en el **Apéndice A** se esquematiza en esta figura hasta la obtención de la proteína pura. La pureza luego se verifica por SDS-PAGE y se deslipidiza a través de la columna de interacción hidrofóbica LIPIDEX y se almacena a  $-70^\circ\text{C}$ .



**- Espectros del CD:** Se determinó el espectro de CD en el UV lejano de los mutantes puntuales y la proteína nativa. El espectro para ésta última coincide con los publicados anteriormente (Córsico, *Biochemistry* 2004; Clérico, *Biochim.Biophys.Acta* 2000) y el característico para todas las FABP en forma y amplitud, con un valle a 215 nm, típico de una estructura mayoritariamente beta. También se verificó un espectro de CD similar al de la proteína nativa (wtIFABP) para los mutantes puntuales (Figura 3.5). Las pequeñas diferencias en amplitud para algunos de los mutantes pueden deberse al error en la determinación de las concentraciones empleado para normalizar las señal de Elipticidad, y no a verdaderas alteraciones conformacionales. Los valores de Elipticidad Molar a 222 nm ( $\theta_{222}$ ) para cada una de las proteínas se muestran en la **Tabla 3.2**.

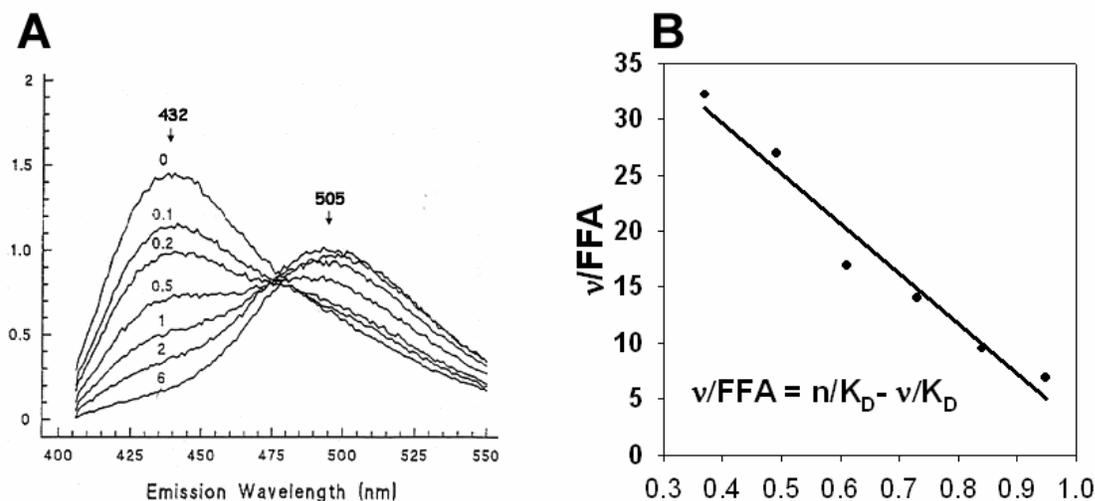


**Figura 3.5. - Controles estructurales de los mutantes puntuales de IFABP.** Los paneles **A** y **B** muestran los espectros de CD en el UV lejano de suspensiones 15 mg/ml de los mutantes puntuales de IFABP en comparación con el espectro de la proteína nativa.

- **Rendimiento cuántico:** Se midió el rendimiento cuántico ( $Q_f$ ) del fluoróforo 12AO unido a las proteínas nativa y mutantes, usando quinina-hemisulfato como fluoróforo de referencia, como medida de la hidrofobicidad relativa del entorno de del fluoróforo (Storch, *J.Biol.Chem.* 1989; Córscico, *Biochemistry* 2004). En todos los casos se registraron valores para los mutantes puntuales similares al de wtIFABP (**Tabla 3.2**), lo que indica que las modificaciones introducidas no han alterado el entorno dieléctrico del sitio de unión de ligandos.

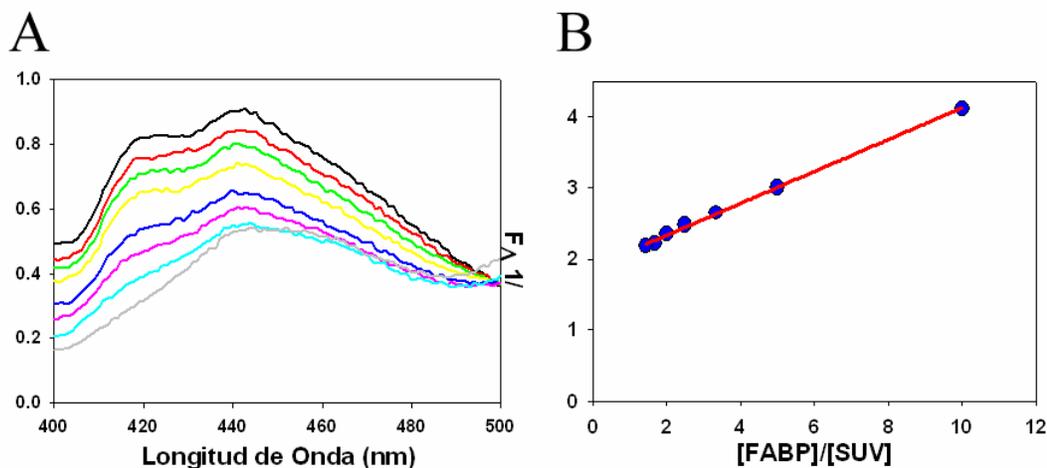
- **ADIFAB:** ADIFAB es una versión químicamente modificada de la IFABP nativa de rata con un grupo acrilodán fluorescente unido covalentemente, que sirve para estudiar la unión de ácido oleico (OA), por la inducción de un cambio en el espectro del acrilodán (Richieri, *J. Biol. Chem.* 1994). Conociendo la constante de disociación ( $K_D$ ) del ADIFAB para este ligando, pueden determinarse las afinidades para el equilibrio de unión de otras proteínas. El  $K_D$  obtenido para la unión de oleato a la IFABP nativa ( $37 \pm 1$  nM) está en concordancia con los valores ya publicados (Storch, *J.Biol.Chem.* 1989; Córscico, *Biochemistry* 2004). El estudio de los mutantes puntuales de IFABP demostró que todos poseen un único sitio de unión con  $K_D$  similares al de la proteína nativa (**Tabla 3.2**). La

**Figura 3.6** muestra un experimento modelo a partir del cual se calcula la  $K_D$  para las proteínas estudiadas.



**Figura 3.6.** – Determinación de la afinidad por OA empleando la sonda ADIFAB. El panel **A** muestra los espectros de ADIFAB a largo de una titulación con OA (tomado de Richieri et al. *J.Biol.Chem.* 1994). El panel **B** muestra una serie de datos procesados según se detalla en el Apéndice A para el cálculo de las  $K_D$ .

- **Coeficiente de partición ( $K_p$ ):** La determinación de las afinidades relativas del 12AO entre los mutantes puntuales y las EPC-SUV también sirve como un parámetro de la integridad del sitio de unión de ligandos. En la **Figura 3.7** se muestra la superposición de espectros de la titulación fluorimétrica (panel **A**) y el ajuste lineal de los datos transformados (panel **B**) (según se detalla en el **Apéndice A**) para uno de los mutantes puntuales de Lys a modo de ejemplo. Todos los mutantes mostraron valores similares al de la proteína nativa, evidenciando una preferencia del 12AO por las membranas fosfolipídicas respecto a las distintas variantes de IFABP (**Tabla 3.2**), en concordancia a los valores publicados anteriormente (*Thumser, J.Lipid Res.* 2000). Estos resultados muestran que el sitio de unión no ha sufrido alteraciones conformacionales significativas, pero además que pueden emplearse las mismas proporciones de SUV:proteína para configurar los ensayos de transferencia de ligandos que para la proteína nativa.



$$1/\Delta F = K_p \times 1/\Delta F_{\text{máx}} \times [\text{FABP}]/[\text{SUV}] + 1/\Delta F_{\text{máx}}$$

**Figura 3.7. - Determinación de  $K_p$ .** Ensayo de Partición de 12AO entre las FABP y EPC-SUV. El panel **A** muestra la superposición de espectros en los que se observa la disminución en la señal del 12AO con cada agregado de EPC-SUV sobre la solución del complejo preformado con la IFABP nativa o los mutantes puntuales. El panel **B** muestra el ajuste a la ecuación descrita en la el **Apéndice A**.

Las proteínas mutantes no muestran diferencias estructurales importantes al compararlas con la proteína nativa, como se observa en los espectros de CD en el UV-lejano, que dan cuenta de una estructura secundaria equivalente. Además se demostró un grado de hidrofobicidad aparentemente similar en el sitio de unión, así como afinidades por oleato y 12AO muy parecidas entre sí y con la IFABP nativa. Así, todos los mutantes se pliegan correctamente y presentan un único sitio de unión de FA. La estabilidad de los mutantes puntuales no era inesperada, ya que mutantes puntuales de otros miembros de la familia FABP también fueron notablemente fieles en su comportamiento (*Herr, Biochemistry 1996; Liou, J.Biol.Chem. 2002*). Incluso la modificación covalente de distintos grupos covalentes dentro de la estructura de la IFABP no alteraron sus propiedades de plegado o de unión (*Richieri, J.Biol.Chem. 1994*). La ausencia de efectos sobre el sitio de unión de ligandos también era esperable, ya que no se modificaron residuos directamente vinculados a dicha región. Tomando todos estos resultados juntos (Tabla 3.2), puede concluirse que los mutantes puntuales de IFABP no presentan alteraciones conformacionales significativas, en particular del sitio de unión de ligandos, en comparación con la proteína nativa. Vinculado a esto, también vale resaltar que los residuos de Lys mutados no son críticos para

el plegamiento de la proteína ni contribuyen a las propiedades de unión de ligandos de la IFABP.

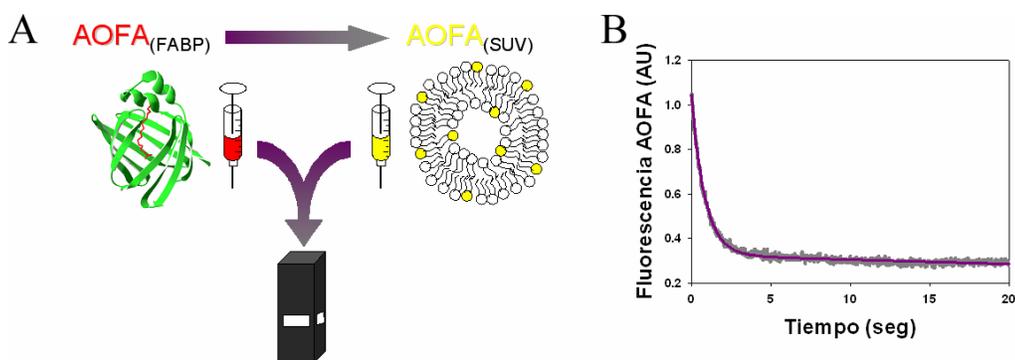
**Tabla 3.2: Resultados de la caracterización estructural de IFABP nativa y mutantes puntuales.**

Proteína	$\theta_{222}$ ( $\text{grad M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$K_D$ (nM) (ADIFAB)	$K_p$ ( $[\text{IFABP}]/[\text{SUV}]$ )	$Q_f$
wIFABP	-5265	$37 \pm 1$	$0,080 \pm 0,036$	$0.08 \pm 0.02$
K16I	-9026	$45 \pm 1$	$0,046 \pm 0,012$	$0.08 \pm 0.03$
K16E	ND	$32 \pm 6$	0,077*	$0.08 \pm 0.02$
K20I	-7662	$40 \pm 7$	$0,054 \pm 0.002$	$0.11 \pm 0.04$
K20E	-9883	$41 \pm 16$	0,050*	$0.11 \pm 0.03$
K27I	-9887	$35 \pm 3$	$0,085 \pm 0,029$	$0.14 \pm 0.04$
K27E	ND	$57 \pm 2$	0,068*	$0.07 \pm 0.02$
K29I	-8683	28*	0,052*	$0.15 \pm 0.04$
K29E	-4583	21*	0,069*	$0.18 \pm 0.05$
K92I	-4994	49*	ND	$0.12 \pm 0.07$
K92E	-5839	61*	0,105*	$0.13 \pm 0.07$

Parámetros estructurales empleados para evaluar el correcto plegamiento de los mutantes puntuales de IFABP. El espectro de Dicroísmo Circular, la unión de oleato por ADIFAB, la constante de partición ( $K_p$ ) y el rendimiento cuántico fueron determinados como se describió en las secciones de Materiales y Métodos de este Capítulo. Promedios de 3 determinaciones independientes  $\pm$  SD, excepto cuando se indica lo contrario. ND, No Determinado. \* Valores de determinaciones únicas

### 3.2.4. - Transferencia de 12AO desde mutantes puntuales de IFABP

Sabiendo que los mutantes puntuales de los residuos de Lys se pliegan normalmente y unen FA en forma equivalente a la IFABP nativa, se estudió el efecto de dichas mutaciones sobre las propiedades de transferencia de ligandos hacia membranas fosfolipídicas artificiales. Empleando un ensayo de transferencia de energía de resonancia (FRET) (**Figura 3.8**), se estudió la transferencia del antroiloxi-derivado del ácido oleico (12AO) hacia vesículas fosfolipídicas, que contienen el aceptor FRET NBD-PC, de distinta composición y a distintas concentraciones para determinar el mecanismo de transferencia para cada una de las mutaciones.



**Figura 3.8. - Ensayo de transferencia de AOFA.** En el panel **A** se muestra un esquema del ensayo cinético de transferencia de energía de resonancia que permite analizar la transferencia de derivados fluorescentes de FA entre FABP y membranas modelo. El panel **B** muestra los datos de fluorescencia en función del tiempo, y su ajuste a una exponencial simple de 3 parámetros a partir del cual se obtiene la velocidad de transferencia de los AOFA.

### 3.2.4.1. - Efecto de la concentración de EPC-SUV.

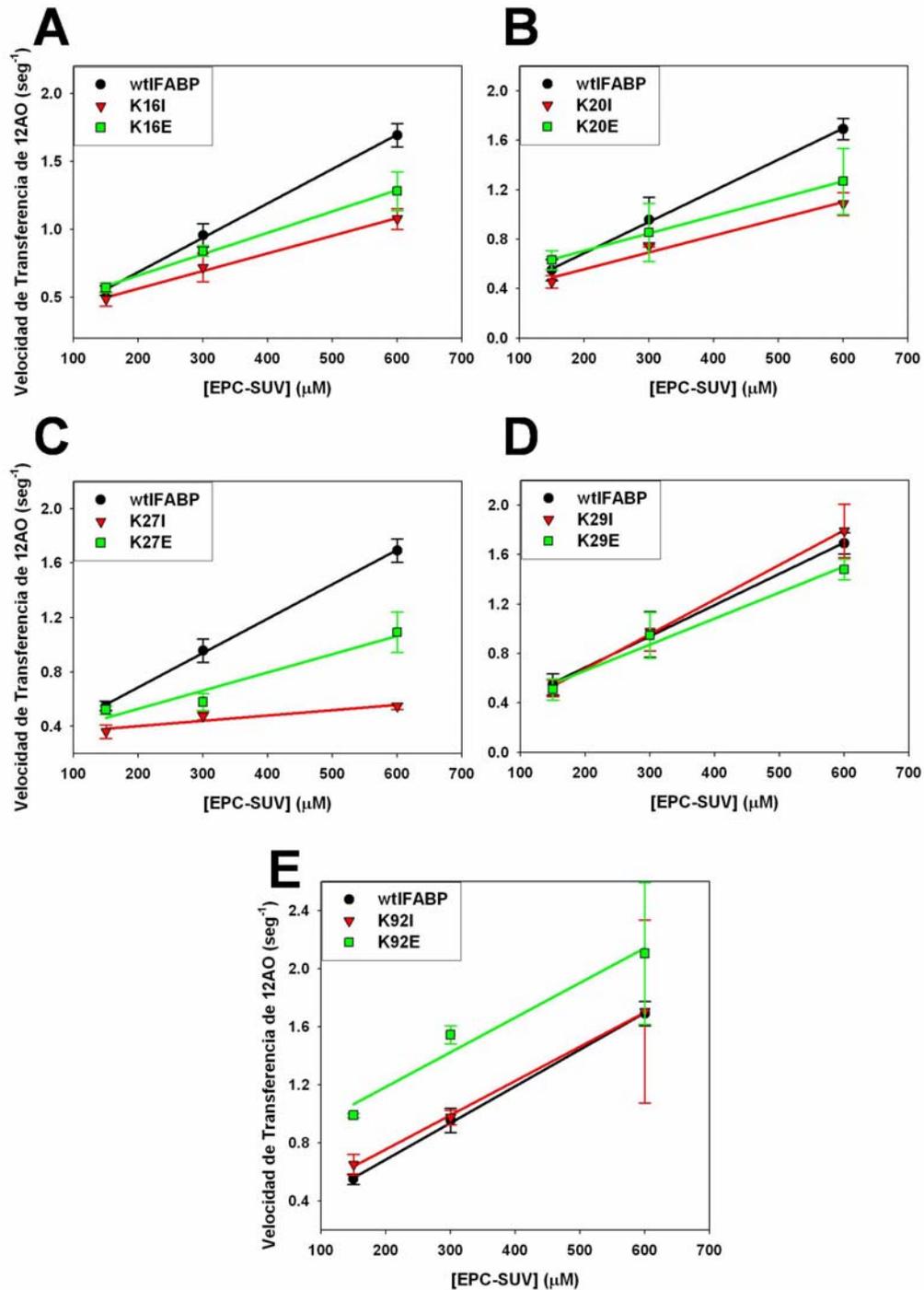
El efecto de la concentración de las membranas fosfolípicasceptoras sobre la velocidad de transferencia de ligandos ha sido empleado para distinguir entre el mecanismo de difusión acuosa, para el cual no se observan cambios, y el mecanismo colisional, para el cual se observa un aumento proporcional de la velocidad de transferencia con el aumento de la concentración de vesículas (Wootan, *Biochemistry* 1993; Kim, *J.Biol.Chem.* 1992; Wootan, *J.Biol.Chem.* 1994; Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Córscico, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1998; Córscico, *Biochemistry* 2004; Córscico, *J.Lipid Res.* 2005; Franchini, *Biochim.Biophys.Acta* 2008). Para distinguir entre ambos mecanismos, se examinó la transferencia de AOFA desde las proteínas mutantes hacia membranas zwitteriónicas como función de la concentración creciente de SUV y se analizaron en comparación con el comportamiento que muestra la proteína nativa, un ejemplo de FABP colisional bien caracterizada que presenta un mecanismo colisional (Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Córscico, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1998; Córscico, *Biochemistry* 2004; Córscico, *J.Lipid Res.* 2005).

La **Figura 3.9** muestra los resultados obtenidos para la proteína nativa y los mutantes cuando una concentración fija del complejo donador FABP:AOFA 10:1 (1,5  $\mu$ M 12AO final) se mezcló con concentraciones crecientes de EPC-SUV. La

IFABP nativa mostró un incremento proporcional de la velocidad de transferencia, desde  $0.56 \pm 0.10 \text{ seg}^{-1}$  hasta  $1.69 \pm 0.17 \text{ seg}^{-1}$ , hacia 150 y 600  $\mu\text{M}$  SUV respectivamente, en buena concordancia con los datos antes publicados (Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Córscico, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1998). Todos los mutantes puntuales examinados exhibieron también un incremento aparentemente proporcional de la velocidad de transferencia de 12AO en función de la concentración de vesículas. Esto sugiere que todos mantuvieron el mecanismo colisional de transferencia de FA característico de la wtIFABP. Sin embargo, la posición de la Lys original modificada fue determinante al momento de definir la velocidad absoluta de transferencia de 12AO. La velocidad de transferencia desde los mutante de la región  $\alpha$ -I fue menor a los de la wtIFABP (panel **A** y **B**). En ambos casos se observó un mayor efecto cuando se substituyeron las Lys<sup>16</sup> y Lys<sup>20</sup> por Ile (descenso aproximado del 36%) que al reemplazados por Glu (descenso aproximado del 25%). Notablemente, las mutaciones de neutralización de la carga en las posiciones 16 y 20 produjeron el mismo efecto, y lo propio se observó con los mutantes de reversión de la carga.

En contraste con los mutantes de la región  $\alpha$ -I, el comportamiento de los mutantes de la región  $\alpha$ -II fue divergente (**Figura 3.9**, paneles **C** y **D**). El mayor impacto entre todos los mutantes fue el registrado para el mutante K27I, que mostró un descenso de hasta el 70% en la velocidad de transferencia de 12AO hacia EPC-SUV relativo a la wtIFABP. Para la posición 27 también se observó un efecto mayor en el caso del K27I que para el mutante de reversión K27E. Por otro lado, la velocidad de transferencia de 12AO desde los mutantes K29I y K29E no mostró diferencias significativas con respecto a la wtIFABP.

En el caso de los controles de mutación sobre el residuo del barril- $\beta$  Lys<sup>92</sup>, el mutante K92I no mostró diferencias al comportamiento de la wtIFABP. Inesperadamente, si se observó para el mutante de reversión K92E un aumento significativo de la velocidad de transferencia de 12AO a bajas concentraciones de EPC-SUV (**Figura 3.9**, panel **E**).



**Figura 3.9. - Efecto de la Concentración de SUV sobre la velocidad de transferencia de AOA.** Un aumento de la concentración de EPC-SUV induce un aumento proporcional sobre la velocidad de transferencia de 12AO desde wtIFABP. En los distintos paneles se muestra, en comparación con la proteína nativa, el efecto de las mutaciones puntuales de neutralización y de reversión de las Lisinas de la región  $\alpha$ -helicoidal Lys<sup>16</sup>, Lys<sup>20</sup>, Lys<sup>27</sup> y Lys<sup>29</sup>, en los paneles **A**, **B**, **C** y **D** respectivamente. También se muestra en el panel **E** el efecto de las mismas mutaciones sobre la Lys92 que forma parte del barril- $\beta$ . \*  $p < 0,05$

Estos resultados confirman el carácter colisional de la IFABP y establecen que ninguno de los residuos de Lys analizados por sí solo es responsable de la sensibilidad a la concentración de las vesículas zwitteriónicas, mucho menos por el mecanismo de transferencia de ligandos. Sí se observan modulaciones de las velocidades absolutas de transferencia. En particular, se observa que existe un componente electrostático importante en la interacción de la proteína con las vesículas, ya que la reversión de una carga superficial positiva de la IFABP generalmente se traduce en una disminución menor de la velocidad de transferencia de 12AO hacia vesículas zwitteriónicas que si se introduce una neutralización.

### **3.3.4.2. - Efecto de la composición de las SUV.**

Cambios en la carga superficial de las vesículas aceptoras también pueden influenciar la velocidad de transferencias de los ácidos grasos si están involucradas interacciones electrostáticas entre la proteína donora y la membrana aceptora en el paso limitante del proceso, es decir en el mecanismo colisional. Sin embargo, en el caso de la difusión acuosa, no se esperaría que las características de la membrana aceptora modularan la velocidad de transferencia. En la **Figura 3.10** se muestra la velocidad de transferencia de 12AO desde las IFABP nativa y mutantes hacia vesículas de distinta composición, es decir de distinta carga superficial. Como se esperaba, se produce un aumento substancial de la velocidad de transferencia de 12AO desde la wtIFABP por la incorporación de un 25 mol% de PS o CL en las SUV zwitteriónicas, efecto que ya fue observado también anteriormente (*Wootan, Biochemistry 1993; Córscico, Proc.Natl.Acad.Sci. 1998; Córscico, Biochemistry 2004; Córscico, J.Lipid Res. 2005*). Se observó la casi duplicación de la velocidad de transferencia de 12AO hacia PS-SUV, desde  $0.56 \pm 0.10$  a  $0.93 \pm 0.05 \text{ seg}^{-1}$  hacia  $150 \mu\text{M}$  EPC-SUV y PS-SUV, respectivamente. La incorporación de un 25 mol% de CL en las membranas aceptoras resultaron en un incremento dramático del 8 veces respecto a la velocidad de transferencia hacia membranas fosfolipídicas.

En la **Figura 3.10** (panel **A**) se muestran las velocidades de transferencia para los mutantes de la hélice  $\alpha$ -I y la wtIFABP hacia vesículas conteniendo PS o CL, normalizadas a la velocidad de transferencia hacia EPC-SUV para cada proteína. En general, los mutantes puntuales de las posiciones 16 y 20 muestran un descenso moderado de la sensibilidad por la carga negativa de las SUV. La incorporación de CL en las SUV aceptoras resultó en un incremento de entre 3 y 4 veces la velocidad de transferencia de 12AO respecto a las EPC-SUV, en comparación al aumento de 8 veces observado en las mismas condiciones para la transferencia desde wtIFABP. La mutante K16I mostró la mayor diferencia, causando un aumento de sólo 2 veces en la velocidad de transferencia de 12AO hacia CL-SUV. Además, sólo éste mutante mostró diferencias significativas en la transferencia hacia vesículas conteniendo un 25 mol% de PS.

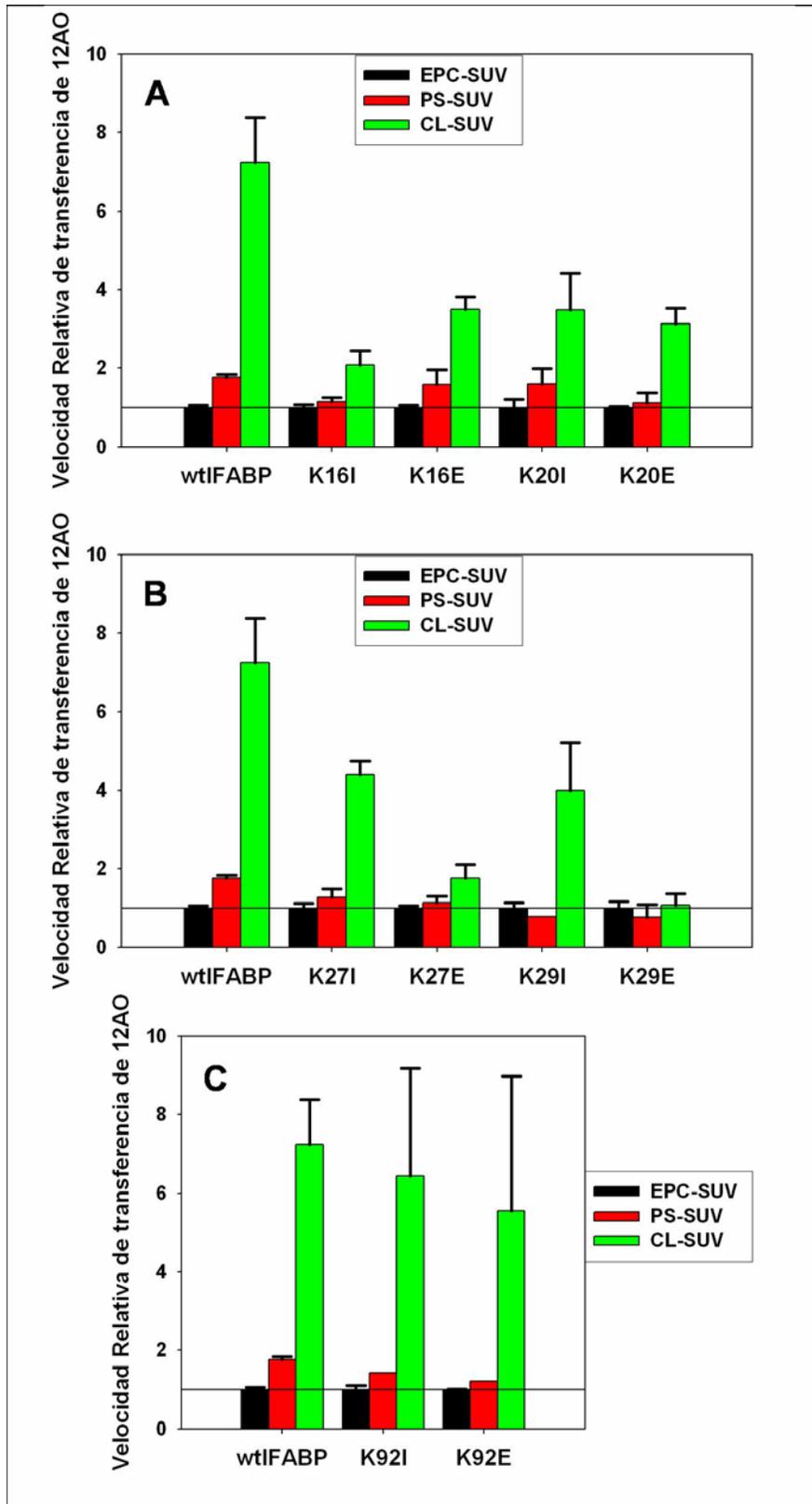
Los mutantes puntuales de la región  $\alpha$ -II mostraron un patrón consistente al comparar la neutralización y la reversión de las cargas de las Lys<sup>27</sup> y Lys<sup>29</sup> respecto a la wtIFABP. La neutralización no indujo un descenso significativo de la velocidad de transferencia de AOFA hacia PS-SUV o CL-SUV (**Figura 3.10**, panel **B**), comparado con el aumento que evidencia la proteína nativa. Además, al igual que para la wtIFABP, ambos mutantes de neutralización de la hélice  $\alpha$ -II (K27I y K29I) mostraron un aumento significativo en la transferencia de 12AO hacia CL-SUV respecto a las EPC-SUV. Por otro lado, los mutantes de reversión de la hélice  $\alpha$ -II mostraron un descenso substancial en la velocidad de transferencia hacia membranas cargadas negativamente respecto a la proteína nativa. Los cambios más drásticos se observaron en la transferencia hacia CL-SUV, para los cuales se observó un descenso del 78% y del 86% ( $p < 0,01$ ) desde K27E y K29E respectivamente, comparada con la velocidad de transferencia de la wtIFABP. En efecto, la reversión de la carga de los residuos Lys<sup>27</sup> y Lys<sup>29</sup> resultó en la pérdida de la sensibilidad a la carga superficial de las membranas fosfolipídicas aceptoras, como se evidencia al no observar diferencias significativas en la transferencia de AOFA hacia vesículas de distinta composición, y confirmado por análisis de varianza ( $p < 0,05$ ).

Las mutaciones control del residuo de Lys<sup>92</sup> tienen pequeño efecto en la velocidad absoluta de transferencia de 12AO hacia membranas de distinta composición, y prácticamente no hay cambios en la sensibilidad a la carga superficial de las vesículas (**Figura 3.10**, panel **C**).

Estos resultados resaltan la importancia de las interacciones electrostáticas en la transferencia colisional de FA hacia membranas fosfolípídicas, y en especial de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de la proteína. Los cambios en la composición de los lípidos también podrían afectar otras propiedades de las vesículas aceptoras como el tamaño, la curvatura, la formación de dominios de composición diferencial, la fluidez, etc. Pero la mayoría de estas posibilidades ya han sido descartadas en trabajos previos. En nuestro laboratorio hemos demostrado las SUV obtenidas con la metodología aquí descrita resultan en una única población de vesículas sin cambio en el tamaño o la curvatura de las mismas para un rango de composición aún más amplio del empleado en este trabajo de tesis, siempre y cuando se mantenga el número de cadenas aciladas, es decir sin lisofosfolípidos en la composición (*Córsico, J.Lipid Res. 2005*). La formación de dominios tampoco era de esperarse bajo las condiciones empleadas en estos experimentos según estudios de estabilidad de membranas (*Shibata, Biochim.Biophys. Acta. 1994.*), dejando como factor más importante solamente a las cargas superficiales netas de las SUV aceptoras.

---

**Figura 3.10 – Efecto de la Composición de las SUV aceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA.** Un aumento de la carga superficial neta negativa de las SUV aceptoras induce un aumento de la velocidad de transferencia de 12AO desde wtIFABP. En los distintos paneles se muestra, en comparación con la proteína nativa, el efecto sobre los mutantes puntuales de neutralización y de reversión según la región de la proteína de cada residuo,  $\alpha$ -I,  $\alpha$ -II y barril- $\beta$  en los paneles **A**, **B** y **C**. \*  $p < 0,05$  (página siguiente)



Sin embargo, la carga negativa no puede explicar por sí sola el abrupto aumento de la velocidad de transferencia de 12AO observado hacia CL-SUV en comparación con las EPC-SUV o PS-SUV, algún otro factor podría estar modulando el comportamiento de la proteína en la interfase con la membrana durante la interacción específica con la cabeza polar de la CL. Esto nos podría estar dando un indicio de que la distribución espacial de cargas a nivel molecular puede tener gran relevancia en el mecanismo de transferencia de AOFA desde la IFABP. Esta hipótesis debe ser más profundamente estudiada, y para ello la obtención de los modelos moleculares de los mutantes puntuales de IFABP (**Capítulo 2**) será de gran importancia en estudios *in silico* de dinámica molecular. Otra posibilidad es que debido a la distinta forma de los fosfolípidos pueden variar las presiones laterales que permitan un mayor o mejor encastre del FA durante el proceso de transferencia.

### **3.3. - Conclusiones**

Estudios previos han indicado que los FA son transferidos desde la IFABP en forma colisional hacia las membranasceptoras (Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996), un mecanismo que también ha sido identificado para varias otras FABP examinadas, incluyendo la HFABP, AFABP, KFABP, BFABP y MFABP (Herr, *Biochemistry* 1995; Herr, *Biochemistry* 1996; Liou, *Biochemistry* 2001; Liou, *J.Biol.Chem.* 2002). En contraste, otros miembros de la familia FABP exhiben un mecanismo de difusión acuosa en la transferencia de ligandos, entre los que resaltan LFABP, LbFABP y la CRBP II (Hsu, *J.Biol.Chem.* 1996; Kim, *J.Biol.Chem.* 1992; Di Pietro, *Biochemistry* 2003; Herr, *J.Biol. Chem.* 1999). Estudios más recientes demostraron la importancia de los residuos cargados positivamente en las interacciones electrostáticas con membranas fosfolipídicas en el caso de las FABP colisionales (Herr, *Biochemistry* 1995; Herr, *Biochemistry* 1996; Liou, *Biochemistry* 2001), y en particular, la acetilación total de la IFABP elimina completamente la sensibilidad a la carga superficial de las membranasceptoras (Córscico, *J.Lipid Res.* 2005). Esto resalta la importancia de las interacciones electrostáticas en la formación del complejo de transición junto con las membranas durante la transferencia de FA.

El análisis topológico de los potenciales electrostáticos superficiales de varias FABP muestra como común denominador un potencial neto positivo a través del dominio portal  $\alpha$ -helicoidal entre las FABP colisionales (LiCata, *Proteins Struc.Funct,Gen.* 1998), que apoya la idea de que esta región es importante en las interacciones con las membranas. En contraste, la presencia de un potencial mixto en la región  $\alpha$ -helicoidal de LFABP (LiCata, *Proteins Struc.Funct,Gen.* 1998) y LbFABP (Di Pietro, *Biochemistry* 2003) podría ser una de las causas de que dicha interacción no ocurra para estas proteínas. Cabe mencionar que las  $\alpha$ -hélices de IFABP, HFABP y AFABP son, además, anfipáticas, mientras que las de LFABP, LbFABP y CRBP II no lo son. Las hélices anfipáticas son motivos estructurales reconocidos por su importancia en el direccionamiento de proteínas hacia membranas, y las características eléctricas de la hélice se cree que pueden modular la interacción con los fosfolípidos de membrana (Anantharamaiah, *The Amphipathic Helix* 1993). Además, estudios de

NMR y cristalográficos han demostrado que la región portal de IFABP muestra un mayor grado de cambio conformacional entre las forma Apo- y Holo- (Hodsdon, *Biochemistry* 1997 (a) y (b); Frieden, *Biochemistry* 1995); y también se han registrado cambios similares entre apo- y holo-LFABP (He, *Biochemistry* 2007).

Teniendo todo esto en cuenta, estas observaciones han enfocado nuestra atención sobre la región portal de las FABP intestinales. Los estudios con la variante estructural carente de la región  $\alpha$ -helicoidal, Helixless-FABP, mostraron la casi completa eliminación del mecanismo colisional de transferencia de FA, así como una marcada disminución de la capacidad de interacción con membranas (Córsico, *Proc.Natl.Acad. Sci.* 1998; Wu, *Biochemistry* 2001). Además, hemos diseñado una serie de proteínas quiméricas de la región  $\alpha$ -helicoidal entre IFABP y LFABP, con las cuales se ha demostrado que este dominio determina el mecanismo distintivo de transferencia de ligandos hacia membranas de estas FABP (Córsico, *Biochemistry*, 2004; Franchini, *Biochim.Biophys.Acta* 2008). En el presente trabajo hemos examinado los efectos que tienen la eliminación o la reversión de la carga de los residuos de Lys del dominio  $\alpha$ -helicoidal de IFABP, a fin de comprender mejor las bases estructurales responsables del mecanismo colisional de transferencia de IFABP.

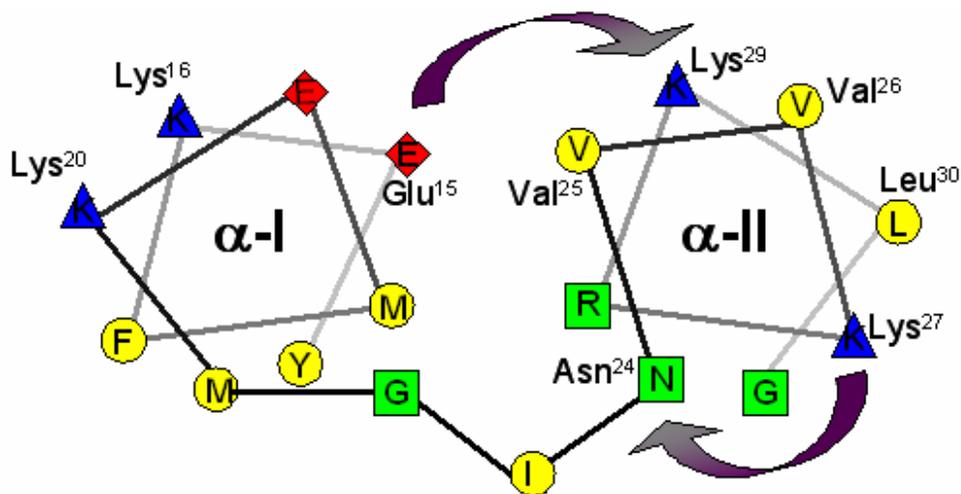
Los mutantes puntuales de IFABP generados no mostraron ninguna aberración conformacional al compararlos con la wtIFABP en los ensayos *in silico* (ver **Capítulo 2**). Además, la evidencia experimental extraída de los espectros de CD en el UV-lejano, el aparente grado similar de hidrofobicidad del sitio de unión (Qf), la constante de afinidad aparente por el ácido oleico ( $K_D$ ), así como la afinidad relativa por 12AO entre las proteínas y membranas ( $K_P$ ) confirma que todos los mutantes están correctamente plegados luego de su expresión y purificación. La estabilidad estructural de los mutantes no era algo inesperado, ya que mutaciones puntuales de otros miembros de la familia de FABP también han sido notablemente estables (Herr, *Biochemistry* 1996; Liou, *J.Biol. Chem.* 2002). La ausencia de efecto sobre el sitio de unión de ligandos también era esperada, ya que ninguno de los residuos modificados participa del mismo. En general, podemos concluir que los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal no contribuyen

a las propiedades del equilibrio de unión de ligandos de IFABP, y que ninguno de los mutantes puntuales es crítico para el correcto plegamiento de la proteína.

La neutralización de la carga de sólo 3 de las Lys del dominio  $\alpha$ -helicoidal (K16I, K20I y K27I) disminuye la velocidad de transferencia de FA hacia membranas zwitterónicas al compararlos con la wtIFABP. El efecto más marcado se registro para la K27I, disminuyendo drásticamente la sensibilidad a la concentración de vesículas. En los casos de K29I y K92I el comportamiento es indistinguible del de la proteína nativa frente a las vesículas zwitterónicas. Por otro lado, el mutante K27E mostró un comportamiento intermedio entre el mutante K27I y la proteína nativa, mientras que para los mutante K29E y K92E no se observaron cambios significativos. Modificaciones en las dos Lys de la  $\alpha$ -I inducen cambios muy similares en la cinética de transferencia de FA, sin mayor importancia de cuál es la posición afectada. Así, la neutralización de la carga en los residuos 16 y 20 disminuye la velocidad de transferencia de ligandos hacia EPC-SUV. Sin embargo, la reversión de las carga de los mismos residuos mostraron el mismo desvío pero en menor magnitud al compararlos con la proteína nativa. Es posible que al mantener el carácter anfipático de la  $\alpha$ I-hélice resulta en un comportamiento más similar al de la proteína nativa, mientras que la disrupción de la polaridad de la  $\alpha$ I-hélice por la incorporación de los residuos de Ile en la cara hidrofílica interferiría con su posible interacción con las membranas.

El drástico aumento en la velocidad de transferencia de AOFA desde la wtIFABP hacia CL-SUV es limitado a un aumento de sólo 2 a 4 veces la velocidad de transferencia desde la proteína nativa para los mutantes puntuales de  $\alpha$ I; indicando que la pérdida de la carga positiva de estos residuos disminuyó la sensibilidad a la carga de las membranas aceptoras. Además, en contraste a lo que ocurre frente a las vesículas zwitterónicas, en la transferencia hacia vesículas con carga superficial negativa, mantener o no la anfipaticidad de la hélice  $\alpha$ -I no muestra diferencias significativas entre sí. Esto sugiere la importancia de las interacciones entre residuos catiónicos con fosfolípidos negativos. En el caso de la  $\alpha$ -II, las interacciones electrostáticas parecen ser aún más importantes para las propiedades de transferencia de FA. Para ambos

mutantes de reversión de  $\alpha$ -II (K27E y K29E), la sensibilidad a la carga superficial de las vesículas aceptoras se ha perdido casi por completo en relación al comportamiento de la wtIFABP, probablemente evidenciando repulsión electrostática entre los Glu y los grupos ácidos de la membrana. En contraste, las mutaciones de neutralización de  $\alpha$ -II resultaron en la disminución en menos de 2 veces la sensibilidad de la proteína a la carga negativa de la membrana aceptora. Esta diferencia sistemática y significativa observada entre los mutantes de reversión y de neutralización resalta la importancia de las interacciones electrostáticas entre la  $\alpha$ -II y las membranas fosfolipídicas, y sugiere que la cara cargada de la hélice  $\alpha$ -II es crítica para la interacción con las vesículas, responsable del drástico aumento en la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP hacia membranas aniónicas.



**Figura 3.11. - Dominio helicoidal de IFABP.** La figura muestra la posición relativa de los residuos Tyr<sup>14</sup> al Gly<sup>31</sup> que forman el motivo hélice-vuelta-hélice que se cree funciona como “tapa” del barril- $\beta$ . Se especificaron los residuos que se citan a lo largo de la discusión. En particular, las flechas muestran las interacciones de largo alcance en las que participan los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -II. Los triángulos azules corresponden a residuos cargados positivamente, los rombos rojos a los cargados negativamente, los cuadrados verdes a los residuos polares, y los círculos amarillos a los residuos hidrofóbicos.

La mayor velocidad de transferencia de AOFA registrada para los mutantes de neutralización comparada con los de reversión podría ser también consecuencia de la contribución de los residuos Ile<sup>27</sup> e Ile<sup>29</sup> al único parche

hidrofóbico descrito en la superficie de la estructura terciaria de IFABP, formado por los residuos hidrofóbicos de  $\alpha$ -II Val<sup>25</sup>, Val<sup>26</sup> y Leu<sup>30</sup> (**Figura 3.11**) que miran hacia el medio acuoso (*Scapin, J. Biol. Chem. 1992*). En nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente las interacciones electrostáticas tanto como de las interacciones hidrofóbicas contribuyen al mecanismo colisional de transferencia de FA (*Córsico, J.Lipid Res. 2005*). Así, un aumento del carácter hidrofóbico de  $\alpha$ -II podría compensar en cierto modo la pérdida de interacciones electrostáticas con las membranas acídicas debido a las mutaciones de Lys<sup>27</sup> y Lys<sup>29</sup> por Ile.

La hélice  $\alpha$ -II es un elemento estructural clave del posible dominio portal para la entrada y salida de los ligandos y forma interacciones de largo alcance con las giros- $\beta$  entre las hojas- $\beta$  C y D, y E y F. Los resultados acá expuestos apoyan la idea de que esta estructura también participa del proceso de transferencia de ligandos. Notablemente, los estudios estructurales muestran que la porción final de  $\alpha$ -II y el giro- $\beta$  entre C y D son las regiones de la proteína que más diferencia muestran entre las forma apo- y holo- de IFABP. Ambas mostraron mayor grado de desorden en la ausencia de ligando unido y menor número de interacciones de largo rango. Esto podría estar sugiriendo que durante la entrada o salida del ligando, un cambio conformacional podría estar ocurriendo en estas regiones de la proteína, permitiendo al ligando pasar a través del dominio portal. Además, mutaciones en la hélice  $\alpha$ -II y el giro- $\beta$  entre C y D de HFABP y AFABP alteraron la velocidad de transferencia de AOFA hacia membranas, también indicando la participación en el mecanismo colisional de transferencia en estas proteínas (*Herr, Biochemistry 1996; Liou, Biochemistry 2001*). En el caso de IFABP, las mutaciones en la Lys<sup>27</sup> muestran los mayores cambios en respuesta tanto a la concentración y a la carga superficial de vesículas aceptoras. La neutralización de Lys<sup>27</sup> disminuyó marcadamente la sensibilidad a la concentración de las vesículas pero mantuvo la sensibilidad a la carga de las mismas, mientras que la sustitución por Glu elimina la sensibilidad a la carga superficial de las membranas manteniendo cierta sensibilidad a su concentración, probablemente secundario a una menor capacidad de interacción con las membranas. La estructura terciaria de la IFABP muestra que la cadena lateral de la Lys<sup>27</sup> está orientada sobre el dominio portal, y su posición es

significativamente distinta entre las conformaciones apo- y holo- de IFABP (*Scapin, J. Biol. Chem. 1992; Sacchettini, J. Biol. Chem. 1992*). En la holo-proteína se encuentra orientado a través del dominio portal, formando una interacción con el residuo de Asn<sup>24</sup> (Asparagina) que está ubicada al final de la vuelta entre las dos hélices. En cambio, en la Apo-proteína, la cadena lateral de la Lys<sup>27</sup> apunta hacia el exterior de la molécula. La substitución de la Lys<sup>27</sup> es probable que modifique la interacción con Asn<sup>24</sup> y/o con las cabezas polares de los fosfolípidos y, por lo tanto, sería en parte responsable de los cambios observados en la velocidad de transferencia de FA.

La Lys<sup>29</sup> está ubicada en una de las regiones con mayor movilidad del esqueleto de la IFABP (*Hodsdon, Biochemistry 1997 (b)*). Al igual que para la Lys<sup>27</sup>, la neutralización de la carga en la posición 29 disminuyó la sensibilidad a la carga superficial de las membranas aceptoras, mientras que la reversión de la carga resultó en una drástica pérdida de la sensibilidad con una caída del 85% de la velocidad de transferencia de 12AO a CL-SUV en comparación con wtIFABP. Además, la disrupción del carácter básico de  $\alpha$ -II interfiere la interacción efectiva de la holo-IFABP con las membranas. En contraste con las grandes diferencias observadas en la transferencia de 12AO hacia vesículas con carga negativa, los mutantes de Lys<sup>29</sup> no produjeron cambios significativos en la transferencia hacia vesículas zwitteriónicas. Es posible que este comportamiento peculiar pudiera deberse a la existencia de una interacción de largo alcance entre las cadenas laterales del residuo 29 y otro residuo. Así, a diferencia de los otros residuos de Lys analizados, la Lys<sup>29</sup> forma un puente salino superficial con el Glu<sup>15</sup> de la hélice  $\alpha$ -I, ambos residuos muy conservados en la familia de FABP (*Scapin, J. Biol. Chem. 1992*). El puente salino podría estar ayudando a mantener las dos hélices unidas, y manteniendo la estabilidad de la “tapa del barril”. El rol de los puentes salinos superficiales en la estabilidad local y general ha sido analizado en otras proteínas (*Hennig, Structure 1995; Yip, Structure. 1995*). Además, en trabajos previos se observó que la substitución de la Lys<sup>31</sup> de AFABP (equivalente a la Lys<sup>29</sup> en IFABP) por Ile resulta en mayor velocidad de transferencia de FA hacia vesículas zwitteriónicas (*Liou, Biochemistry 2001*). Se sugirió que la disrupción del puente salino que este residuo forma con el Glu<sup>17</sup> en

AFABP desestabiliza el dominio portal facilitando la salida del ligando. En los experimentos de este Capítulo, a pesar de que la velocidad de transferencia desde el mutante K29I no aumentó, tampoco disminuyó al compararlo con la proteína nativa; como si se observó para las mismas mutaciones en las otras tres Lys del dominio helicoidal. Una tapa-helicoidal que carece del puente salino entre Glu<sup>15</sup> y Lys<sup>29</sup>, ya sea por neutralización o reversión de la carga positiva, resulta en un comportamiento distintivo en comparación con el resto de los mutantes del dominio  $\alpha$ -helicoidal, que puede ser atribuido tanto a la desestabilización de dicho dominio así como a la liberación de la carga negativa del Glu<sup>15</sup> al medio acuoso. Esta idea se apoya también en los resultados de los ensayos *in silico* en los cuales se observó la pérdida del puente salino (ver **Figura 2.7**).

En contraste a los mutantes del dominio  $\alpha$ -helicoidal, pequeños efectos fueron observados al mutar la Lys<sup>92</sup>, presente en la hoja- $\beta$  G. La sustitución por Ile mostró un comportamiento indistinguible de aquel que muestra la proteína nativa para todas las condiciones analizadas; mientras que el mutante K92E resultó en la idéntica estimulación de la transferencia 12AO por la incorporación de CL en las membranas aceptoras. El mutante K92E mostró, en efecto, un leve aumento en la velocidad de transferencia a bajas concentraciones de EPC-SUV, sugiriendo que, mientras la Lys<sup>92</sup> no es un elemento esencial para el proceso de transferencia colisional, la introducción de una carga negativa en esta posición genera la posibilidad de una interacción adicional de este grupo con la carga positiva de la cabeza polar de las EPC en las vesículas zwitterónicas.

En trabajos previos, se ha sugerido que un mecanismo de transferencia de FA desde el sitio de unión de las FABP hacia membranas modelo basado en un proceso colisional debería ocurrir según un proceso con más de un paso (*Herr, Biochemistry 1996; Córscico, Proc.Natl.Acad.Sci. 1998; Liou, J.Biol.Chem. 2002*). **(1)** interacción de la FABP con la membrana aceptora; **(2)** transición conformacional en el dominio portal dinámico desde el estado ordenado cerrado de la holo-proteína al estado más desordenado y abierto de la apo-proteína; **(3)** disociación del ligando del sitio de unión; y **(4)** asociación del ligando a la membrana aceptora. Para la wtIFABP, el paso **(1)** sería el paso limitante que

define la velocidad del proceso de transferencia que exhibe la cinética colisional. En el caso de la variante estructural Helixless-IFABP hipotetizamos que el paso **(3)** sería el limitante debido a la eliminación de los pasos **(1)** y **(2)**. Basándonos en los resultados actuales, proponemos que una hélice  $\alpha$ -I estable es necesaria para que el paso **(1)** ocurra, y que la integridad de la hélice  $\alpha$ -II es crítica para los pasos **(1)** y **(2)**. Modificaciones en cualquiera de las Lys de  $\alpha$ -I resulta en un descenso en la velocidad de transferencia proporcional, probablemente, a la disminución en la estabilidad del dominio  $\alpha$ -helicoidal o de la capacidad de interacción con las membranas. Para los mutantes de Lys<sup>27</sup> en  $\alpha$ -II pareciera que el paso **(1)** está marcadamente afectado, probablemente como un reflejo de una débil interacción con las membranas cuando estas tienen una carga neta neutra. Si las membranas tienen una carga neta negativa, los mutantes de neutralización K27I y K29I mostraron un 50% de descenso en la sensibilidad a la carga, sugiriendo que los residuos básicos remanente mantuvieron sus interacciones electrostáticas con las membranas ácidas. En contraste, los mutantes de reversión K27E y K29E mostraron un drástico descenso en la sensibilidad a la carga superficial de las membranasceptoras, probablemente reflejando un efecto de repulsión con las cargas negativas de las membranas ácidas, disminuyendo así la fuerza de la interacción proteína membrana del paso **(1)**. Dado que la cadena lateral de la Lys<sup>27</sup> se extiende sobre la región portal y que la cadena lateral de la Lys<sup>29</sup> estabiliza el dominio helicoidal por la interacción con el Glu<sup>15</sup> de  $\alpha$ -I, es probable que el paso **(2)** también podría estar afectado cuando alguno de estos residuos es substituido por Ile, resultando en una disminución en la velocidad en el cambio conformacional del dominio portal (del paso **(2)**), disminuyendo así también la velocidad de transferencia. Los resultados actuales también sugieren que el complejo formado en el paso **(1)** y la transición conformacional del paso **(2)** podrían ser diferentes dependiendo de la composición de las vesículasceptoras. En todos los experimentos realizados hasta el momento, sin embargo, los datos de transferencia siempre se ajustaron bien a una cinética exponencial simple, lo que implica que en el caso de los mutantes de Lys examinados en este trabajo de tesis el paso limitante es probable que sea el paso **(1)**, una interacción específica FABP-membrana.

Como conclusión final, podemos decir que los resultados presentados en este Capítulo, sumados a los de los **Capítulos 2 y Capítulo 3**, proveen evidencia que permitirían justificar un proceso de transferencia de FA de IFABP hacia membranas en etapas. Asimismo, estos resultados apoyan la hipótesis de Cistola y colaboradores con respecto a la existencia de un dominio portal que sufre un cambio conformacional a lo largo de la liberación del ligando (*Hodsdon, Biochemistry 1997 (a)*). Nuestros resultados sugieren que la interacción de IFABP con vesículas induce una transición conformacional, y además indican la posibilidad de cambios conformacionales diferenciales cuando la proteína transfiere su ligando a, o los extrae desde, membranas fosfolipídicas de distinta composición.







## Capítulo 4:

# Análisis de la interacción de las FABP entre sí y con membranas

### 4.1. - Introducción

#### 4.1.1. - Generalidades

Aunque normalmente se considera a las FABP como proteínas citosólicas solubles, según trabajos de fraccionamiento celular, tanto IFABP como LFABP se recuperan también en parte de fracciones asociadas a estructuras membranosas (*Ockner, J Clin Invest. 1974; Antonenkov, Biochem J. 2006*). En particular, se supone que la FABP de mielina (mP2) es una proteína periférica de membrana que está débilmente asociada a la membrana de las células de Schwann (*Veerkamp, J Mol Neurosci. 2001*). Esto podría estar indicando que las funciones de las FABP van más allá de un simple buffer citosólico que aumenta la fracción de FA en el citosol.

Los estudios cinéticos de transferencia de ligandos hacia membranas realizados con las FABP han revelado características únicas para cada miembro, posiblemente asociadas a una capacidad diferencial de interacción con las membranas fosfolipídicas. Estos sugieren firmemente que gran parte de las FABP actúan transfiriendo los FA durante la colisión con las membranasceptoras. Los ensayos de mutagénesis sitio-dirigida sobre IFABP, AFABP y HFABP sugieren firmemente que el motivo hélice-giro-hélice del propuesto dominio portal podría estar involucrado en el mecanismo colisional de transferencia de ligandos (**Capítulo 3**; *Herr, Biochemistry 1995; Liou, J.Biol.Chem. 2002*). Mediante el empleo de espectroscopia IR (FTIR) se ha demostrado directamente la interacción de AFABP e IFABP con bicapas fosfolipídicas aniónicas (*Gericke, Biochemistry. 1997*). En éste último caso, la comparación de la proteína nativa con la HL-IFABP (carente del motivo hélice-giro-hélice) demostró la importancia

de la región  $\alpha$ -helicoidal para la interacción con membranas, así como para el mecanismo colisional de transferencia de ligandos (Córsico *Proc Natl. Acad. Sci.* 1998; Wu, *Biochemistry* 2001). En concordancia con estos resultados, el ensayo de competencia de unión de las FABP intestinales con Cyt c parece indicar que la LFABP es capaz de prever la unión del Cyt c y presenta una afinidad similar al de la IFABP (Córsico, resultados no publicados). Asimismo, los estudios realizados con proteínas quiméricas en las que se intercambiaron la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP con la de LFABP, han demostrado que la región  $\alpha$ -helicoidal de LFABP también resulta ser crucial al momento de determinar el mecanismo de transferencia “difusional” de ligandos (Córsico, *Biochemistry* 2004).

Por todo lo expuesto anteriormente, es de fundamental importancia estudiar los factores que modulan la interacción de las FABP con membranas, así como los determinantes estructurales responsables de estas características. El rol del motivo hélice-giro-hélice es de particular interés en la capacidad de interacción con membranas de estas proteínas. Así, en el presente capítulo se analizan, mediante estudios *in vitro*, las posibles funciones de las FABP intestinales dentro de la célula como un transportador de ligandos hidrofóbicos entre distintas fracciones membranosas. Se analiza directamente la interacción de las FABP intestinales con vesículas, su modulación por el ligando y el efecto desestabilizador sobre las vesículas pequeñas. Además, nos ocupamos del efecto que tienen mutaciones puntuales de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP, o la remoción del motivo hélice-giro-hélice, para así analizar los mecanismos moleculares subyacentes. En particular, se plantea estudiar en detalle la influencia de cambios en la carga superficial de la membrana y la presencia del ligando sobre la capacidad de interacción de las FABP con otros componentes intracelulares. Por otro lado, también se estudia la capacidad de transferencia de ligandos entre las mismas FABP a fin de dilucidar el rol fisiológico que desempeñarían dentro del enterocito.

#### 4.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos

Trabajos anteriores señalan la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en la determinación del mecanismo de transferencia de ligandos hacia membranas y se desea analizar su vinculación con la capacidad de interacción con bicapas fosfolipídicas. Se plantea la hipótesis de que ***las FABP intestinales cumplen sus funciones específicas gracias a la capacidad de interaccionar con distintos componentes intracelulares en forma diferencial, y que la región  $\alpha$ -helicoidal sería responsable, al menos en parte, de estas propiedades.*** La IFABP, como representante de la subfamilia de FABP “colisionales”, interaccionaría efectivamente con membranas fosfolipídicas durante la transferencia de ligandos; mientras que la LFABP, como representante de la subfamilia de FABP “difusionales”, no requiere de dicha interacción para la transferencia de FA a membranas. La interacción con membranas puede ser un destino en sí mismo, o la formación del complejo FABP-membrana podría ser simplemente un intermediario antes de ceder su carga a una enzima de membrana.

En el presente capítulo se analizan, mediante estudios *in vitro*, las posibles funciones de las FABP intestinales dentro de la célula como un transportador de ligandos hidrofóbicos entre distintas fracciones membranosas. Se analiza directamente la interacción de las FABP intestinales con vesículas, su modulación por el ligando y el efecto desestabilizador sobre las membranas. Por último, nos ocupamos del efecto que tienen mutaciones puntuales de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP, o la remoción del motivo hélice-giro-hélice, para así analizar los mecanismos moleculares subyacentes. En particular, se plantea estudiar en detalle la influencia de cambios en la carga superficial de la membrana y la presencia del ligando sobre la capacidad de interacción de las FABP con otros componentes intracelulares. Por otro lado, también se estudia la capacidad de transferencia de ligandos entre las mismas FABP a fin de dilucidar el rol fisiológico que desempeñarían dentro del enterocito.

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto cuyo objetivo general es investigar la relación estructura-función de las FABP intestinales para así

acercarse a los roles específicos de cada miembro de la familia. Mediante técnicas de biofísicas, bioquímicas y de biología molecular se busca lograr **identificar el los factores que modulan las interacción de las FABP intestinales con otros componentes celulares que permiten el tráfico vectorial de FA para su metabolismo diferencial, al mismo tiempo que se analizan los determinantes estructurales responsables de dicha especificidad.** Los objetivos específicos que se abarcan en este capítulo del trabajo de tesis son los siguientes:

- 1) Determinar la capacidad de interacción de las proteínas nativas con membranas de distintas composiciones.
- 2) Analizar la modulación que realiza el ligando sobre la capacidad de interacción de las proteínas nativas con membranas de distintas composiciones
- 3) Determinar la capacidad de interacción de variantes estructurales de FABP intestinales con membranas aniónicas (LUV).
- 4) Determinar el efecto desestabilizador que presentan distintas variantes de las FABP intestinales sobre la estructura de las vesículas (SUV).
- 5) Determinar la capacidad de interacción y transferencia de ligando entre las FABP intestinales nativas.

#### **4.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos**

Los FA son componentes estructurales integrales en todas las membranas celulares, precursores de segundos mensajeros regulatorios y pueden modular la expresión de genes específicos. En todas las células, los FA se obtienen como resultado de la hidrólisis de glicéridos o a partir de la síntesis *de novo*, pero en ambos casos los sustratos son transformados por enzimas ubicadas en estructuras lipídicas, como lipoproteínas, “lipid droplets” citosólicas, la membrana plasmática o el retículo endoplásmico. Se ha hipotetizado que las FABP de intestino participarían del procesamiento y transporte transcelular de las grandes cantidades de FA absorbidos por el intestino delgado, por lo que es de esperar

que sea importante para sus funciones la interacción con las distintas estructuras membranosas intracelulares.

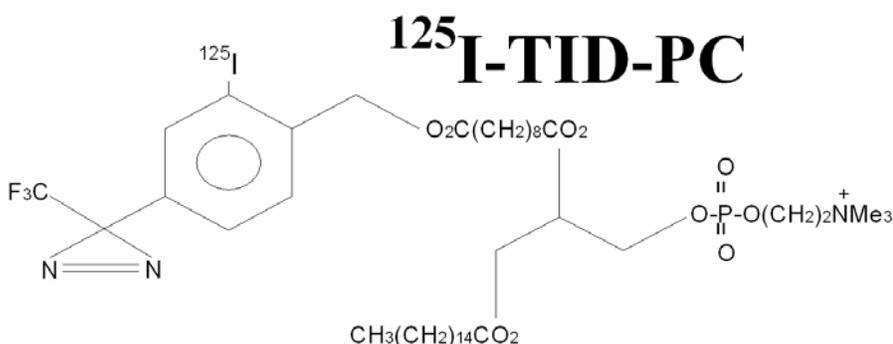
Las FABP presentan una estructura tridimensional prácticamente superponible, a pesar de la baja identidad de secuencia entre sus miembros, y aún así encierra diferencias suficientes para cumplir funciones específicas que justifiquen la expresión de más de una isoforma en un mismo tipo celular. El interés en la interacción de las FABP con membranas reside en que la mayoría de las enzimas del metabolismo de lípidos son proteínas de membranas y por lo tanto un componente central a tener en cuenta para analizar sus funciones. Asimismo, la asimetría de las membranas biológicas está relacionada a sus propiedades funcionales y son relevantes para diversos procesos fisiológicos. En particular, en mamíferos, la membrana plasmática posee una monocapa externa neutra pero una monocapa con carga neta negativa. Teniendo todo esto en cuenta, es de fundamental importancia estudiar cómo estas proteínas se asocian con dichas estructuras lipídicas y cuales son los determinantes estructurales responsables de las diferencias observadas que den cuenta de la especificidad funcional de cada una. El estudio comparativo de las FABP intestinales es un caso de particular interés ya que las diferencias estructurales y funcionales entre ambas deberían estar asociadas, al menos, al metabolismo de sus ligandos provenientes de la dieta en el enterocito.

Los experimentos propuestos en la sección siguiente están orientados a poder describir con mayor certeza el fenómeno de interacción de las FABP con otros componentes celulares que nos den cuenta del rol fisiológico que desempeñan estas proteínas.

## 4.2. - Resultados y Discusión

### 4.2.1. - Interacción de FABP intestinales con membranas fosfolipídicas.

El mecanismo aparente por el cual pueden intercambiarse los ligandos entre las FABP y las membranas fosfolipídicas permitió clasificarlas en dos grandes grupos, colisionales y difusionales. Pero un mecanismo colisional implica un proceso que se desarrolla en etapas, una de las cuales es la interacción del complejo proteína:ligando con la membrana. Ya que la etapa limitante del mecanismo colisional es la interacción con las membranas, se analizó en forma más directa el proceso de interacción de las FABP con membranas y sus posibles mecanismos y factores de modulación, que podrían estar direccionando el tráfico de los ligandos a organelas y vías metabólicas especializadas.

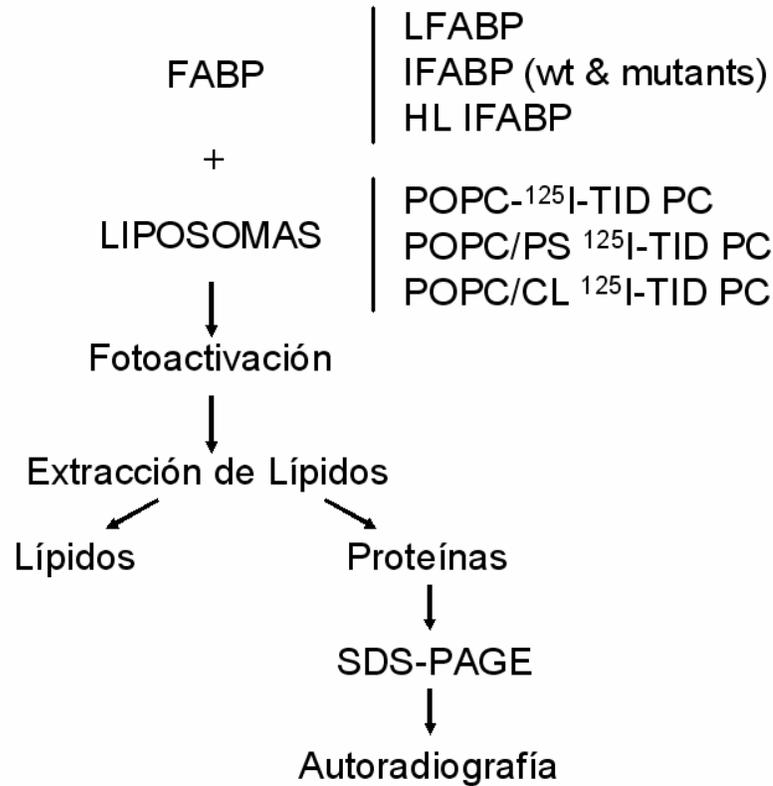


**Figura 4.1 – Reactivo fotoactivable radioiodinado <sup>125</sup>I-TID-PC.** Estructura química del 1-O-hexadecanoyl-2-O- [9- [[[2- [<sup>125</sup>I] iodo-4- (trifluorometil- (3H) -diazirin-3-yl) benzyl] oxy] carbonyl] nonanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine o <sup>125</sup>I-TID-PC, reactivo fotoactivable empleado en los ensayos de interacción de las FABP intestinales con membranas.

#### 4.2.1.1. - Ensayos cualitativos de fotomarcación

Se empleó el reactivo fotoactivable <sup>125</sup>I-TID-PC (**Figura 4.1**) para evidenciar la interacción física de las FABP con bicapas fosfolipídicas modelo según un ensayo fotomarcación (*Weber, J. Am. Chem. Soc. 1995; Corsico, J. Biol. Chem. 2001*). Las vesículas se preparan con este reactivo por extrusión a través de una membrana de policarbonato, y son incubadas con la proteína. El sistema luego se deslipidiza y se analiza la marca radioactiva que queda en la

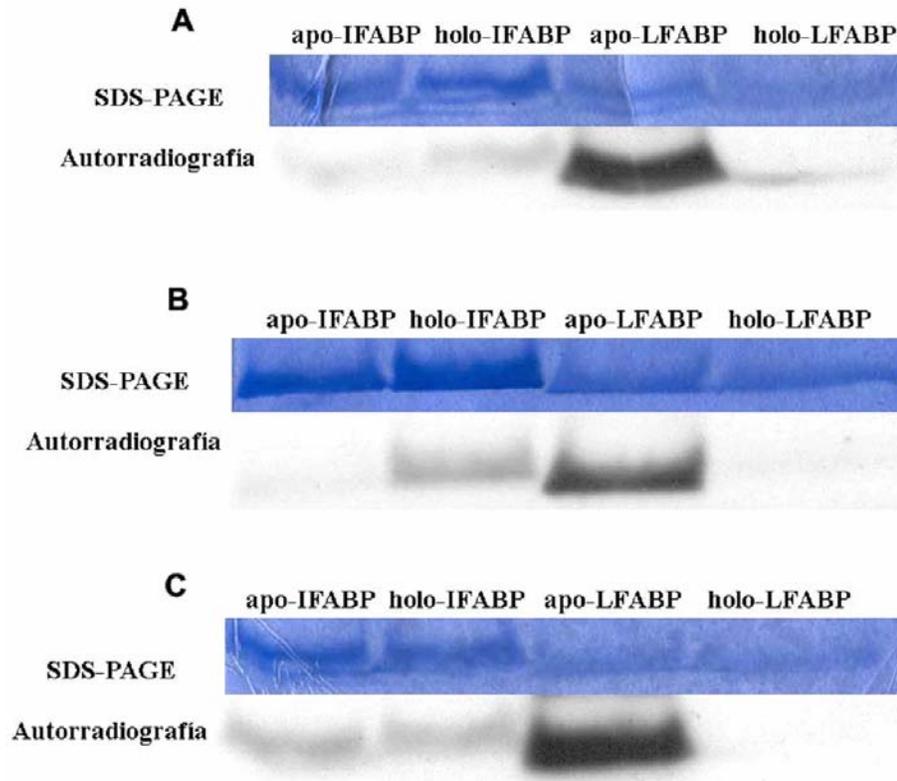
proteína luego de separarla en un gel de SDS-PAGE por autorradiografía (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2 – Ensayo de fotomarcación.** La figura muestra un esquema con los distintos pasos del ensayo de marcación hidrofóbica de FABP con  $^{125}\text{I}$ -TID-PC. La extracción de lípidos se realiza según la técnica de Folch, las proteínas son precipitadas con acetona previamente a la siembra en el gel de SDS-PAGE y los geles son secados antes de la incubación con la placa radiográfica.

La **Figura 4.3** muestra un resultado representativo de 3 repeticiones para analizar la interacción de las FABP intestinales con membranas de distinta composición y el efecto de la presencia del ligando. Puede observarse como la proteína IFABP interactúa con las membranas y pareciera que dicha interacción aumenta con la incorporación de cargas negativas en la membrana (PS y CL 25% respectivamente) respecto a las vesículas de 100% EPC (calle 1). También se observa que la interacción es promovida por la presencia del ligando (oleato en este caso) para las distintas composiciones de fosfolípidos, pero las diferencias apo- vs. holo- se diluyen con el aumento de la carga negativa de las membranas (calle 2). Estos resultados son compatibles con los resultados de transferencia de ligandos detallados en el capítulo anterior, en los que se observaba un aumento en la velocidad de transferencia de ligandos con el aumento de la carga negativa

de las membranas aceptoras. Si la etapa limitante del mecanismo colisional es dicha interacción y la misma está favorecida por lo que se observa en la autorradiografía del ensayo con el reactivo fotoactivable, es fácil de explicar entonces el aumento en la velocidad de transferencia que se registra en estas condiciones.



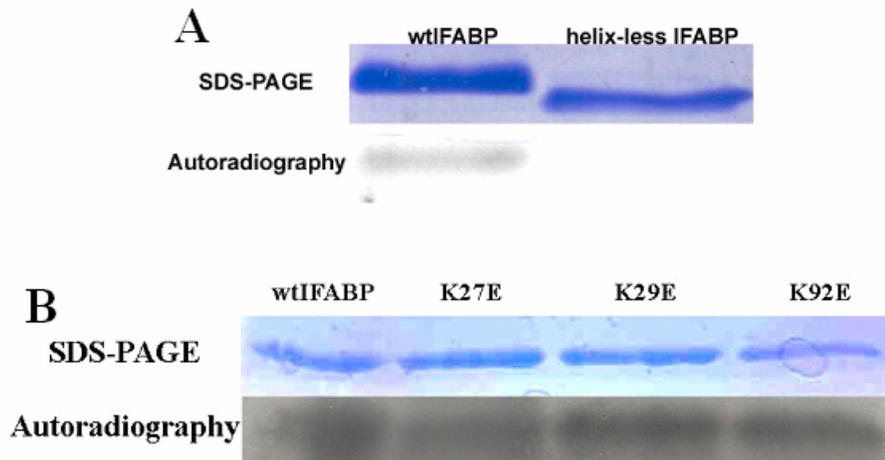
**Figura 4.3. - Ensayo de Fotomarcación con  $^{125}\text{I}$ -TID-PC de FABP intestinales.** La capacidad de interacción de las FABP intestinales nativas con membranas está modulada por la composición lipídica de las vesículas y por la presencia del ligando (oleato). Los paneles **A**, **B** y **C** muestran un resultado representativo de al menos 3 repeticiones para la marcación de las proteínas en sus formas apo- y holo- frente a vesículas de 100% EPC, 25% PS y 25% CL respectivamente.

Por otro lado, también se evidenció la interacción de la LFABP con las membranas fosfolipídicas, en especial en la forma apo-, es decir, desprovista de ligandos. Sin embargo, en este caso no se observan diferencias significativas debido a cambios en la composición de las vesículas (**Figura 4.3**, calle 3). Pero la presencia del ligando parece inhibir fuertemente la interacción de LFABP con las membranas (calle 4). Aunque inesperados, estos resultados no contradicen los

datos ya publicados y ampliamente aceptados de las propiedades de transferencia de ligandos desde LFABP, que se comporta como si empleara un mecanismo de tipo difusional. Es probable que LFABP sea capaz de interactuar con membranas, aunque dicha interacción no sea el paso limitante en la transferencia de ligandos, como se evidencia en los ensayos de transferencia (Hsu, *J. Biol. Chem.* 1996; Córscico, *Biochemistry* 2004). Por otra parte, como se observa en la Figura 4.5, la interacción de la forma holo parece ser despreciable en comparación con la holo-LFABP, lo que concuerda con los ensayos de transferencia de FA hacia membranas. Por otro lado, la interacción con membranas en los ensayos *in vitro* podrían estar funcionando sólo como un reemplazo de las interacciones que LFABP muestra *in vivo* con otras proteínas, de membrana o solubles, que serían los verdaderos aceptores/dadores de los FA para LFABP.

Por último, se observa que la proteína HL-IFABP, que carece de la región  $\alpha$ -helicoidal, no parece mostrar capacidad de interacción con membranas en general (**Figura 4.4**, panel **A**). Este resultado está de acuerdo con la pérdida del mecanismo colisional de transferencia de FA desde HL-IFABP (Córscico *Proc Natl. Acad. Sci.* 1998) y es coincidente como pérdida en su capacidad de interacción con membranas que se reportó previamente empleado técnicas de espectroscopia IR (Wu, *Biochemistry* 2001). Por tal motivo, la proteína HL-IFABP se empleó en todos los experimentos subsiguientes como control negativo del ensayo. El ensayo de fotomarcación también fue realizado con los mutantes puntuales K27E, K29E y K92E a fin de dilucidar si alguno de ellos mostraban alteraciones en su capacidad de interacción con membranas con carga negativa (25% CL) que pudieran explicar los cambios en las propiedades de transferencia de análogos fluorescentes de FA observadas para los mutantes de  $\alpha$ -II. Sin embargo, ninguno de los mutantes puntuales mostró cambios significativos con respecto a la proteína nativa de intestino. Esto nos indica que son necesarios modificaciones más drásticas para alterar la capacidad de interacción con membranas, aún cuando sí sean afectadas las propiedades de transferencia de ligandos (ver **Capítulo 3**). Esto induce a pensar que el efecto de las mutaciones puntuales podría estar vinculado con los pasos subsiguientes a la colisión de

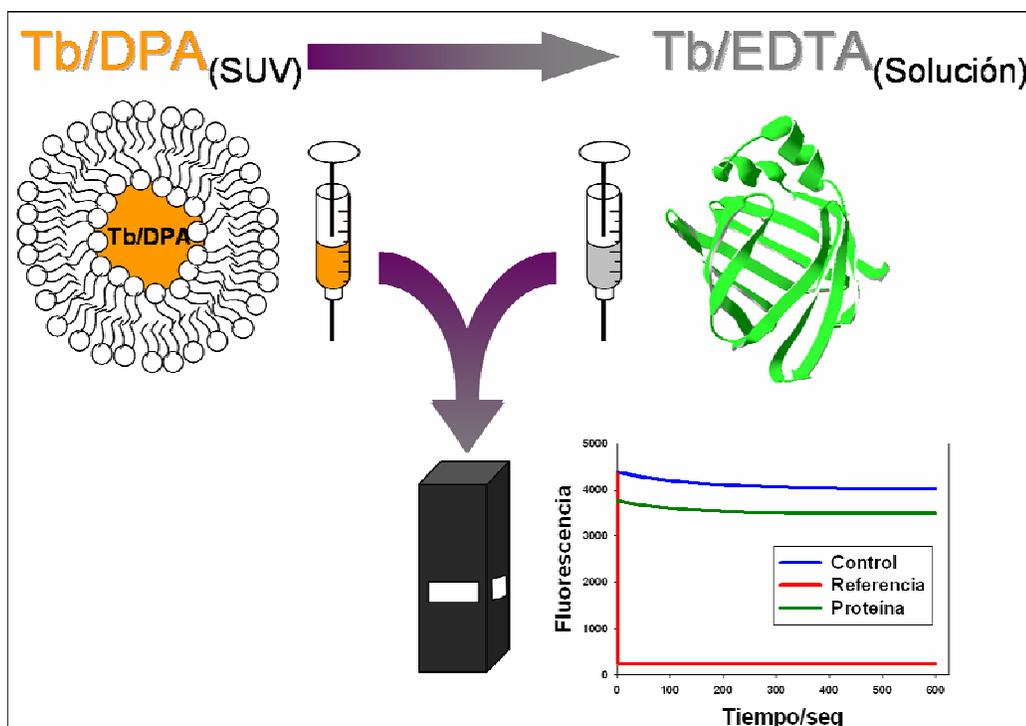
IFABP con la membrana aceptora, ya sea el cambio conformacional de IFABP en la interfase de la membrana y/o la liberación del ligando y su incorporación a la membrana (ver **Capítulo 3**).



**Figura 4.4. - Interacción de distintas variantes de IFABP con membranas.** El panel **A** muestra la capacidad disminuida de interacción de la variante de IFABP carente de la región  $\alpha$ -helicoidal con membranas de EPC:CL 3:1. El panel **B** muestra el mismo análisis para mutantes puntuales de Lys de la región  $\alpha$ -II y de la posición 92, para los cuales no se observan diferencias respecto a la proteína nativa.

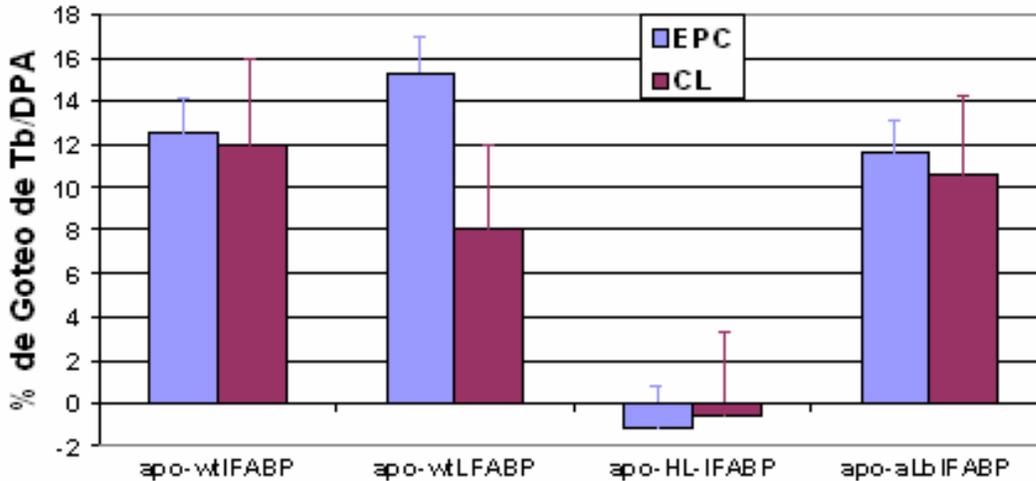
#### 4.2.1.2. - Ensayos cuantitativos

A fin de poder cuantificar la interacción de las FABP con membranas, se evaluó el efecto desestabilizador de las mismas sobre SUV empleando el ensayo de “goteo de Tb” (*Tb-Leakage*) (*Triccerri, Biochim Biophys Acta. 1998*). Este consiste en encerrar en el interior de vesículas SUV un complejo de Tb<sup>+3</sup> con ácido Dipicolínico (Tb/DPA) fluorescente. Disrupciones en la estructura de la membrana permiten el escape de este complejo que es desplazado por el EDTA presente en el buffer externo, lo que se registra como una caída de la fluorescencia (**Figura 4.5**). Empleando una solución de Tritón X-100 0,25% como referencia, se cuantificó el efecto desestabilizador que tienen las FABP intestinales en sus formas apo sobre la integridad de las membranas como un porcentaje del efecto producido por el detergente.



**Figura 4.3. - Ensayo de goteo de Tb.** La figura muestra un esquema del ensayo de goteo de Tb/DPA que permite analizar el efecto desestabilizador de las FABP sobre las membranas modelo. El gráfico incluido muestra un conjunto de datos típicos de fluorescencia en función del tiempo para el control, la referencia y una proteína tipo.

La **Figura 4.6** muestra los resultados para las proteínas nativas, la HL-IFABP y la proteína quimérica  $\alpha$ L $\beta$ IFABP (que posee la región  $\alpha$ -helicoidal de LFABP y el  $\beta$ -barril de IFABP) frente a vesículas de EPC 100% y EPC:CL 3:1. Al parecer, ambas proteínas nativas tienen efectos equivalentes sobre la estabilidad de las SUV. Aún cuando un 25% de CL se incorpora en la composición de las membranas, las diferencias entre IFABP y LFABP no son significativas. Sin embargo, al estudiar el efecto del agregado de la HL-IFABP este efecto desestabilizador no sólo desaparece, sino que, inesperadamente, incluso parece prever la pérdida del fluoróforo desde el interior de las vesículas. Estos resultados marcan la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en la interacción de las FABP con membranas fosfolípicas. Incluso la región  $\alpha$ -helicoidal de LFABP parece participar de este fenómeno; ya que, cuando se tienen en cuenta los resultados de la proteína quimérica  $\alpha$ L $\beta$ IFABP, parece compensar la falta de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP y da resultados comparables al de las proteínas nativas.



**Figura 4.6. - Ensayo de Goteo de Tb/DPA.** En el gráfico se observa cómo ambas proteínas nativas de FABP intestinales logran disrumpir en su forma apo la integridad de las membranas e inducen la pérdida del complejo Tb/DPA del interior de las vesículas. El efecto de las mismas se comparó con el que presentan dos variantes estructurales de IFABP con la región  $\alpha$ -helicoidal alterada y frente a vesículas de distinta composición (EPC 100% y EPC:CL 3:1).

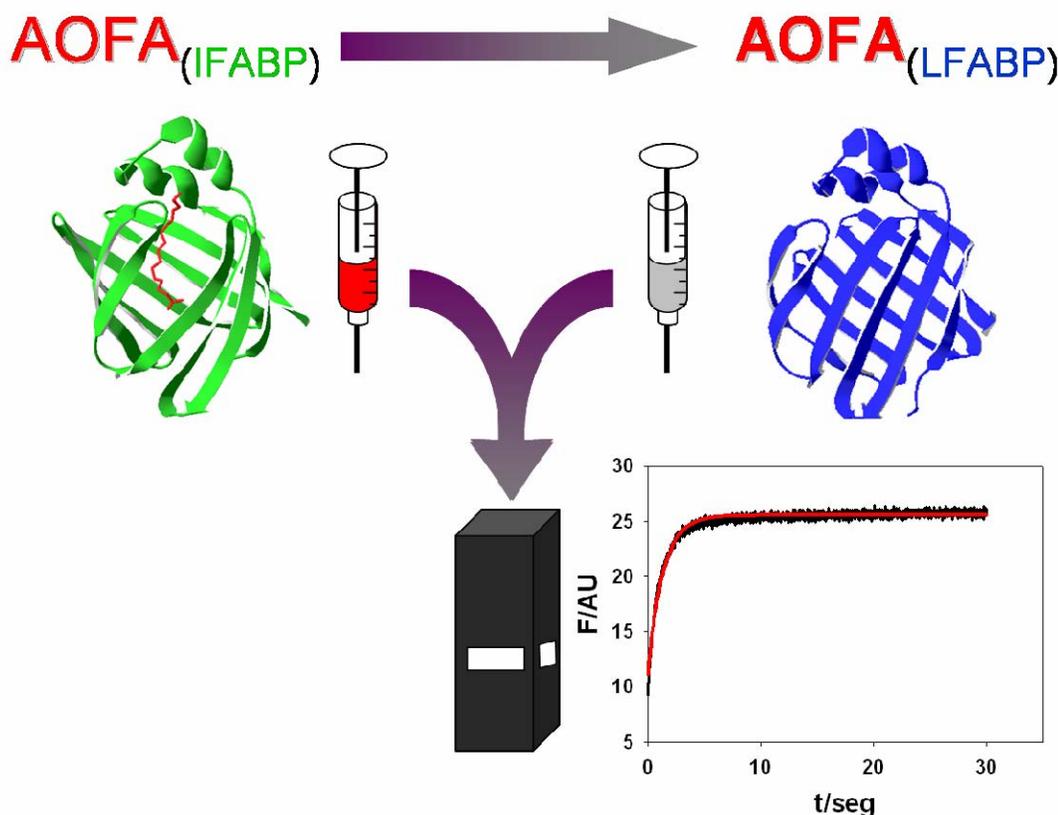
Estos estudios aún deben ser ampliados para analizar diferentes condiciones y variantes estructurales. Pero, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten suponer que la interacción de las FABPs es de carácter superficial, o al menos se focaliza en sólo una monocapa de fosfolípidos, sin la formación de grietas (o imperfecciones) considerables que permitan el goteo del complejo fluorescente. Dicha interacción sólo tiene lugar cuando la región  $\alpha$ -helicoidal está presente, tanto en IFABP como en LFABP. Sin embargo, la magnitud de interacción es significativamente menor al registrado para apolipoproteínas como Apo-AI por la misma técnica (*Triccerri, Biochim. Biophys. Acta. 1998*).

#### 4.2.2. - Interacción entre FABP intestinales

Hasta este punto se ha analizado cómo se vinculan las FABP intestinales con membranas de distinta composición y en distintas condiciones de incubación. Ya que tanto la IFABP como la LFABP se expresan en cantidades abundantes en el epitelio intestinal, quisimos analizar el posible intercambio de ligandos entre ellas. Para ello se ideó un ensayo de transferencia de los AOFA entre ambas

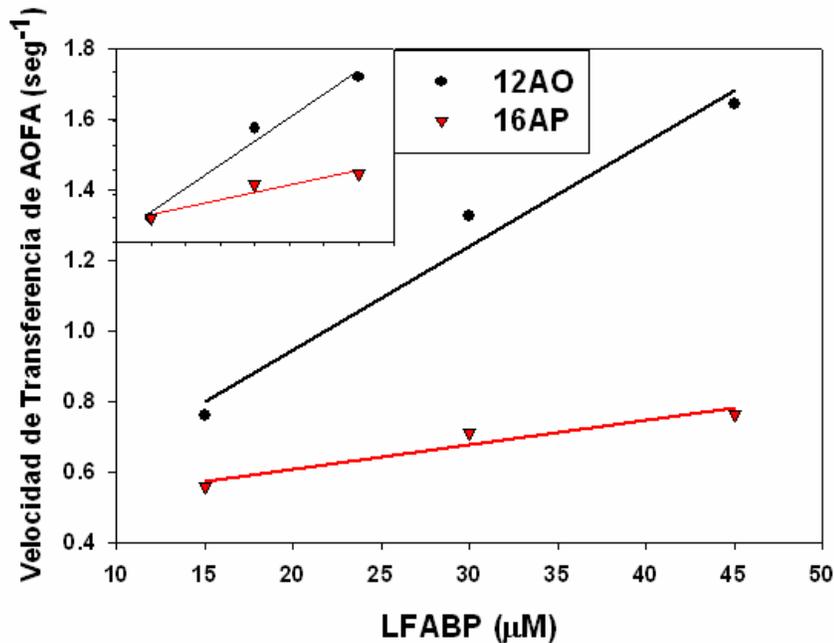
proteínas, basado en las diferencias en la intensidad de fluorescencia (rendimiento cuántico,  $Q_f$ ) que muestran al estar unidos a cada una de estas proteínas.

La **Figura 4.7** muestra esquemáticamente el diseño del ensayo, en el que el complejo preformado de IFABP-AOFA se mezcla con la LFABP al tiempo que se registra la fluorescencia del ligando en función del tiempo. Los resultados son bien ajustados a una exponencial simple de la cual se calcula la velocidad de transferencia del proceso. Así, al estudiar el equilibrio de unión de 12AO entre ambas proteínas, se pudo comprobar la partición del ligando entre ambas las FABP y medir luego la velocidad de transferencia de 12AO desde la IFABP hacia la LFABP. Los ensayos se repitieron con 16AP (antroiloxi-derivado del palmitato) para analizar la influencia de la estructura del ligando.



**Figura 4.4. - Ensayo de Transferencia de ligando entre FABP intestinales.** La figura muestra el esquema del ensayo de transferencias de 12AO desde IFABP a LFABP. El mismo se realiza en un módulo cinético de flujo detenido que permite seguir el aumento de la intensidad de fluorescencia del 12AO a medida que este se trasfiere al sitio de unión de la LFABP donde presenta un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia.

La **Figura 4.8** muestra los resultados al cambiar la concentración de la LFABP para ambos ligandos analizados. Se observa un aumento proporcional de la velocidad de transferencia del ligando con la concentración de la proteína aceptora, y el efecto es más notorio con 12AO que con 16AP (**Figura 4.8**, inserto). La interpretación es análoga al ensayo de transferencia hacia vesículas fosfolípídicas; por lo que podemos concluir que la transferencia de ligandos entre las FABP intestinales es de naturaleza colisional, brindando la primera evidencia experimental de esta característica de las FABP de la literatura. La diferencia en la velocidad de transferencia al emplear 12AO o 16AP podría explicarse teniendo en cuenta que IFABP y LFABP poseen afinidades similares por FA saturados, pero esta última presenta mayor afinidad por los FA insaturados que la primera.



**Figura 4.8. - Transferencia de AOFA entre FABP intestinales.** Un aumento de la concentración de LFABP aceptora induce un aumento proporcional sobre la velocidad de transferencia de 12AO y 16AP desde IFABP. El inserto de la figura muestra la velocidad de transferencia de AOFA en forma relativa al primer valor (15μM LFABP).

### **4.3. - Conclusiones**

La interacción física entre FABP con membranas fosfolipídicas se analizó directamente, por el marcaje radioactivo de las proteínas por entrecruzamiento activado por la luz con un derivado fosfolipídico radioiodinado; e indirectamente, por la desestabilización y el goteo de un complejo fluorescente del interior de vesículas. La inserción de distintas proteínas en membranas ha sido caracterizada empleando el reactivo fotoactivable mencionado y otros ampliamente descritos en la bibliografía (*Weber, J. Am. Chem. Soc. 1995; Córscico, J. Biol. Chem. 2001; Weber, J. Biol. Chem. 1994; Durrer, J. Biol. Chem. 1995; Durrer, J. Biol. Chem. 1996; Vergeres, J. Biol. Chem. 1995, Garner, J. Biol. Chem. 1998*). Nuestros resultados muestran que las FABP intestinales nativas interaccionan con membranas, y que dicha interacción es modulada tanto por la presencia del ligando como por la composición de las membranas en forma diferencial para IFABP que para LFABP. Sin embargo, los ensayos indirectos muestran que la organización de las membranas fosfolipídicas se ve levemente alteradas por la interacción con las FABP y no se registran diferencias entre las distintas FABP; salvo en el caso de la HL-IFABP, carente de la región  $\alpha$ -helicoidal, que sería fundamental para que la interacción con las membranas tenga lugar.

Es interesante mencionar que los distintos compartimentos membranosos intracelulares presentan una composición fosfolipídica característica, y que la cardiolipina es un constituyente relevante de las membranas internas y externas mitocondriales (*Hovius, Biochim. Biophys. Acta 1990*), y su participación en la interacción membrana-proteína ha sido bien apreciada (*Schlattner, J. Biol. Chem. 2004*). Por otro lado, fosfatidilserina muestra también una distribución desigual en las distintas fracciones membranosas. En particular la composición de la hemicapa citosólica de la membrana plasmática es característicamente rica en fosfatidilserina.

La función más ampliamente aceptada de las FABP es la de transportadores intracelulares de FA y demás lípidos. Las diferencias en la interacción con membranas y la transferencia de ligandos con la composición de

las vesículas y la estructura del ligando, respectivamente, podrían ser las bases moleculares responsables de las funciones específicas de IFABP y LFABP. Así, la interacción diferencial de las FABP con membranas artificiales de distinta composición podría ser un indicio de su función en el transporte de lípidos durante la carga o descarga del ligando desde o hacia membranas de distinta composición.

La interacción de IFABP con las membranas pareciera ser más importante en su forma holo que en su forma apo, y lo opuesto se observa para la LFABP. En trabajos previos se demostró que ambas proteínas son capaces de extraer FA de membranas donoras (*Thumser, J. Lipid Res. 2000*). En este sentido, ensayos reversos de transferencia de AOFA, desde vesículas donoras hacia FABP aceptoras, mostraron diferencias significativas al comparar la transferencia de FA hacia IFABP y LFABP que, a pesar de que la velocidad de transferencia de FA reverso es independiente de la concentración de proteína aceptora, el mecanismo de transferencia sí es sensible a la composición de lípidos para el caso de la IFABP, o a la concentración de sales (fuerza iónica) en el caso de LFABP (*Thumser, J. Lipid Res. 2000*). Esto nos indica que la disociación de los FA de las bicapas fosfolipídicas modelo es independiente de la interacción con LFABP; mientras que un complejo intermediario con la membrana donora participa de la extracción de FA por parte de la IFABP. Se propuso que estas diferencias se debían a que los complejos FABP-membrana serían distintos en cada caso; y los resultados aquí presentados apoyan esta posibilidad, junto con los cambios estructurales ya descritos en las estructuras de NMR y cristalográfica debido a la presencia del ligando (*Hodsdon, Biochemistry 1997; Wang, Biochemistry. 2002; He, Biochemistry 2007*).

Por otro lado, si tenemos en cuenta los resultados parciales obtenidos hasta el momento de los ensayos de goteo de Tb/DPA, vemos que las membranas no sufren una distorsión tan significativa en su integridad estructural al incubarlas con las FABP intestinales nativas respecto al cambio inducido por Apo AI (*Triccerri, Biochim Biophys Acta 1998*). Pero estas diferencias son fácilmente entendibles si se considera que, a diferencia de las FABP, la Apo AI se integra a las membranas gracias un complejo proceso de reorganización

estructural que generaría notorias imperfecciones en la bicapa fosfolipídica por donde el complejo fluorescente podría filtrarse. Esto nos indica que las proteínas serían capaces de asociarse a membranas y extraer o ceder FA sin necesidad de grandes reorganizaciones de la membrana, fundamental para mantener intacto gradientes y potenciales transmembrana a través de las membranas donoras. Además, para cada proteína, no se observaron diferencias significativas tampoco al cambiar la composición de las membranas por el reemplazo de con un 25 mol% de cardiolipina. Esto puede interpretarse como que las proteínas no interactúan de forma distinta con ambos tipos de bicapas fosfolipídicas y las diferencias en las velocidades de transferencia de ligandos deben buscarse en el contacto superficial pero específico, posiblemente con las cabezas polares de los fosfolípidos, más que debido a una inserción diferente en la región hidrofóbica de las bicapas. Llamativamente, la presencia de la HL-IFABP no parece tener un efecto importante sobre la integridad de las bicapas, lo que remarca la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal. Además la región  $\alpha$ -helicoidal de LFABP también podría estar participando de la interacción según marcan los resultados con la quimera  $\alpha$ L $\beta$ IFABP.

Usando un ensayos de competencia con Citocromo c (*Córsico, Proc. Natl. Acad. Sci. 1998*) y de espectroscopia IR (FTIR) (*Wu, Biochemistry 2001*), se propuso originalmente la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en la interacción de IFABP con membranas. Los resultados aquí presentados, no sólo confirman estas observaciones mediante dos nuevas metodologías, sino que también los hacen extensivos para LFABP, y reafirman la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal de las FABP en el rol específico de cada isoforma, en total concordancia con los resultados de los ensayos cinéticos de transferencia de FA desde las FABP intestinales hacia membranas.

En cuanto a la interacción entre IFABP y LFABP capaz de transferir FA entre ellos, es importante remarcar que el rango de velocidades observadas para 12AO es equivalente al que presenta la transferencia del mismo ligando desde IFABP hacia EPC-SUV (150-600  $\mu$ M); lo que lo vuelve de gran relevancia biológica al momento de proponer un modelo funcional para estas proteínas, ya

que ambos provechos estarían coexistiendo. De este modo, de tener funciones específicas las FABP intestinales, la partición del pool soluble de FA libres entre ambas proteínas condicionaría el destino metabólico de los mismos en función de las posibles vías de descarga activadas para cada una de las FABP. En particular, los factores que modulan la expresión de las FABP (FA ramificados, retinol, ácido retinóico, y distintas drogas hipolipemiantes que actúan vía los PPAR) (*Schachtrup, Biochem J. 2004*) podrían, de este modo, modificar el destino metabólico de los FA.





## Capítulo 5:

# Efecto de la eliminación de la expresión de LFABP en células Caco-2 sobre el metabolismo de ácidos grasos

### 5.1. - Introducción

#### 5.1.1. - Generalidades

Los estudios con los ratones *null* para LFABP e IFABP representan modelos muy valiosos para analizar la importancia de estas proteínas en el contexto fisiológico completo. Pero, mientras que los resultados para IFABP<sup>-/-</sup> son modestos pero bien definidos, los cambios observados en los LFABP<sup>-/-</sup> no son concluyentes, en particular debido a que la expresión de LFABP se da en varios tejidos y no se ha podido discernir si los cambios en el metabolismo lipídico se deben a la falta de la LFABP en hígado o en intestino (*Martin, J. Biol. Chem. 2003; Newberry, J. Biol. Chem. 2003*).

Los ensayos en cultivo representan un estadio intermedio de complejidad del sistema, y, en el caso de células del epitelio intestinal, la línea celular más ampliamente utilizada es la línea Caco-2, que deriva de un carcinoma de colon humano establecida por Fogh J. et al. (*Fogh, J Natl Cancer Inst. 1977*). Cuando son cultivadas cercanas a un 100% de confluencia se polarizan y comienzan a desarrollar espontáneamente muchas de las características de las células maduras de las vellosidades epiteliales del intestino delgado. Las células forman una monocapa similar al epitelio en columna con uniones intercelulares herméticas y una membrana apical diferenciada con microvellosidades y organizada tipo "ribete en cepillo". Cuando se crecen sobre una membrana permeable puede accederse independientemente a los compartimentos basal y apical. Esto se vuelve relevante para estudiar las lipoproteínas que secretan estas células por la

cara basolateral, Quilomicrones y VLDL principalmente (Luchoomun, *J Biol Chem* 1999; Luchoomun, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997). Las células Caco-2 expresan tanto LFABP como IFABP, con patrones temporales de expresión diferentes y modulados por factores nutricionales, podrían ser importantes para el tráfico de LCFA y 2-MG a través de la monocapa al igual que a través del epitelio absortivo intestinal (Darimont, *Exp Cell Res.* 1998; Trotter, *J Lipid Res.*1991). Sin embargo, las células Caco-2 tienen algunas características distintas a los enterocitos normales. Por un lado sintetizan principalmente Apo B100, en lugar de Apo B48, y expresan bajos niveles de Monoacilglicerol-Acil-Transferasa (MGAT) y sólo un 10% de los niveles normales de IFABP (Darimont, *Exp Cell Res.* 1998; Hughes, *J Biol Chem.* 1988; Trotter, *J Biol Chem.* 1993). Además acumulan glucógeno y poseen algunas características de células fetales y de las criptas colónicas. A pesar de estas diferencias, las Caco-2 son el modelo celular más fiel y mejor caracterizado en cuanto a la absorción, el metabolismo y el transporte de lípidos en epitelio intestinal (Levy, *FASEB J* 1995), y han sido ampliamente empleadas para analizar las funciones de IFABP (ver **Capítulo 1**).

La hipótesis de que las FABP funcionan como transportadores intracelulares de FA es apoyada por la abundante evidencia indirecta que indica que, tanto en intestino como en hígado, la modulación de las velocidades de asimilación de FA o de su utilización en respuesta a variaciones nutricionales, hormonales o farmacológicas correlacionan con los niveles de FABP en el citosol (Bass, *Chem. Phys. Lipids* 1985; Mishkin, *Am. J. Physiol.* 1975). Además, aproximaciones teóricas sugieren que las FABP podrían aumentar las velocidades de transporte intracelular de FA (Tipping, *Biochem. J.* 1981; Stewart, *Biochem. J.* 1991), y en particular se ha reportado que la aparente velocidad de difusión de un análogo fluorescente de FA (NBD-estearato) en hepatocitos aislados correlaciona directamente con la concentración intracelular de LFABP (Luzón, *Am. J. Physiol.* 1993). El estudio de las velocidades de transferencia de FA entre FABP y membranas demostró las diferencias en el mecanismo y las velocidades absolutas de transferencia de FA desde las FABP intestinales (Hsu, *J. Biol. Chem.* 1996), sugiriendo que ambas proteínas desempeñan funciones diferentes en las células intestinales del epitelio absortivo en la regulación del transporte y la utilización de FA. Mientras que LFABP podría funcionar como un

buffer citosólico, IFABP podría estar involucrada en el direccionamiento de los FA desde y/o hacia estructuras subcelulares membranosos o vías metabólicas específicas.

LFABP, en particular, presenta algunas características únicas dentro de las FABP como, por ejemplo, un amplio rango de ligando o la capacidad de unir dos FA a la vez. Además, se diferencia de otras FABP estudiadas por presentar un mecanismo de transferencia de ligandos mediado por difusión acuosa. Basándonos en los resultados de la sección anterior, vemos que, sin embargo, LFABP sí es capaz de interactuar con membranas. Esto podría indicar que en realidad, el mecanismo “difusional” es un sustituto por la flata de proteínas en un sistema tan simplificado, y que los verdaderos aceptores de FA dentro de la célula podrían ser componentes proteicos y no membranas fosfolipídicas. Por tal motivo es importante analizar el comportamiento de la LFABP en un entorno más cercano a un organismo vivo, como son las células en cultivo. De hecho se ha comprobado la interacción de LFABP con los Receptores Activadores de la Proliferación Peroxisomal tipo  $\alpha$  y  $\gamma$  (PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ ), cediéndoles FA y ligandos hidrofóbicos en células de hígado (*Wolfrum, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001*), apoyando la intervención de las FABP en la regulación génica llevando señales lipídicas hacia el núcleo. Sin embargo, en intestino sólo se expresa la isoforma PPAR $\beta/\delta$ , para la cual no hay información disponible sobre su interacción con alguna de las FABP intestinales.

### **5.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos**

El intestino delgado no sólo debe ser capaz de asimilar y procesar las grandes cantidades de lípidos que se incorporan con la dieta, sino también de adaptar su metabolismo a distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes. Los lípidos son asimilados principalmente como FA libres y MG para luego ser reesterificados y secretarlos en la forma de Quilomicrones por la cara basolateral. ***Se supone que las SLBP que se expresan en enterocitos favorecerían el transporte intracelular de lípidos así como también participarían de la regulación del metabolismo lipídico.*** En particular, se hipotetiza que las

posibles funciones de las LFABP en el epitelio intestinal serían de buffer citosólico y/o de transportador de ligandos hidrofóbicos. Ensayos previos han estudiado la sobreexpresión de LFABP en hepatocitos y fibroblastos, en los que se observó un aumento de la asimilación de FA (**Capítulo 1**). En este caso, se desea tratar de analizar en particular el rol de LFABP como proteína que interviene en la unión y distribución de FA, así como su participación en la proliferación y diferenciación de enterocitos.

Mediante técnicas de bioquímica, biología molecular y biología celular se desea **estudiar la participación de LFABP en el metabolismo lipídico, proliferación y diferenciación celular de células Caco-2, y así contribuir a la identificación del rol específico de las FABP intestinales**. Los objetivos específicos que se abarcan en este capítulo del presente trabajo de tesis son los siguientes:

- 1) Obtener líneas estables de Caco-2 con una expresión disminuida de LFABP.
- 2) Analizar la compensación por IFABP.
- 3) Determinar de la capacidad de asimilación de FA de estas líneas.
- 4) Determinar del efecto de distintos FA sobre la asimilación.
- 5) Determinar del efecto de la falta de LFABP sobre el metabolismo interno de FA y la secreción de lípidos.

### **5.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos**

Se han propuesto que las FABP intestinales participan de la asimilación y metabolismo de las grandes cantidades de lípidos desde la luz intestinal, así como en su secreción como lipoproteínas. Sin embargo no se conoce a ciencia cierta cuáles serían sus participaciones en estos procesos. El metabolismo diferencial a partir de FA asimilados a través de la cara apical o basolateral (*Storch, J. Lipid Res. 2008; Ho, J. Biol. Chem. 2002; Gangl, J Clin Invest. 1975*) es un fuerte indicio de que existe un sistema de direccionamiento de lípidos citoplasmático, y las FABP están en una posición de privilegio para cumplir esta función.

El cultivo de células modificadas genéticamente permite analizar fácilmente el efecto de variantes estructurales o distintos patrones de expresión de proteínas. En este caso se planea emplear la técnica del anti-mRNA para lograr disminuir la expresión de LFABP en células Caco-2 que no expresan niveles significativos de IFABP. De este modo se podrá evaluar el funcionamiento celular prácticamente en ausencia de FABP intestinales que actúen como transportadores de lípidos. Así, la comparación con las células control nos brindará información valiosa acerca de las funciones que cumple la LFABP en los enterocitos.

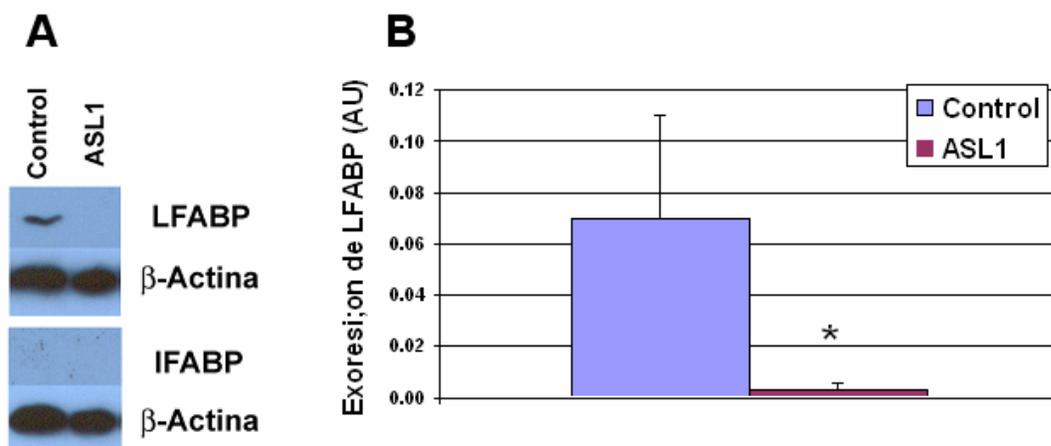
Los estudios propuestos a continuación complementarán los resultados obtenidos con los animales *null* y ayudarán a dilucidar el rol que LFABP cumpliría en enterocitos, hepatocitos o en ambos. Estos ensayos son la primera incursión de nuestro laboratorio en técnicas de biología celular y representan un trabajo que aún está en progreso. Por otro lado, sumado a los ensayos presentados más adelante, la generación de un modelo de células Caco-2 carente de LFABP representa la obtención de una herramienta muy importante que permitiría el estudio posterior de un conjunto de variantes estructurales de IFABP en forma independiente a la expresión de LFABP. Esto expandiría aún más nuestra comprensión sobre el rol de estas proteínas y de sus dominios específicos, en un contexto más próximo al fisiológico que los clásicos ensayos *in vitro*.

## 5.2. - Resultados y Discusión

### 5.2.1. - Obtención de clones con la expresión disminuida de LFABP

Con el fin de analizar el rol de la LFABP en el metabolismo lipídico de enterocitos, se construyó el plásmido pcDNA3.1-ASL, basado en el vector pcDNA3.1-Neo(+), a partir del cual se transcribe el anti-mRNA de la LFABP humana. Cuando este plásmido es introducido dentro de las células Caco-2, se silencia la expresión de LFABP para así poder comparar los cambios en el metabolismo de FA en relación comparación con la línea control que porta el vector vacío.

Las células Caco-2 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-ASL empleando el reactivo Effectene (Stratagene) y se incubaron durante 15 días en medio suplementado con Geneticina (G418) para seleccionar exclusivamente a las células que incorporaron el plásmido. Estas luego fueron tripsinizadas y diluidas para poder aislar distintas poblaciones clonales. Hasta el momento se han logrado aislar los clones ASL1 y ASL2 que poseen una expresión disminuida de LFABP.



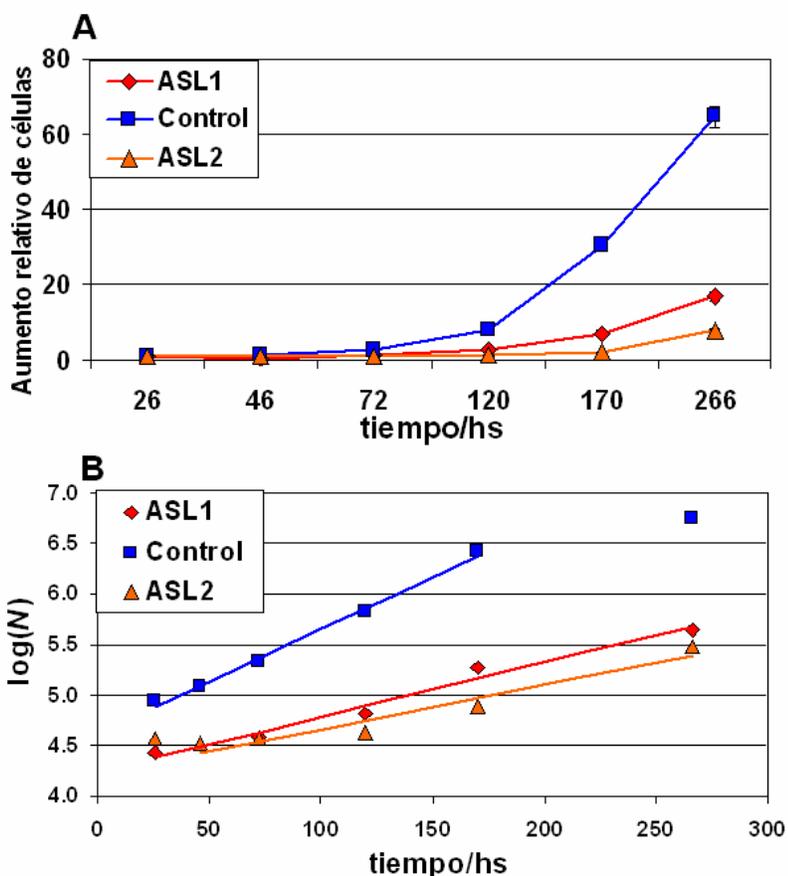
**Figura 5.1. - Cuantificación de los niveles de FABP en células Caco-2 transfectadas.** (Página siguiente) El panel **A** muestra el análisis por Western-blot de expresión de LFABP, IFABP y  $\beta$ -Actina, de células Caco-2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1(+)-ASL (clon ASL1) y células control y crecidas a confluencia 100% en un filtro transwell durante 18 días. En el panel **B** se muestra la cuantificación por densitometría de LFABP, normalizado por la expresión de  $\beta$ -Actina como control interno. No se detectó la compensación por IFABP.

Las células control empleadas en los ensayos se obtuvieron del mismo modo, pero no se sometieron a la selección clonal. Esto es debido a que se desea minimizar el efecto que pueda tener la recombinación del vector vacío sobre la expresión de otros genes.

Las distintas líneas derivadas de Caco-2 fueron evaluadas en su expresión de LFABP, así como la posible compensación con IFABP, que en las condiciones de cultivo empleadas resultó ser no detectable. La **Figura 5.1** muestra los resultados de Western-blot para detectar la presencia de LFABP, IFABP y  $\beta$ -Actina (control interno) para el clon ASL1 (panel **A**). La cuantificación muestra una significativa disminución de la expresión de LFABP en el clon ASL1 de casi el 99% (panel **B**).

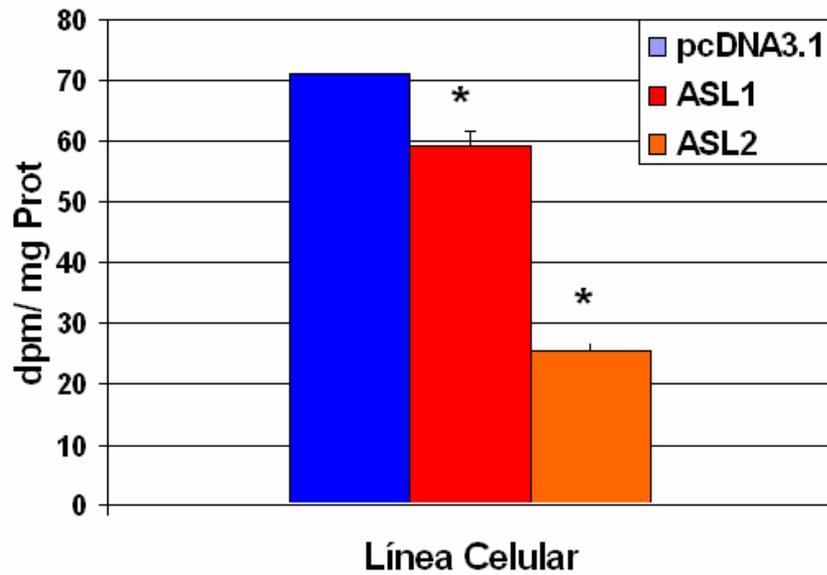
### **5.2.2. - Proliferación y diferenciación celular**

Los clones ASL1 y ASL2 fueron evaluados en comparación con la población control en cuanto a su capacidad de crecimiento (ver **Apéndice A**). Primero se evaluó su capacidad de proliferación por recuento en cámara de Neubauer a distintos tiempos. Las células control mostraron un tiempo de duplicación ( $t_D$ ) cercano al que generalmente muestran las células en cultivo que es alrededor de 24-30 hs. Sin embargo, los clones ASL1 y ASL2 mostraron una significativa disminución de la velocidad de crecimiento, 55,8 y 70,0 hs., respectivamente, en comparación a las 29,0 hs. de las células control. La **Figura 5.2** muestra las curvas de crecimiento de los tres cultivos y la transformación logarítmica a partir de la cual se calcula el  $t_D$ .



**Figura 5.2. - Curva de crecimiento de células Caco-2 transfectadas.** Las clones ASL1 y ASL2 se crecieron en placas de 60 mm desde un inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  células/placa en comparación con las células control. El recuento de células a distintos días (panel **A**) se empleó para calcular el tiempo de duplicación ajustando la curva a una exponencial de crecimiento simple (panel **B**) y ambos clones mostraron una marcada disminución de su capacidad de proliferación.

Los resultados anteriores se corresponden perfectamente con los obtenidos al medir la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 4hs. Los clones ASL1 y ASL2 mostraron una disminución significativa de la incorporación de este metabolito en el DNA respecto a las células control (**Figura 5.3**). Esto también demuestra una disminución en su capacidad de proliferación en los clones con una disminución de la expresión de LFABP. Sin embargo, cabe mencionar que el clon ASL1 siempre mostró una capacidad mayor de proliferación que el ASL2.

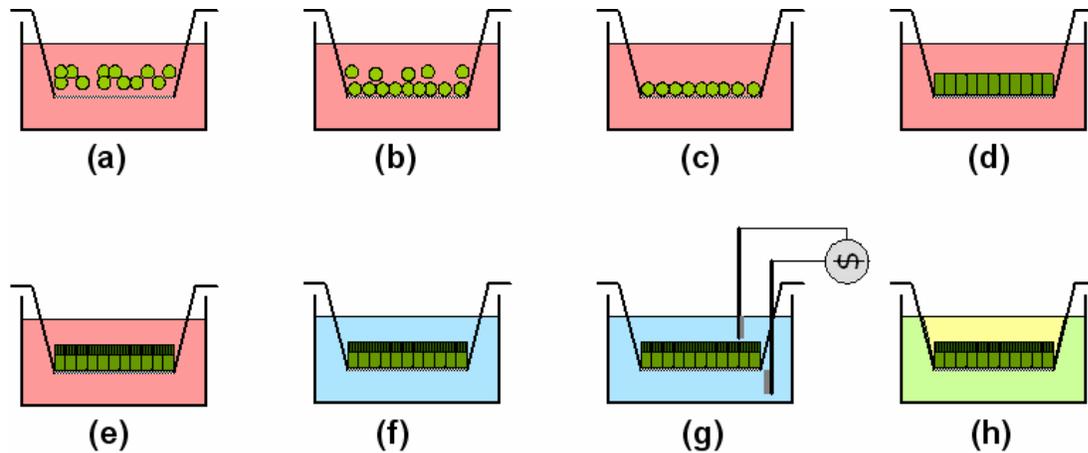


**Figura 5.3. - Incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en células Caco-2 transfectadas.** Se observa un descenso significativo en la capacidad de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina al DNA para los clones ASL1 y ASL2 con la expresión disminuida de LFABP en relación a las células control. \*  $p < 0,05$ .

Las Células Caco-2 se diferencian adquiriendo muchas de las características de los enterocitos normales cuando se crecen a una confluencia superior al 100%. Si este procedimiento se desarrolla en filtros de cultivo (transwell, Corning Costar) es posible acceder en forma independiente al espacio apical, análogo a la luz intestinal, y al basal, equivalente al espacio intersticial o la linfa (**Figura 5.4**). Durante esta diferenciación, que lleva unos 15-18 días, se forma una monocapa de células impermeable al pasaje de nutrientes entre la cara apical y basal, y este proceso puede seguirse por el aumento de la resistencia eléctrica de la monocapa con un potenciómetro ELS Voltimeter (Millipore). A partir del décimo día también comienzan a aumentar la expresión de enzimas marcadoras propias del epitelio del intestino absortivo, como las disacaridasas, pero la diferenciación completa se supone una vez que la monocapa ha alcanzado una resistencia eléctrica de  $250 \text{ Ohm.cm}^2$ .

Así, al analizar, previamente a los ensayos metabólicos que se detallana continuación, las líneas ASL1 y ASL2 mostraron un marcado retraso en la formación de una monocapa impermeable. Mientras que las líneas con la

expresión disminuida de LFABP a penas alcanzaban el valor umbral alrededor del día 18 luego de haber alcanzado la confluencia en los filtros, las células control alcanzaban una resistencia de más de 400 Ohm.cm<sup>2</sup>. En este caso se renueva la tendencia observada al analizar la proliferación celular, ya que el clon ASL2 mostró sistemáticamente valores levemente menores de resistencia eléctrica que el clon ASL1, y mucho menores que las células control.



**Figura 5.4. - Esquema de diferenciación de células Caco-2.** Las células se siembran a una confluencia mayor a 100% en filtros transwell (a). Las células se adhieren a la membrana del filtro (b) y el exceso de células que quedan sueltas se eliminan al cambiarle el medio a las 24hs (c). Al no poder crecer y expandirse lateralmente, las células comienzan el proceso de diferenciación que lleva unos 15-18 días, a partir de los cuales las células se polarizan y expresan varios marcadores de diferenciación propios de enterocitos, en particular el ribete en cepillo (d y e). En particular las células forman uniones estrechas (“tight junction”) entre ellas definiendo así una monocapa de células con permeabilidad selectiva (e). Para testear la diferenciación de las células, se elimina el medio de cultivo y se lavan las células en PBS (f) y se mide la resistencia eléctrica a través de la monocapa con un voltímetro adosado a un par de electrodos que se sumergen en los medios apical y basal (g). Si la monocapa supera el umbral de 250 Ohm.cm<sup>2</sup> se supone que las células están diferenciadas y se pueden realizar los ensayos metabólicos con el medio apical y basolateral independientes (h).

Como se estableció en el capítulo introductorio, los FA son fundamentales para el crecimiento celular, tanto como un componente estructural de membranas, como por su gran aporte energético. Los parámetros de viabilidad aquí analizados son necesarios para el mantenimiento de las células en cultivo y el diseño de los experimentos metabólicos; pero también pueden estar revelando un vínculo entre la expresión de LFABP con la proliferación celular. Generalmente se acepta que el grado de diferenciación celular normalmente viene acompañado de una disminución de la velocidad de crecimiento celular. Sin embargo, en este

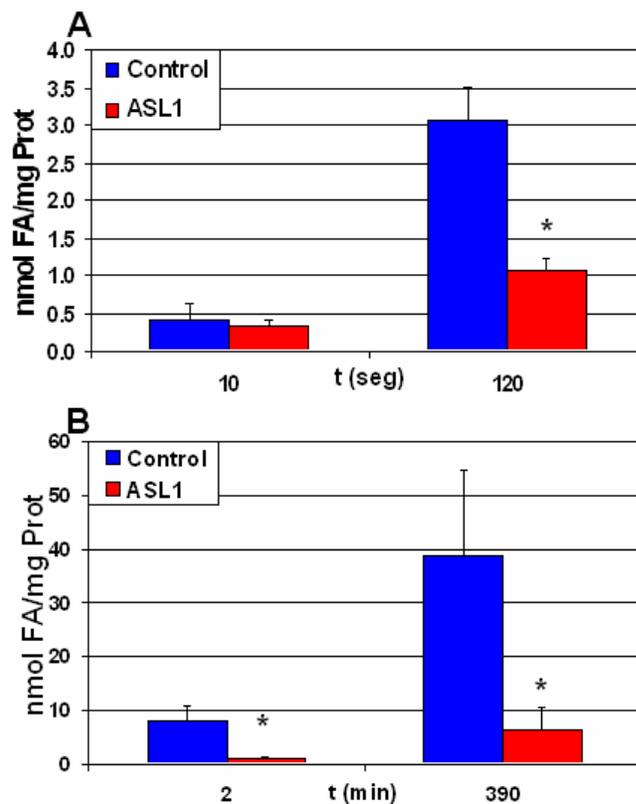
caso los clones con menor velocidad de crecimiento también mostraron un retraso en la diferenciación celular. Al parecer, la disminución de la expresión de LFABP disminuye la capacidad de proliferación celular y afecta la diferenciación de las células Caco-2. Esto podría estar vinculado al rol de transporte de esta proteína hacia una ruta de síntesis de componentes esenciales para la duplicación o la diferenciación de la célula, o hacia el núcleo para la regulación del proceso mitótico o de diferenciación celular. Por otro lado, se ha asociado a la LFABP con la oxidación de FA a nivel mitocondrial; por lo que la falta de LFABP podría comprometer la obtención de energía o el censado de una reserva de TG suficiente para completar el proceso de división celular. En definitiva, experimentos específicos serán necesarios para analizar la razón específica por la cual la ablación de LFABP prolonga el  $t_D$  y disminuye la velocidad de asimilación de  $^3\text{H}$ -Timidina al tiempo que enlentece la diferenciación celular.

Por razones prácticas referidas al crecimiento más lento del clon ASL2, la mayoría de los experimentos que se describen a continuación se realizaron hasta el momento exclusivamente con la línea ASL1 y las células control.

### 5.2.3. - Asimilación de FA

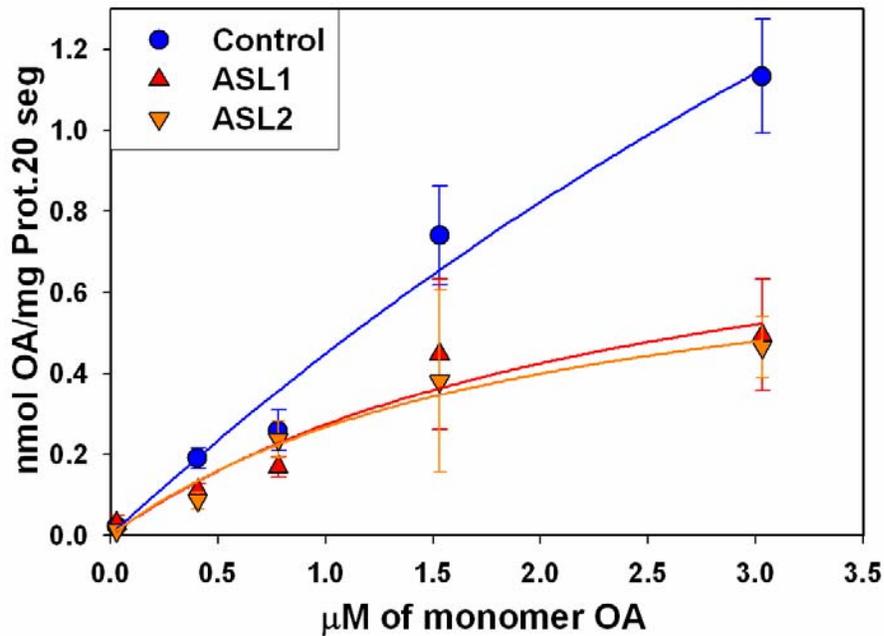
Para simular la asimilación de FA por los enterocitos desde la luz del intestino, las distintas líneas de células Caco-2 se crecieron y diferenciaron en filtros de  $0,33\text{ cm}^2$  durante 18 días. Luego de chequear con el voltímetro que las células se han diferenciado (resistencia  $>250\text{ Ohm.cm}^2$ ), se incubaron con una suspensión de ácido oleico (OA)  $100\text{ }\mu\text{M}$  y  $10\text{ mM}$  Taurocolato en buffer fosfato salino (PBS), tal que la concentración de AO libre es  $1,6\text{ }\mu\text{M}$ , apenas por debajo de los niveles postprandiales (Murota, *J Nutr.* 2005). Se analizó la asimilación de AO a distintos tiempos y filtros de distinto tamaño, y los resultados se muestran en el **Figura 5.5**. El primer ensayo se realizó a los 10 y 120 seg, dentro del rango lineal de asimilación de células Caco-2 sin alterar (Murota, *J Nutr.* 2005). Como se puede apreciar en el panel **A**, en ambos casos se observó una disminución de la capacidad de asimilación de AO por las células ASL1 respecto a las células control, significativamente mayor a los 2 min ( $65,3\%$ ,  $p<0,05$ ) que a los 10

segundos (22, 5%, no significativo). Esta diferencia es aún más notoria al repetir el análisis de asimilación en filtros de 4,5 cm<sup>2</sup> y en un tiempo más prolongado, unas 6,5 hs. En este caso, se observa una disminución de la asimilación de OA aproximadamente del 85% (p<0,05) (**Figura 5.5**, panel **B**). Así mismo, el ensayo a 2 min en las mismas condiciones resultó en una mayor disminución de la asimilación de AO que la observada en los filtros pequeños. Es importante tener en cuenta que los niveles de OA en el citoplasma a las 6,5 hs no son proporcionales al tiempo de incubación en comparación con los resultados observados a 2 min. Esto se debe a que parte de los OA asimilados durante 6,5 hs han sido secretados por la cara basolateral, por lo cual no se observan entre el pool de lípidos citoplasmáticos aquí analizado. Asimismo, los ensayos de 2 min o menos son demasiado cortos para ver el metabolismo de los FA asimilados hasta su secreción por la cara basolateral. Por tal motivo se empleará sólo el tiempo de 6,5 hs para los ensayos de secreción de AO asimilado y secretado por la cara opuesta (ver más adelante, **Sección 5.2.4**).



**Figura 5.5. - Asimilación de OA a distintos tiempos.** Células Caco-2 con la expresión de LFABP disminuida y células control diferenciadas fueron incubadas en filtros transwell con la suspensión de 100  $\mu$ M OA (1% <sup>3</sup>H-OA) y 10 mM Taurocolato en PBS 10 seg, 120 seg (2 min) o 390 min (6,5 hs).

Con el fin de caracterizar las líneas obtenidas, se realizó el mismo ensayo de asimilación, pero en 20 seg, variando la concentración de OA desde 2 hasta 200  $\mu\text{M}$ . Cuando se grafican estos resultados (**Figura 5.6**) en función de la concentración de monómero de FA libre, estimada como el 1,5% de la concentración total de FA en la solución de 10 mM Taurocolato (*Murota, J Nutr. 2005*), se observa un comportamiento saturable típico de un proceso mediado por un transportador proteico, similar al de una enzima michaeliana. De este modo se calcularon los parámetros análogos a  $K_M$  y  $V_{\text{max}}$  para cada línea celular y se observa que los clones ASL1 y ASL2 poseen una marcada disminución, de aproximadamente 5 veces, de la constante aparente de afinidad ( $K_M$ ) y la velocidad máxima de asimilación ( $V_{\text{max}}$ ) en comparación a las células control (**Tabla 5.1**). Esto remarca la importancia de la LFABP en el proceso de asimilación de OA a través de la cara apical en las células Caco-2.



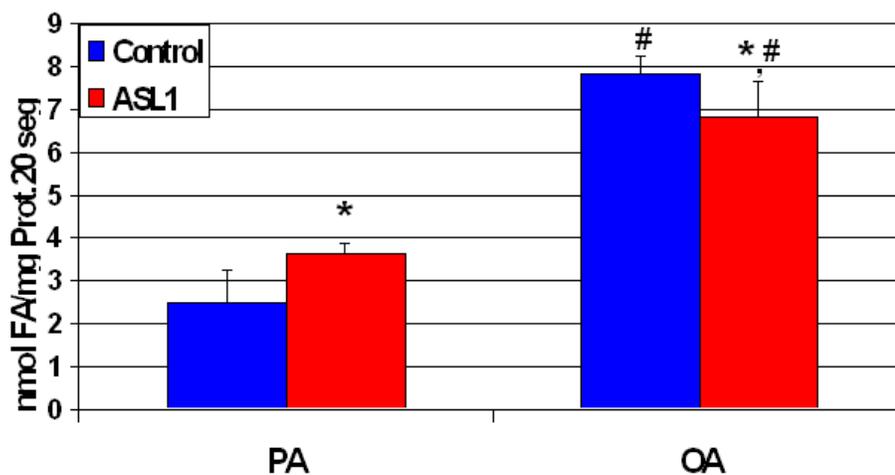
**Figura 5.6. – Determinación de parámetros cinéticos de la asimilación de OA en células Caco-2 transfectadas.** Las células se incubaron durante 20 seg con concentraciones de OA entre 2 y 200  $\mu\text{M}$ . La cantidad de OA asimilado se normaliza por el contenido de proteína y los resultados se expresan en función de la concentración de monómero libre, aquí estimados como el 1,5% de la concentración total en la solución de Taurocolato 10 mM en PBS. Del ajuste a una hipérbola simple de dos parámetros se calcula la  $V_{\text{max}}$  y el  $K_M$  de cada línea celular. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.1**.

**Table 5.1. – Parámetros cinéticos de la asimilación de OA en células Caco-2 transfectadas.<sup>a</sup>**

Línea celular	Vmax (nmol OA/mg Prot/20 seg)	CV%	K <sub>M</sub> (mM OA)	CV%
Control	5.04	77.2	10.24	95.4
ASL1	0.95	41.1	2.47	73.5
ASL2	0.79	21.9	1.97	42.2

<sup>a</sup> El cálculo de los parámetros cinéticos se llevó a cabo suponiendo una cinética saturación de tipo Michaelis-Menten y ajustando los datos a una hipérbola simple de dos parámetros. Debido a los pocos puntos que se pueden medir antes de alcanzar la CMC del OA libre se observa bastante error tanto en la Vmax como en la K<sub>M</sub>.

La asimilación comparativa de OA y ácido palmítico (PA) mostró un comportamiento diferencial (**Figura 5.7**), siendo la asimilación de PA significativamente menor que la de OA en ambas líneas, probablemente debido a la menor solubilidad del primero. Por un lado, se confirmó la diferencia observada en la asimilación de OA, aunque la disminución de AO asimilado por el clon ASL1 fue sólo del 12% en este caso ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la velocidad de asimilación de PA de ASL1 es un 44% mayor que la de las células control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.7. - Asimilación de OA y PA en células con la expresión disminuida de LFABP.** Células Caco-2 con la expresión disminuida de LFABP (ASL1) y control se incubaron con 100 mM FA en 10 mM Taurocolato durante 20 seg. Las barras muestran la asimilación de PA y OA normalizada por el contenido de proteínas. Diferencia entre líneas celulares \*  $p < 0,05$ , diferencia entre FA #  $p < 0,05$ .

Los resultados de la velocidad de asimilación de las células control están dentro del rango publicado para las células de la línea Caco-2 original (*Murota, Biosci Biotechnol Biochem. 2001; Murota, J Nutr. 2005*). Esto nos permite referir los cambios observados en los clones ASL1 y ASL2 a la aparente eliminación de la expresión de LFABP. Aunque los resultados interensayo presentan bastante dispersión, se observa una clara y significativa disminución de OA asimilado por el clon ASL1. De este modo, los resultados hasta aquí presentados muestran que la LFABP no parece ser indispensable para la asimilación de FA, pero que si tiene un notorio efecto favorecedor sobre la velocidad de asimilación de OA y PA, posiblemente aceptando los FA de la membrana plasmática apical.

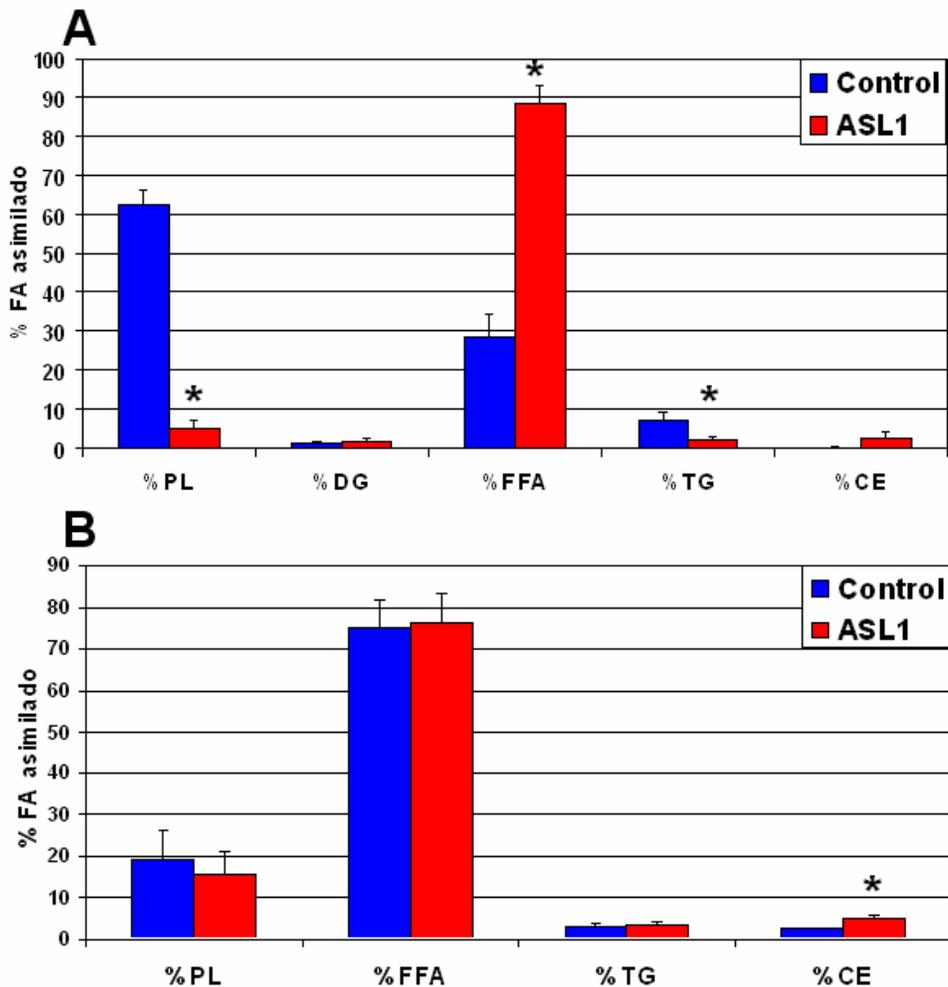
#### **5.2.4. - Metabolismo de OA**

En la sección anterior comprobamos que LFABP participa de la asimilación de FA a través de la cara apical, pero para analizar el metabolismo interno y la secreción de lípidos es necesario analizar la incorporación de los FA en los distintos grupos de lípidos separados en una TLC. La asimilación durante 10 ó 20 seg es demasiado corta para ver un metabolismo significativo, por lo que los ensayos se realizaron a 2 min y 6,5 hs en filtros de 4,5 cm<sup>2</sup> con 1ml de suspensión de 100 mM OA y 10 mM Taurocolato en PBS. Las células son cosechadas como en los ensayos anteriores y se separó una fracción para el aislamiento de lípidos que luego son separados por TLC. La **Figura 5.8** muestra la distribución de marca en PL, DG/Chol, FA libres (FFA), TG y EC a estos tiempos.

Como se observa en el panel **A**, la distribución porcentual del OA asimilado en los principales grupos de lípidos, luego de 2 min de incubación, indica que está desfavorecida en el clon ASL1 la incorporación del OA en PL y TG por lo que queda circulando como FA libres o unido a alguna otra SLBP en el citoplasma. Así mismo, a tiempos cortos se observó marca a nivel de la fracción de DG/Chol correspondiente a moléculas de OA que se incorporan en el intermediario de síntesis DG, ya que el tiempo es demasiado corto como para que el FA se metabolice a Colesterol. Por otro lado, luego de 6,5 hs (panel **B**), los

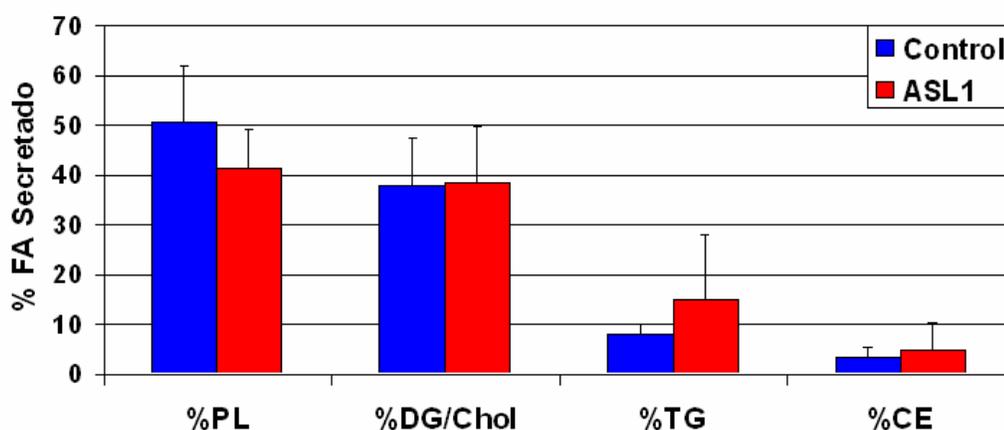
niveles de AO en PL y TG se han igualado y los niveles de FA libres en el citoplasma siguen siendo dominantes en ambas líneas celulares. En este caso no se observó marca significativa en la fracción DG/Chol, pero se observa un leve aumento de marca en la fracción CE en el clon ASL1 con respecto a las células control.

Es importante resaltar que las monocapas se sometieron a exhaustivos lavados con BSA 1% en PBS previamente a su cosecha, y como control se midió la radioactividad de estos lavados para corroborar que no quedaban FA unidos, pero sin incorporar al citoplasma de las células.



**Figura 5.8. - Metabolismo de OA asimilado a través de la membrana apical.** Análisis de la distribución de OA asimilado luego de 2 min (A) y 6,5 hs (B) en el clon ASL1 y células control. \*  $p < 0,05$

En cuanto a los lípidos secretados a través de la cara basal de las células luego de 6,5 hs, la cantidad total de derivados del OA metabolizado en el clon ASL1 no fue significativamente diferente al de las células control. Además, en la distribución porcentual de AO marcado en PL, DG/Chol, TG y EC, secretados al medio basal en forma de lipoproteínas, no se observan preferencias para el metabolismo del mismo (**Figura 5.9**). Sin embargo, pareciera haber una tendencia a presentar una menor cantidad de marca incorporada en PL y compensada con un leve aumento en TG, pero que no llega a ser estadísticamente significativa.



**Figura 5.9. - Distribución de OA en lípidos secretados.** Los lípidos secretados por la cara basal de las células Caco-2 incubadas 6,5 hs con 100 $\mu$ M OA y 10 mM Taurocolato en PBS en la cara apical, se aislaron y corrieron en una TLC. El porcentaje de marca radiactiva en cada fracción se muestra para las células control y las del clon ASL1 con la expresión disminuida de LFABP.

Estos resultados muestran que LFABP podría ser importante para los pasos iniciales de la metabolización del OA pero que, a tiempos largos, las diferencias observadas se desvanecen, lo que se refleja también en la composición de las partículas lipoprotéicas secretadas por la cara basolateral

### **5.3. - Conclusiones**

Los ensayos *in vitro* permiten obtener gran cantidad de información sobre las FABP, pero para avanzar sobre el rol específico que estas proteínas cumplen *in vivo* es necesaria una aproximación más cercana al funcionamiento real de las mismas. Los ensayos con células Caco-2 en cultivo representan un estadio de complejidad intermedio y fundamental, en el cual podemos analizar el efecto que tiene la expresión de las FABP intestinales en el entorno celular, despojado de las variaciones debidas a ciclos hormonales, dietas complejas no definidas, ciclo circadiano, etc.

Aunque más experimentos son necesarios para comprobar la participación específica de LFABP, pudimos demostrar que la LFABP participa de varios procesos celulares: el crecimiento celular, la diferenciación de las células Caco-2, la asimilación de FA y su metabolismo posterior. La disminución de los niveles de esta proteína retrasa el crecimiento y la diferenciación celular en los clones ASL1 y ASL2. Además se vio disminuida al 20% la capacidad de asimilación de OA acompañada por una mayor afinidad aparente. Por otro lado, la asimilación de OA se vio disminuida a distintos tiempos, mientras que la de PA fue favorecida. Asimismo, mientras que, en las células control, el OA asimilado fue rápidamente incorporado en PL y TG principalmente, en el clon ASL1 la mayoría del OA asimilado se recupera en la fracción de FA libre. Sin embargo, a tiempos largos, estas diferencias desaparecen y no se observan diferencias ni en la cantidad de ni en la distribución del OA se secretado por la cara basolateral.

Estos resultados nos podrían estar indicando que la LFABP tendría un rol facilitador para el metabolismo diferencial de FA a tiempos cortos, por lo que podría participar de un sistema sensor de cambios en la disponibilidad de FA en los enterocitos. Ensayos recientes con los ratones LFABP<sup>-/-</sup> parecen asociar también a la LFABP a la oxidación de los FA (Lagakos W. et al., resultados aún sin publicar; *Erol, FASEB J. 2004*) y a los primeros pasos de la formación de Quilomicrones en intestino (*Neeli, J Biol Chem. 2007*), en los cuales resulta ser también un factor promotor de dichos procesos.

En relación a los resultados del capítulo anterior, podríamos conciliar la capacidad aumentada de interacción de LFABP en su forma apo con membranas con la toma de FA desde la membrana apical durante su asimilación. Además, empleando el ensayo de FRET entre AOFA y SUV, se ha comprobado la capacidad de LFABP e IFABP de remover el ligando de membranas dadoras (Thumser, *J.Lipid Res.* 2000). Aquí también demostramos que la LFABP participaría del proceso de asimilación de OA mediado por transportadores proteicos, ya que en las condiciones empleadas el mecanismo de difusión simple sería minoritario. Sin embargo, los estudios de sobreexpresión de IFABP en células Caco-2 muestran que la capacidad de asimilación de OA disminuye en lugar de promoverse. Pero también podríamos reinterpretar los resultados pensando que, la disminución en la asimilación en este último caso, se debe a una competencia de los ligandos entre IFABP y LFABP, y no necesariamente a un efecto inhibitor de la IFABP, sino a una menor acción de LFABP. Estos ensayos juntos son los primeros en proveer evidencia en el mismo sistema celular de que IFABP y LFABP cumplirían funciones específicas. Sin embargo, los procesos moleculares responsables de estas diferencias se mantienen esquivos y más estudios serán necesarios para dilucidarlos







## Capítulo 6:

# Primera Caracterización Biofísica- Funcional de la Proteína Transportadora de Esteroles de *Yarrowia lipolytica* (YLSCP)

### 6.1. - Introducción

#### **6.1.1. - SLBP en levaduras**

Los esfuerzos por identificar una representante de la familia de las FABP, en levaduras llevaron a la identificación de una proteína de la familia SCP2 en *Yarrowia lipolytica*, una levadura que posee una capacidad extraordinaria de degradar eficientemente sustratos hidrofóbicos empleando rutas metabólicas específicas (Fickers, *FEMS Yeast Res.* 2005). Además, *Y. lipolytica* presenta una gran capacidad citosólica de unión de FA gracias a esta proteína de alrededor de 15 kDa; similar al peso molecular de las FABP, pero con una estructura tridimensional totalmente distinta y que pertenece a la familia SCP2, YLSCP2 (*Y. lipolytica Sterol Carrier Protein-2* o Proteína Transportadora de Esteroles-2 de *Yarrowia lipolytica*) (Dell'Angelica, *Comp Biochem Physiol B.* 1992). La misma ha sido clonada y un reporte sobre las características biofísicas generales de esta proteína y su capacidad de unión de ligandos hidrofóbicos ha sido publicada recientemente (Ferreyra, *Arch Biochem Biophys.* 2006). La YLSCP2 es una proteína de un único dominio con estructura secundaria tipo  $\alpha/\beta$ , muy similar a otras SCP2 solubles de hongos y eucariotas superiores, según la predicción de su estructura tridimensional por modelado por homología (Burgadt et al., manuscrito en preparación).

La YLSCP2 se destaca por su capacidad de unir ácido cis-parinámico y palmitoil-CoA con afinidades submicromolares,  $81 \pm 40$  y  $73 \pm 33$  nM

respectivamente, comparables con las que presentan las FABP por los mismos ligandos (Ferreira, *Arch Biochem Biophys*. 2006) Estudios preliminares con la levadura *Y. lipolytica* parecen indicar que la YLSCP2 se expresa en niveles muy bajos cuando el medio de cultivo es rico en nutrientes, en particular hidratos de carbono que sirven como fuente de carbono. Pero el nivel de expresión de YLSCP2 se incrementa por la incubación en un medio mínimo suplementado con un compuesto hidrofóbico como única fuente de energía. En especial, FA como el palmitato, pero también compuestos más sencillos, actúan como inductores de la expresión de YLSCP2 (Dell'Angelica, *Comp Biochem Physiol B*. 1992; Dell'Angelica, *Folia Microbiol (Praha)*. 1993; Dell'Angelica, *Biochem Mol Biol Int*. 1996). Estas características parecen comprobar por sí solas que el rol específico de esta proteína está íntimamente vinculado al metabolismo de FA; pero resulta importante destacar que además la YLSCP2 sería una proteína de localización preferentemente citosólica y peroxisomal (Falomir Lockhart *et al*, en consideración en *Biophys J*). El peroxisoma es un compartimiento intracelular de reconocida importancia en el metabolismo lipídico; por lo que la localización preferencial de YLSCP2 podría estar indicando un direccionamiento de los sustratos hidrofóbicos hacia un destino metabólico acoplado a las rutas catabólicas activas en esta organela.

### 6.1.2. - Hipótesis de trabajo y objetivos

En este trabajo de tesis se presenta un análisis *in vitro* sobre las posibles funciones de la YLSCP2 dentro de la célula como un transportador de ligandos hidrofóbicos bajo la hipótesis de que, ***debido a que en hongos no se expresan representantes de la familia FABP, la SCP2 en la levadura Yarrowia lipolytica cumpliría los mismos roles que estas en animales***. En particular se estudia su rol como proteína que interviene en la unión y transferencia de FA hacia membranas fosfolipídicas en distintas condiciones, analizando los mecanismos moleculares subyacentes.

El objetivo general del proyecto es investigar la relación estructura-función de la YLSCP2 de *Y. lipolytica*. Mediante técnicas de biofísicas, bioquímicas y de

biología molecular se busca lograr **comprobar la capacidad de transporte de ligandos hidrofóbicos de la YLSCP2 y su participación en el metabolismo lipídico de *Y. lipolytica*, así como los determinantes estructurales responsables de dicha especificidad.** Los objetivos específicos que se abarcan en este trabajo de tesis son los siguientes:

- 5) Determinación de la capacidad de unión de análogos fluorescentes de FA y colesterol.
- 6) Determinación de las constantes de partición de los análogos fluorescentes entre la proteína y membranas fosfolipídicas artificiales.
- 7) Determinación de la velocidad y el mecanismo de transferencia de ligandos hidrofóbicos a membranas fosfolipídicas modelo, y los factores que modulan dicha transferencia.
- 8) Determinación de los parámetros termodinámicos de la transferencia de ligandos hidrofóbicos

### 6.1.3. - Importancia de la los ensayos propuestos

Entre los pocos motivos estructurales conocidos capaces de unir lípidos en forma reversible se encuentran las SCP-2. Es de particular interés el caso del gen *scpx/proscp-2* de mamífero que posee dos sitios de iniciación y produce dos mRNA: uno codifica para proSCP-2, y el otro codifica para SCPx, una 3-cetoacil thiolasa peroxisomal con afinidad para FA ramificados que lleva el dominio SCP-2 en el extremo C-terminal (*Stolowich, Cell Mol Life Sci. 2002*). El propéptido N-terminal en las proSCP-2 de animales participa de la asociación con membranas y la importación a peroxisomas (*Schroeder, J. Biol. Chem. 2000; Starodub, Am J Physiol Cell Physiol. 2000; Huang, Biochem J. 1999; Otera, Mol Cell Biol. 2002*). Sin embargo, dicho péptido está ausente en las SCP-2 de hongos y levaduras, sin verse afectada la función de la misma, y puede ser importada a peroxisomas sin problemas en *S. cerevisiae* (*Tan, Yeast 1994*).

Una de las razones de nuestro interés en SCP-2 estriba en que, a pesar de su ubicuidad en la naturaleza, el dominio SCP-2 cumpliría roles múltiples y

diferenciados en cada tipo de organismo, e incluso en cada tipo de compartimiento celular. La SCP-2 guarda aún gran parte de los 'secretos' que permiten la gran versatilidad funcional observada en las distintas proteínas de las que participa. La habilidad de unir FA es una característica bien conocida de las SCP-2 de animales (*Frolov, J. Biol. Chem 1996; Stolowich, Biochemistry 1997*), y su amplia difusión lleva a creer que es la SLBP transportadora de FA más generalizada en eucariotas. Esto, junto con su naturaleza peroxisomal, sugiere que las SCP-2 de animales y levaduras compartirían roles similares en el metabolismo de lípidos (*Gallegos, Prog. Lipid Res. 2001*). No obstante, YLSCP2 se expresa sólo después de la inducción por el ligando, mientras que las SCP-2 animales lo hacen constitutivamente, indicando que sus funciones podrían ser más restringidas en levaduras que en mamíferos. Esta hipótesis se apoya también en el hecho de que aunque la SCP-2 no se encuentra en *S. cerevisiae*, el metabolismo de lípidos es normal en esta levadura (*Trotter, Biochim Biophys Acta. 1999; van Roermund, Cell Mol Life Sci. 2003; Hiltunen, FEMS Microbiol Rev. 2003*); lo que implica que la función de SCP-2 no sería esencial para su supervivencia, o que la YLSCP2 está involucrada en funciones que no se requieren o desempeña otra proteína en *S. cerevisiae*. En su conjunto, todas estas evidencias nos llevan a proponer que las SCP-2 de levaduras podrían facilitar la oxidación de FA.

Teniendo en cuenta las profundas diferencias que existen en la forma en que distintas células transportan y transfieren compuestos hidrofóbicos y las diferencias que se manifiestan en la filogenia y en la distribución tisular de las SLBP, es de esperar que estas diferencias se manifiesten también a nivel estructural y funcional en las SCP-2 de diferentes organismos; y es por esto que nos proponemos estudiar la YLSCP2, como modelo de funcionamiento de las SCP-2 en microorganismos. Es probable que los resultados obtenidos de los ensayos propuestos en el presente capítulo tengan relevancia fisiológica y nos permitan plantear nuevas hipótesis más específicas relacionadas al rol único de la YLSCP2 en el metabolismo celular.

Además del evidente interés en el conocimiento básico en la función de ésta proteína, el estudio de las SCP-2 de levaduras promete interesantes réditos

en términos de futuras aplicaciones biotecnológicas, ya que la ingeniería metabólica de microorganismos aptos para la degradación de residuos industriales lipídicos es un objetivo de crítica importancia. El empleo de esta levadura en la industria alimenticia, química fina, tratamientos de efluentes industriales y otros, además puede repercutir en aplicaciones prácticas de distinta naturaleza en el largo plazo; pero para ello es necesario estudiar a fondo el metabolismo de *Y. lipolytica* y su regulación. Además, el conocimiento del rol clave en el metabolismo de alta eficiencia de lípidos en *Y. lipolytica* gracias a la YLSCP2 permitirá formular, a partir de la generalización de los resultados alcanzados, modelos de transporte y transferencia de lípidos en otros microorganismos.

## **6.2. - Resultados y Discusión**

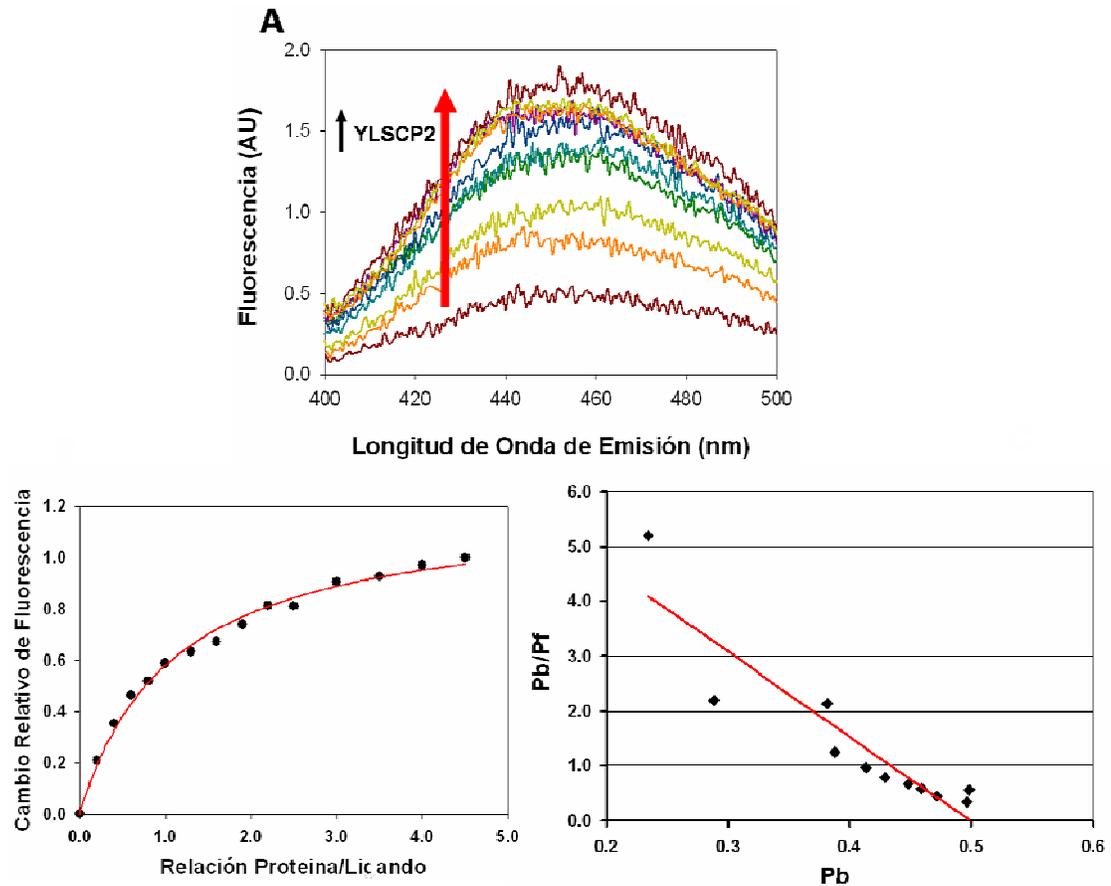
### **6.2.1. - Capacidad de unión de análogos fluorescentes**

YLSCP2 posee una demostrada capacidad de unión de ligandos naturales como palmitoil-CoA o ácido cisparinámico (*Ferreyra, Arch Biochem Biophys. 2006*). Con la finalidad de evaluar la posibilidad de emplear análogos fluorescentes de ligandos hidrofóbicos para una caracterización más profunda de esta proteína, se realizaron ensayos de titulación fluorimétrica de antroiloxi-ácidos grasos (AOFA) y Dehidroergosterol (DHE), análogos de FA y esteroides respectivamente.

En cuanto a la unión de los AOFA, se observó que la intensidad de fluorescencia del 16AP (antroiloxidado del ácido palmítico) unido a YLSCP2 era superior al observado para otros compuestos de la misma familia como el 12AO (análogo del ácido oleico) o el 12AS (análogo del ácido esteárico), aunque las afinidades calculadas en un único experimento en paralelo eran muy similares. Por tal motivo se seleccionó al 16AP para los siguientes estudios a fin de analizar la transferencia de FA desde YLSCP2 a membranas. El valor de la constante de disociación  $K_D$  para el equilibrio entre 16AP y la proteína es de  $60 \pm 11$  nM, calculada a partir de 9 repeticiones, y presenta buena correlación con los valores ya publicados para el ácido cis-parinámico ( $81 \pm 40$  nM). A su vez, el valor obtenido de  $K_D$  para YLSCP2 se encuentra dentro del orden de los descriptos para las FABP. En la **Figura 6.1** se muestran los espectros de un ensayo representativo (panel **A**), el ajuste no lineal para un sitio de unión por molécula de proteína (panel **B**) y el ajuste por el método de Scatchard (panel **C**) para calcular la  $K_D$ . Ambos métodos de ajuste devolvieron resultados equivalentes.

Por otro lado, tanto los ensayos de unión a DHE como los de competencia entre 16AP y colesterol, no pudieron evidenciar que YLSCP2 tenga algún tipo de afinidad por estos esteroides. Técnicas indirectas han logrado demostrar la participación de las SCP2 de mamíferos en el transporte de colesterol entre vesículas (revisado en *Schroeder, Exp Biol Med (Maywood). 2001*), pero su capacidad directa de unión aún está en duda. Un análisis más profundo será

necesario para determinar el rol de las SCP-2 en el transporte y metabolismo de esteroides en levaduras.



**Figura 6.1 - Titulación fluorimétrica de 16AP con YLSCP.** (Página siguiente) En el panel **A** se observa el aumento de fluorescencia del 16AP con cada agregado de YLSCP2. La fluorescencia a 450nm se empleó para calcular la  $K_D$  según se detalla en el **Apéndice A**. El panel **B** muestra el ajuste no lineal a una ecuación cuadrática que describe la unión del ligando a un único sitio en la proteína. El panel **C** muestra la transformación de Scatchard del gráfico de saturación.

Basándonos en éstos ensayos hemos podido confirmar los resultados anteriores de unión a FA y sus derivados fluorescentes, pudiendo YLSCP2 servir para mantener disponibles en solución cantidades significativas de FA para su metabolismo posterior o cumplir una función de buffer citosólico. Esto podría estar indicando que la proteína es un buen candidato para el transporte de ligandos

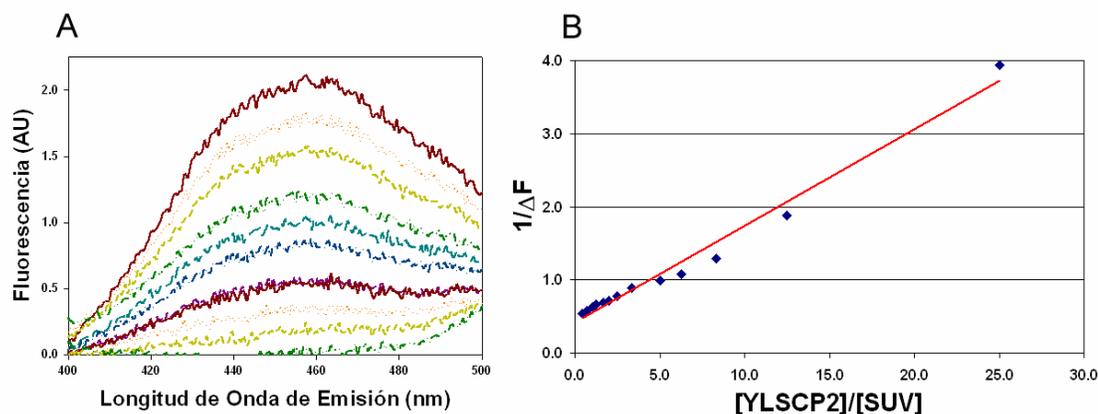
hidrofóbicos, con especial afinidad por FA libres y activados, aunque no así tanto por esteroides.

### 6.2.2. - Partición de ligandos fluorescentes

La constante de partición ( $K_P$ ) describe la afinidad relativa de un ligando entre la proteína y la membrana. En la **Figura 6.2** se muestra un ensayo representativo de la titulación del complejo YLSCP2-16AP preformado con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo el quencher NBD-PC (panel **A**), y el ajuste de la transformación lineal para calcular el  $K_P$  como se describe en el **Apéndice A** (panel **B**). El valor resultante de  $K_P$  para el 16AP, calculado a partir de 7 determinaciones independientes, es de  $2,6 \pm 0,5$  Prot/SUV; evidenciando una mayor afinidad relativa por YLSCP2 en comparación con las membranas de EPC.

El valor de  $K_P$  para AOFA entre membranas y las distintas SLBP varía ampliamente, desde 11,1 Prot/SUV para la LFABP has 0,15 Prot/SUV para la IFABP. El resultado para 16AP e YLSCP2 estaría de acuerdo con los valores reportados para la LFABP que presenta también afinidades mayores a las otras FABP y un  $K_P$  mayor a 1; mientras que el resto de las proteínas de la misma familia presenta un  $K_P$  menor a 1, indicando una mayor afinidad de los ligandos por las membranas. En general se observa que se mantiene una relación entre la  $K_D$  y el  $K_P$  para los AOFA. A menores  $K_D$  aumenta el  $K_P$ , lo que es perfectamente lógico, ya que la tendencia refleja la mayor afinidad de la proteína por el ligando.

El valor de  $K_P$  es fundamental al momento de configurar el sistema para el ensayo de transferencia de los ensayos que se detallan a continuación. Al igual que para las FABP, se emplea para garantizar que se observará un fenómeno de transferencia unidireccional para simplificar el análisis de las curvas de cinética de transferencia.



**Figura 6.2. - Determinación de la constante de partición de 16AP entre YLSCP2 y EPC-SUV.** Titulación fluorimétrica del complejo YLSCP2/16AP preformado con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo un 10 mol% de NBD-PC, que actúa como un aceptor FRET del grupo antroiloxi. En el panel **A** se observa el descenso de la fluorescencia del 16AP con cada agregado de SUV. El panel **B** muestra el ajuste lineal para calcular el valor de KP como se describió en Materiales y Métodos de este capítulo.

### 6.2.3. - Transferencia de AOFA

Integrantes de las distintas familias de SLBP, en particular las pertenecientes a las FABP, han sido ampliamente caracterizadas en sus propiedades de transferencia de ligandos hacia membranas fosfolípídicas modelo, gracias a lo cual se ha podido sustentar la idea de que las distintas isoformas cumplen funciones específicas. Con el objetivo de profundizar los conocimientos en particular sobre la función de la YLSCP2, nos resultó importante determinar el mecanismo por el cuál esta proteína transfiere sus ligandos, así como las características propias y de la membrana aceptora que modulan dicho proceso.

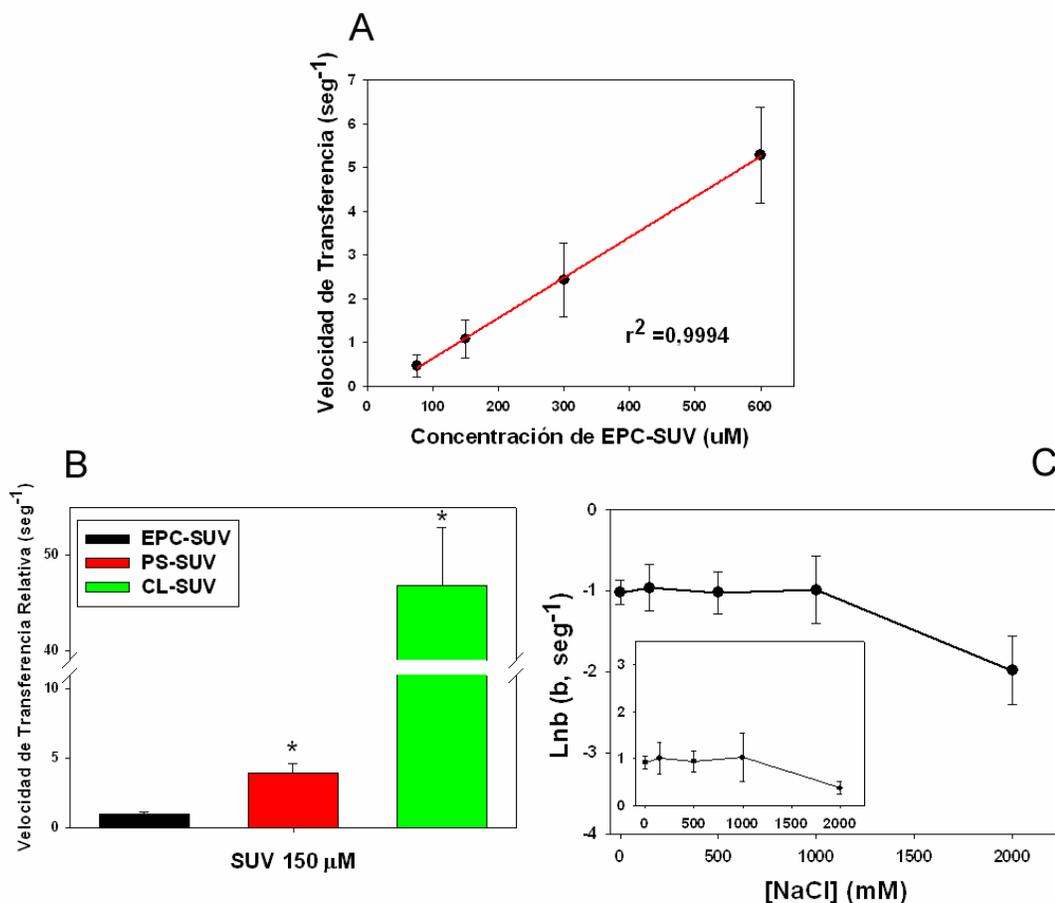
Se analizó el mecanismo de transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia SUV empleando el ensayo cinético de transferencias de energía de resonancia (FRET) descrito anteriormente para estudiar los mutantes puntuales de IFABP. Con tal finalidad se aplicaron tres estrategias: 1) modificación de la concentración de las membranas zwitteriónicasceptoras; 2) modificación de la composición de las membranasceptoras por incorporación de PL aniónicos, y 3) modificación de la fuerza iónica del medio.

### 6.2.3.1. - Efecto de la concentración de vesículas zwitteriónicas.

Como ya se mencionó anteriormente, las SLBP pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos, aquellas que transfieren sus ligandos hacia vesículas con un mecanismo aparente de tipo “colisional” y las que lo hacen a través de un mecanismo de tipo “difusional”. Se analizó la transferencia de 0,25  $\mu\text{M}$  16AP desde 2,5  $\mu\text{M}$  YLSCP2 hacia 75-600  $\mu\text{M}$  vesículas zwitteriónicas de EPC 90% NBD-PC 10% (EPC-SUV). En todos los casos se observó una disminución de la fluorescencia del grupo antróilo, que se ajustó a una cinética de decaimiento exponencial simple de 3 parámetros. Los controles de photobleaching (control de degradación del fluoróforo) mostraron que el fluoróforo no se consumía por reacciones inespecíficas en forma significativa durante el doble del tiempo del ensayo.

La YLSCP2 mostró un comportamiento análogo al de las FABP “colisionales”. Las velocidades de transferencia se registraron en el rango comprendido entre  $0,47 \pm 0,12 \text{ seg}^{-1}$  y  $5,29 \pm 1,02 \text{ seg}^{-1}$  (media  $\pm$  SEM) para concentraciones desde 75 hasta 600  $\mu\text{M}$  SUV, respectivamente. La **Figura 6.3A** muestra los resultados obtenidos cuando una concentración constante del complejo dador YLSCP2/16AP se enfrenta con concentraciones crecientes de EPC-SUV aceptoras. El aumento de la concentración de las vesículas aceptoras en un rango de proporciones SUV/Proteína de 30:1 a 240:1, provocó un incremento proporcional de la velocidad de transferencia del 16AP ( $r^2 = 0,9994$ ).

Se puede concluir que la transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia vesículas zwitteriónicas presenta el comportamiento esperado para un mecanismo de tipo colisional. Es decir, hay un aumento de la velocidad de transferencia de 16AP con el aumento de la concentración de EPC-SUV, que es un reflejo del aumento en la frecuencia de choques efectivos entre el complejo YLSCP2/16AP y la membrana.



**Figura 6.3. - Transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia membranas fosfolipídicas artificiales.** Se empleó un ensayo de FRET para medir la velocidad de transferencia del 16AP en función de la concentración de EPC-SUV (panel **A**), de la composición (i.e. carga neta) de las SUV (panel **B**) y de la concentración de sales (i.e. fuerza iónica) (panel **C**); como se detalla en el **Apéndice A**. Los resultados son compatibles con un mecanismo colisional en el que la etapa limitante depende de la formación de un complejo de transición entre la YLSCP2, el ligando y las membranas. El *inset* del panel **C** muestra las velocidades de transferencia absolutas en función de la concentración de NaCl. Los valores representados son el promedio de no menos de 3 repeticiones independientes  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$

### 6.2.3.2. - Efecto de la carga superficial de las vesículas

En el caso de un mecanismo colisional de transferencia de ligandos, es de esperar un proceso que conste de varias etapas. Probablemente, la primera aproximación del complejo Proteína/Ligando a la membrana esté dirigida por fuerzas de largo alcance, como las electrostáticas. Es por eso que la velocidad de transferencia sería afectada por cambios en la distribución de cargas superficiales de la proteína y/o la membrana.

La **Figura 6.3B** muestra como la velocidad de transferencia de 16AP desde YLSCP2 se incrementa significativamente con la incorporación de 25 mol% de PS en las SUV aceptoras (PS-SUV), observándose un aumento de 3,9 veces la velocidad de transferencia hacia vesículas zwitteriónicas. Este efecto fue drásticamente exacerbado cuando se reemplazó un 25% de EPC por CL (CL-SUV), observándose un aumento de 46,8 veces la velocidad inicial de transferencia de ligandos.

La modulación de la velocidad de transferencia del ligando por la composición de las vesículas aceptoras es una evidencia determinante de que la interacción con las membranas es un paso fundamental de dicho proceso. El mismo efecto se registró con distintas FABP “colisionales”, aunque en este caso, el aumento en la velocidad de transferencia de FA hacia CL-SUV es significativamente mayor al observado, por ejemplo, en IFABP (*Hsu, J. Biol. Chem. 1996; Córscico, Proc Natl Acad Sci. 1998*) Nuevamente, estos resultados apoyan la conclusión de los experimentos descritos en la sección anterior, fortaleciendo la idea de que YLSCP2 transfiere los FA libres en forma colisional, y abriendo la posibilidad de que funcione como un transportador intracelular especializado de lípidos, capaz de dirigir el tráfico de ligandos hidrofóbicos, comprometiendo su destino metabólico.

### **6.2.3.3. - Efecto de la fuerza iónica del medio**

En el mecanismo de transferencia difusional, la velocidad de transferencia de un ligando hidrofóbico desde una proteína hacia una membrana aceptora estará modulada por factores que alteren la solubilidad en agua del ligando (*Hsu, J. Biol. Chem. 1996*), como el aumento de la fuerza iónica del medio. En este sentido, se encuentra bien documentada la disminución de la concentración micelar crítica (CMC) de compuestos anfifílicos debido a un aumento de la concentración de sales del medio (*Charlton, Biochemistry 1982; Constantinides, J Biol Chem 1985*). Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de fosfolípidos aniónicos en vesículas aceptoras incrementa significativamente la

velocidad de transferencia de AOFA desde YLSCP2, lo que se atribuye a la participación de interacciones electrostáticas en la formación de complejo proteína-membrana. De esta manera, para una proteína de tipo “colisional” como YLSCP2, se espera que la velocidad de transferencia sea independiente de la fuerza iónica del medio a concentraciones de NaCl relativamente bajas.

En los ensayos de transferencia de 16AP hacia EPC-SUV realizados, no se detectó un cambio apreciable en la velocidad de transferencia del ligando entre concentraciones de NaCl de 0 a 1000 mM (**Fig. 6.3C**). Por otra parte, el incremento de la fuerza iónica hasta 2000 mM NaCl causó un leve descenso estadísticamente no significativo en la velocidad de transferencia del 16AP desde YLSCP (**Fig. 6.3C, inset**). Esto podría estar sugiriendo un ligero apantallamiento de las interacciones electrostáticas, sólo a altas concentraciones de NaCl. Así, estos resultados son incompatibles con un mecanismo de tipo difusional, como el que se observa para LFABP, para la cual la velocidad de transferencia de FA disminuye proporcionalmente a la concentración de NaCl (*Hsu, J. Biol. Chem. 1996; Di Pietro, Biochemistry 2003; Córscico, Biochemistry 2004; De Gerónimo et al., manuscrito en preparación*).

De este experimento se deduce nuevamente que el mecanismo de transferencia de 16AP desde la YLSCP2 a membranas fosfolipídicas es principalmente colisional, ya que no se observan modificaciones significativas debidas a cambios en la solubilidad del ligando. Esto puede entenderse como que el ligando no entra nunca en contacto con el seno del solvente. Otra posible explicación para el comportamiento observado es que el apantallamiento de las interacciones electrostáticas por el aumento de la fuerza iónica se vea compensado por el aumento de las interacciones hidrofóbicas de la proteína con la membrana, en este caso estimuladas por el aumento de la concentración de sales. Esta hipótesis aún debe ser estudiada y podría cobrar más fuerza una vez resuelta la estructura de la proteína para poder observar la presencia de motivos típicos de interacción con membranas, como  $\alpha$ -hélices anfipáticas o parches de residuos hidrofóbicos en la superficie expuestos al solvente.

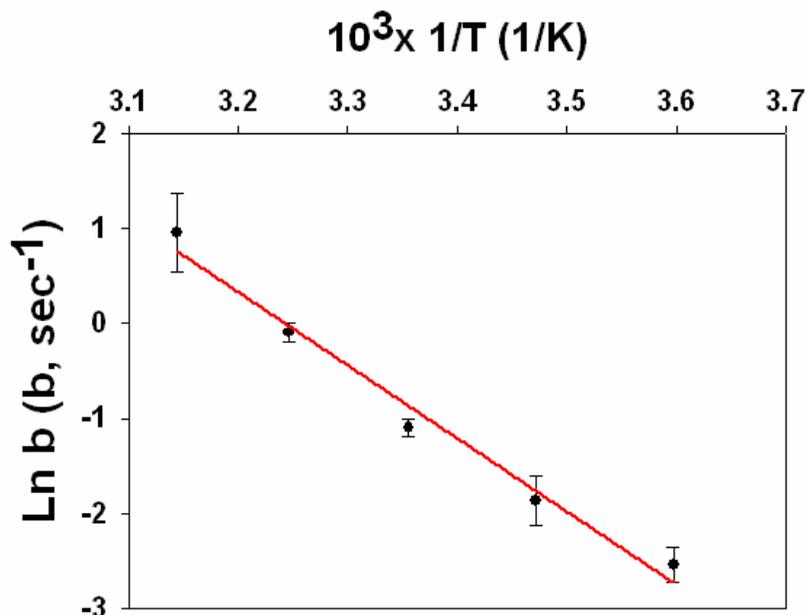
## 6.2.4. - Cálculo de parámetros termodinámicos de la transferencia.

Normalmente se observa una dependencia de las reacciones químicas y los fenómenos de transporte con la temperatura. El análisis de las variaciones de la velocidad de dichos procesos en función de la temperatura permite calcular parámetros termodinámicos que sirven para caracterizar el sistema, así como predecir y comparar los cambios debidos a modificaciones en el seteo de los experimentos o a alteraciones en la proteína. Por este motivo se analizó la relación entre la velocidad de transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia EPC-SUV y la temperatura.

Se observó un aumento de la velocidad de transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia EPC-SUV con el aumento de la temperatura. En la **Figura 6.4** se muestra un gráfico de Arrhenius con los resultados obtenidos a intervalos de 10°C, entre 5°C y 45°C. De la pendiente del gráfico de Arrhenius se obtuvo la Energía de Activación ( $E_A$ ) del proceso, que es de  $15.5 \pm 1.9$  kcal/mol. A partir de este valor, y basándonos en la teoría cinética de Eyring, se calculan a 25°C los cambios de Entalpía ( $\Delta H^\ddagger$ ), Entropía ( $\Delta S^\ddagger$ ) y Energía Libre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ) del Estado de Transición (ver **Apéndice A**), que en este caso correspondería al aducto que se forma entre la proteína, el ligando y la membrana fosfolipídica. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.1**.

**Tabla 6.1. - Parámetros de Activación de la transferencia de 16AP desde YLSCP2 hacia membranas fosfolipídicas modelo.**

$E_A$	$15.5 \pm 1.9$ kcal/mol
$\Delta H^\ddagger$	$14.6 \pm 1.9$ kcal/mol
$-T\Delta S^\ddagger$	$3.5 \pm 1.9$ kcal/mol
$\Delta G^\ddagger$	$18.1 \pm 0.1$ kcal/mol
Los valores se calcularon a partir del gráfico de Arrhenius de las transferencias de 16AP medidas entre 5 y 45°C ( <b>Figura 6.4</b> ). $\Delta H^\ddagger$ , $T\Delta S^\ddagger$ y $\Delta G^\ddagger$ se calcularon a 25°C según se describe en el <b>Apéndice A</b> . Los resultados son los promedios de tres determinaciones independientes $\pm$ SEM.	



**Figura 6.4. - Transferencia de 16AP en función de la temperatura.** El efecto de la temperatura sobre la transferencia de 16AP desde la YLSCP2 hacia EPC-SUV se muestra en un gráfico de Arrhenius a partir del cual se calculan luego los parámetros termodinámicos de la formación del estado de transición en el proceso de transferencia del ligando.

De estos resultados puede concluirse que en el proceso de transferencia hay una importante contribución entálpica ( $14,6 \pm 1,9$  kcal/mol) durante la formación del aducto, con un aporte entrópico menor ( $3,5 \pm 1,9$  kcal/mol). Dichas observaciones ya han sido efectuadas para integrantes de la familia de FABP, que asimismo presentan un mecanismo aparente colisional de transferencia de AOFA, con parámetros termodinámicos muy similares (*Kim, J. Biol. Chem. 1992*). Lo más llamativo es que en todos estos casos, la contribución entrópica es mínima. Normalmente, una contribución negativa del término entrópico es entendido como un aumento en el orden del solvente debido al proceso de transferencia del ligando. La falta de dicho efecto, es una nueva evidencia de que el ligando no entra en contacto con el seno acuoso durante el pasaje desde la proteína hacia la membrana. El cambio en Energía Libre es muy similar para todas las SLBP colisionales, incluyendo YLSCP2 ( $18,1 \pm 0,1$  kcal/mol); pero menor que en el caso de LFABP (20 kcal/mol). Sin embargo, el cambio en Entalpía del proceso colisional es mayor, comparado con las 13 kcal/mol calculados para la transferencia difusional desde LFABP. Esto puede entenderse

como la formación del complejo activado de la proteína, el ligando y la membrana; estabilizado por niveles mayores de uniones tipo puente de hidrógeno o electrostáticas, no sólo de la interacción entre los AOFA y la SLBP sino también entre la proteína y la membrana durante la colisión. En el caso de la transferencia difusional, como desde LFABP o entre membranas, la unión de ligando con la proteína de origen o la vesícula donora también debe ser interrumpida, pero no se observa una compensación por el establecimiento de nuevas interacciones con la vesícula aceptora (*Kim, J. Biol. Chem. 1992; Storch, Biochemistry 1985; Doody, Biochemistry 1980*).

### **6.3. - Conclusiones**

Las únicas SLBP de levaduras conocidas hasta el momento con capacidad de unir FA son la SCP-2 y la ACBP. Sin embargo, la última no une FA libres, sino activados por unión a la Coenzima A (*Kragelund, Biochim. Biophys. Acta 1999*), dejando sólo a la primera como candidata para el transporte de LCFA en estos microorganismos. Además, se cree que YLSCP2 es la única SLBP de localización parcial peroxisomal (*Tan, Yeast 1994*), dejando abierta la pregunta de si esta organela es la única con el potencial de alcanzar concentraciones de FA (libres y Acil-CoA) solubilizados por proteínas mayores a las CMC de los compuestos libres.

En particular, en levaduras muy pocos estudios se han realizado para analizar la relación entre las SLBP y el tráfico o el metabolismo de FA y otros lípidos. *Yarrowia lipolytica* es un microorganismo modelo particularmente bueno para este tipo de estudio debido a su bien conocida voracidad por FA y su habilidad de alimentarse de estos compuestos como única fuente de carbono y energía. Por otro lado, otras levaduras modelo, como *Saccharomyces cerevisiae*, también son capaces de metabolizar FA bajo circunstancias determinadas, aunque más lentamente. Sin embargo, carecen del gen de la SCP2; por lo que podrían servir para realizar experiencias comparativas que puedan permitir vislumbrar la función específica de la SCP2 en *Y.lipolytica* o la identificación de una nueva SLBP en las otras levaduras.

La YLSCP2 es fuertemente inducida por ácido palmítico en un medio de cultivo pobre en glucosa, y la proteína localiza entonces preferentemente en la fracción peroxisomal del lisado celular (*Falomir Lockhart et al, en consideración en Biophys J.*). Además, la inducción de YLSCP2 es tan significativa que excede varias veces la expansión del compartimento peroxisomal debida a la presencia del inductor (*Falomir Lockhart et al, en consideración en Biophys J.*). Teniendo en cuenta la afinidad reportada por los FA libres (análogos y naturales) y activados, la concentración estimada de YLSCP2 en el peroxisoma de ~30 µM resulta ser lo suficientemente alta como para concluir que la proteína tiene la posibilidad y la

capacidad de funcionar como un transportador de FA. La concentración en la fracción citosólica sería menor, pero aún así podría estar colaborando en la movilización de compuestos poco solubles a través del citosol. Además, la afinidad y la concentración de YLSCP2 sugieren que la fracción solubilizada de LCFA libres y activados en el peroxisoma es ínfima.

Parte de este trabajo de tesis fue el estudio de la modulación de la transferencia de los AOFA desde la YLSCP2 hacia membranas fosfolipídicas por variaciones del medio acuoso, la temperatura y por modificaciones de la composición y concentración de las vesículas aceptoras. Estos estudios permitieron establecer que la YLSCP2 presenta un mecanismo de tipo colisional para los FA, de forma análoga al comportamiento observado para la mayoría de los miembros de la familia FABP.

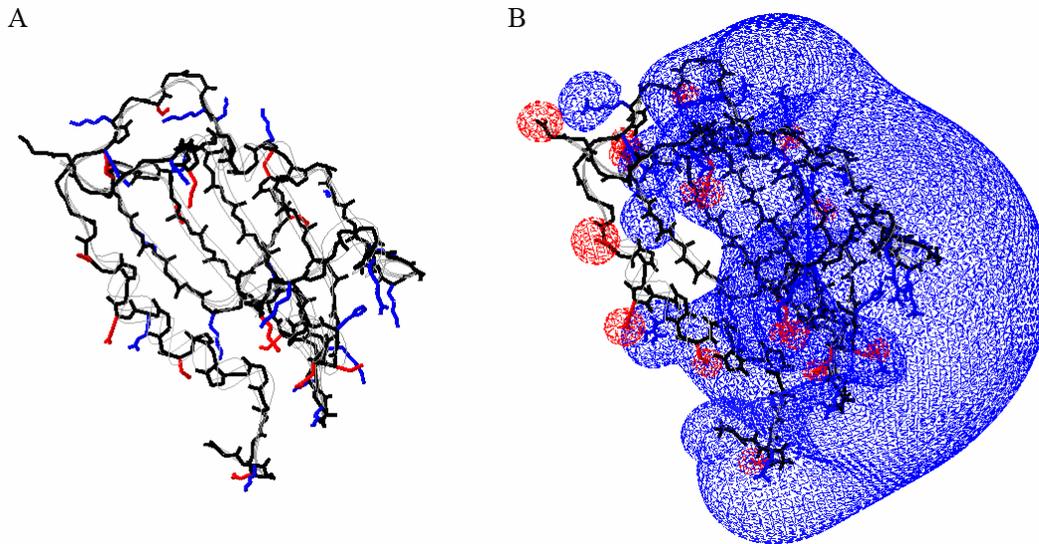
La naturaleza de la interacción entre las SLBP y membranas fosfolipídicas ha sido examinada empleando membranas artificiales y ensayos de FRET, que permite monitorear directamente la cinética de la transferencia de ligandos entre las proteínas y las membranas (Córsico, *Biochemistry* 2004; Córsico, *Pro. Nat. Acad Sci* 1998; Di Pietro, *Biochemistry* 2003). Esta metodología fue desarrollada originalmente para estudiar las FABP citosólicas de mamífero y probó ser útil en la caracterización los integrantes de esta familia de proteínas, clasificándolas en dos grandes grupos: colisionales y difusionales. En este trabajo de tesis, se empleó por primera vez este análisis biofísico para caracterizar funcionalmente una proteína de otra familia de SLBP, resultando ser de gran utilidad para el estudio de la YLSCP2 y abriendo la puerta para su empleo en otras familias de SLBP. Es relevante mencionar que no es necesario ningún tipo de información estructural para este tipo de análisis, lo que permitió aplicarlas a este caso ya que aún no se ha resuelto la estructura de la YLSCP2.

La determinación de la capacidad y el mecanismo de transferencia de ligandos desde YLSCP2 representa una contribución al entendimiento de sus posibles funciones *in vivo*. En particular, el comportamiento observado *in vitro* puede estar sugiriendo ciertas características moleculares relevantes para que cumpla su función biológica. Una serie de evidencias indican que YLSCP2

transfiere sus ligandos en forma colisional, permitiendo una modulación del proceso por la concentración y la composición de las membranas aceptoras. En particular, la velocidad de transferencia de 16AP es altamente sensible a la carga superficial de las membranas aceptoras. El hecho que la cardiolipina estimule desproporcionadamente (más de 40 veces) la transferencia de 16AP es aún más relevante a la luz de su identificación reciente como uno de los componente normales de peroxisomas en las levaduras *Pichia pastori* y *Saccharomyces cerevisiae* (Wriessnegger, *Biochim Biophys Acta*. 2007; Zinser, *J. Bact* 1991), lo que podría estar indicando un mecanismo específico de direccionamiento en el transporte de lípidos. Estos resultados concuerdan con datos del efecto de la SCP2 de mamífero en la transferencia de esteroides entre membranas, que parece ser máxima hacia vesículas cargadas negativamente. Por último, aunque las interacciones electrostáticas parecen tener un rol fundamental en la transferencia de ligandos hacia vesículas con carga neta negativa, la intervención de interacciones hidrofóbicas no puede ser descartada por completo según se deduce de los experimentos a distinta fuerza iónica.

Los elementos estructurales responsables de la transferencia colisional desde YLSCP2 hacia membranas podrían tener importantes consecuencias fisiológicas al marcar patrones del transporte de FA dentro de la célula. La importancia de las interacciones electrostáticas entre los residuos catiónicos superficiales de la proteína y las cargas negativas de las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana, así como una contribución menor de las interacciones hidrofóbicas, también han sido demostradas para aquellas FABP que presentan un mecanismo colisional de transferencia de ligandos (Córscico, *J Lipid Res*. 2005; Falomir Lockhart, *J Biol Chem*. 2006). Aunque aún no hay una estructura publicada, de NMR o cristalografía de Rayos-X, para la YLSCP2, la estructura predicha por modelado por homología (**Figura 6.5**) muestra que puede existir una región de carga neta superficial positiva en la región comprendida por los residuos Lys<sup>29,34,35,104,106,108,113,122</sup> and Arg<sup>98</sup> que podría estar involucrada en la interacción con membranas (Burgardt NI et al., manuscrito en preparación). En particular, el propéptido N-terminal de la SCP-2 de mamífero resulta ser de crucial importancia en la interacción con membranas y el transporte de colesterol (Huang, *Biochemistry* 2002). Sin embargo la YLSCP2 no posee dicha secuencia,

por lo que podríamos pensar en que hay otro motivo estructural responsable de este fenómeno en esta proteína. Sin embargo, el patrón de potencial electrostático de YLSCP2 se correlaciona bastante bien con el de la proteína de mamíferos, y los residuos Lys<sup>29,34,35</sup> coinciden con la región de la SCP-2 de mamíferos que participaría en la interacción con membranas.



**Figura 6.5. - Estructura de predicha por Modelado por Homología de YLSCP2.** Empleando la estructura cristalográfica de la SCP2 de conejo (PDB id: 1c44) como molde, se obtuvo un modelo empleando el programa 3D-JIGSAW2.0 (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw>) (Burgardt et al, manuscrito en preparación). El panel **A** muestra la distribución desigual de cargas en la proteína con un claro predominio de cargas positivas sobre las negativas. El panel **B** muestra el potencial electrostático superficial de la YLSCP2. Se empleó el programa SPDBViwer para diseñar los gráficos, en los que se colorearon los residuos con carga positiva y los potenciales positivos en azul, y los residuos de carga negativa y el potencial negativo en rojo. Se empleó la estructura de una SCP-2 de mamífero como molde ya que es la que muestra el mayor porcentaje de identidad con la YLSCP2 (30%) en comparación a las de insecto, bacteria u otros mamíferos (20-25%).

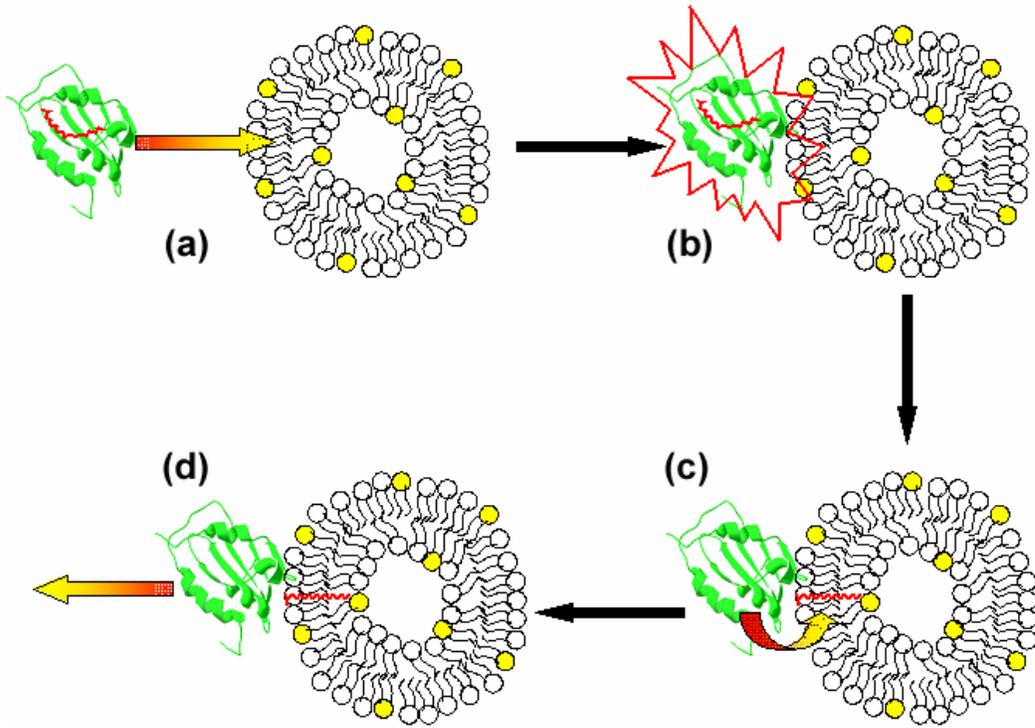
También es interesante mencionar que a pesar de las similitudes en las propiedades de unión y partición de ligandos entre YLSCP2 y LFABP, el comportamiento en la transferencia de FA es marcadamente diferente, probablemente evidenciando que las diferencias estructurales entre estas proteínas dan cuenta del mecanismo de transferencia empleado por cada una, independientemente de la afinidad por el ligando y su partición a membranas. Del mismo modo, la comparación de YLSCP2 con IFABP (y el resto de las FABP “colisionales”) sería de gran ayuda para reconocer las características

estructurales que posibilitan el mecanismo de transferencia colisional y la sensibilidad a la carga superficial de las membranas aceptoras. En este sentido, resulta de gran interés biotecnológico y evolutivo dedicarse al problema de una misma función determinada por dos estructuras proteicas totalmente diferentes, como YLSCP-2 e IFABP. Esta hipótesis será analizada en futuros experimentos.

Podemos concluir que YLSCP2 posee todos los atributos necesarios para funcionar como un importante factor soluble en el transporte de LCFA en la levadura *Yarrowia lipolytica*. Además, su comportamiento frente a membranas de diferente composición lipídica podría indicar cierto grado de especificidad, importante para el direccionamiento de FA y sus derivados en *Yarrowia lipolytica*. El conjunto de evidencia aquí presentados apoya un proceso de tipo colisional en etapas que permite la transferencia de ligandos desde la YLSCP2 hacia membranas modelos (**Figura 6.6**). En la célula, la YLSCP2 podría estar transportando FA hacia compartimentos específicos con una composición específica definida, como por ejemplo el peroxisoma, o funcionar como buffer de concentración en este compartimento y así aumentar la disponibilidad de los FA para otras proteínas. También debemos tener en cuenta que, al igual que lo que ocurre con las FABP, las estructuras dadoras o receptoras de los ligandos hidrofóbicos que interactúan con la YLSCP2 podrían ser enzimas y demás proteínas solubles o, muy probablemente, de membrana.

---

**Figura 6.6. - Mecanismo de transferencia de transferencia de ligandos de YLSCP2.** (Página siguiente) Esquema del mecanismo de transferencia de FA colisional. La etapa limitante de es la interacción del complejo proteína-ligando con la vesícula aceptora y la formación de un aducto con los 3 componentes (a). Este paso se ve afectado por la concentración de vesículas y por las características de la densidad de carga superficial de la misma. Un cambio de conformación de la proteína en el aducto (b), permite la disociación del ligando que se incorpora en la bicapa fosfolipídica (c). El último paso es la fuga de la proteína en su forma apo de la interfase con la membrana (d).







## Capítulo 7:

# Conclusiones finales y perspectivas futuras

### **7.1. - FABP intestinales**

#### **7.1.1. - Conclusiones finales**

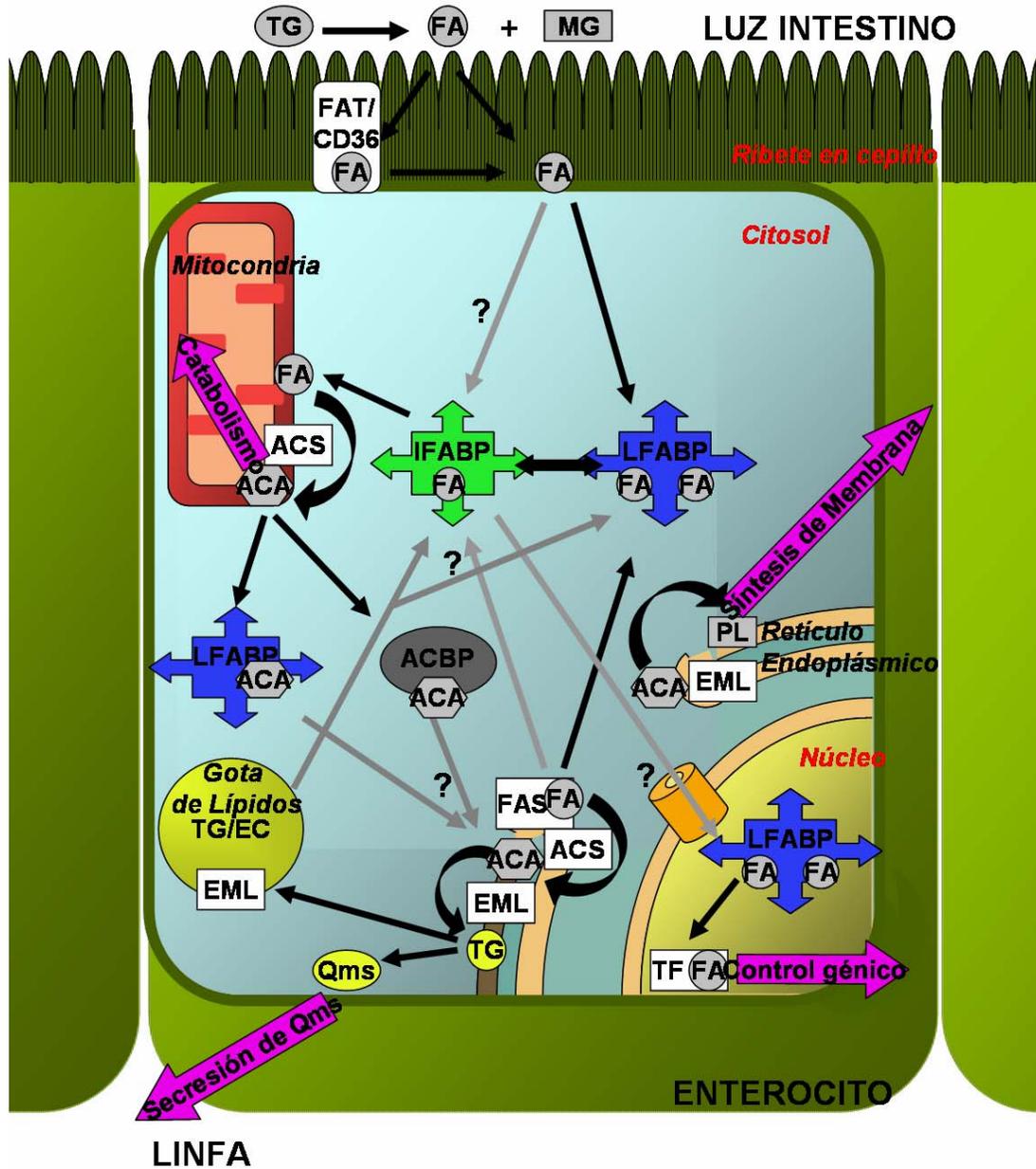
A lo largo de la evolución se ha seleccionado un grupo de familias de proteínas que permiten la movilización de los lípidos a través de medios acuosos como el citosol de las células. La amplia variedad estructural y la diversidad de funciones que cumplen los lípidos, se cree que son las razones por las cuales han evolucionado distintas isoformas con especificidades únicas y características funcionales que van más allá de una mera función de transportador de compuestos hidrofóbicos. Así, se ha comenzado a pensar en las SLBP como parte de un complejo sistema de censado y regulación de la disponibilidad y/o reserva de lípidos, o del estado metabólico tanto celular como sistémico para el caso de organismos superiores.

Los resultados presentados en el presente trabajo de tesis apoyan la idea de que las distintas isoformas de FABP que se coexpresan en el epitelio intestinal cumplirían funciones diferentes, en concordancia con la gran cantidad de información previa. Estas proteínas comparten una estructura tridimensional prácticamente superponible, a pesar de poseer una identidad de secuencia tan baja como un 20% entre sí, y sin embargo logran desempeñar funciones específicas. En este sentido, los ensayos con variantes estructurales (mutantes puntuales, quimeras y variantes truncadas como la HL-IFABP) son un importante aporte para reconocer los determinantes estructurales responsables de sus características funcionales, y comprender cómo es que éstos actúan. El rol de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP y, específicamente, el de los residuos cargados positivamente en esta región, parecen ser determinantes de las características de

transferencia de ligandos hacia vesículas, probablemente afectando la formación del complejo entre la holo-proteína y la membrana. Tanto la composición lipídica de la membrana, como la presencia del ligando modulan la interacción de las FABP intestinales en forma diferencial. Mientras que IFABP muestra gran sensibilidad a la carga de las membranas, la interacción de LFABP parece estar fuertemente inhibida por la presencia del ligando.

Por otra parte, es importante considerar que, en el entorno celular, la interacción con otras proteínas podría también tener un rol central sobre el transporte y el destino de los FA, además de la composición lipídica característica de cada compartimiento subcelular. Así, IFABP resulta ser una proteína muy tentadora para cumplir un rol de direccionamiento de los FA a destinos específicos (transporte vectorial), estructuras membranosas subcelulares especialmente ricas en PL aniónicos, peroxisomas y mitocondria principalmente. Asimismo, el comportamiento “difusional” de la LFABP podría ser el resultado del análisis de estas proteínas *in vitro*, es decir, en un medio simplificado por demás. De este modo, LFABP podría cumplir sus roles específicos por interacción con otras proteínas y no necesariamente sólo por interacción con bicapas fosfolipídicas. La demostración de que IFABP y LFABP pueden intercambiar ligandos en forma específica es el primer indicio de que IFABP podría interactuar con otros componentes celulares de naturaleza proteica cediendo sus ligandos. En este sentido, sería interesante analizar la interacción de las FABP con otras proteínas relacionadas al metabolismo de lípidos o a su regulación.

Hemos podido correlacionar la expresión de LFABP con una mayor eficiencia en la asimilación y la metabolización de los FA en células Caco-2. Sin embargo, una descripción molecular de los mecanismos por los que estos efectos son posibles escapan a nuestro entender actual y nuevos ensayos serán necesarios. Del mismo modo, sería interesante estudiar los mecanismos moleculares de señalización por los cuales la LFABP parece afectar la velocidad de proliferación y la diferenciación de estas células, en comparación con la influencia de la IFABP.



**Figura 7.1 – Modelo de transporte vectorial de ácidos grasos en el enterocito mediado por IFABP y LFABP.** La figura muestra en forma esquemática la participación de las FABP intestinales en la asimilación, metabolismo y transporte de ácidos grasos provenientes principalmente de la dieta. Las flechas negras muestran procesos ya evidenciados experimentalmente, mientras que las flechas grises representan procesos posibles y que serán objeto de estudio en nuevas líneas de trabajo. TG, Triglicéridos; FA, ácidos grasos; MG, monoacilglicéridos; ACA, acil-CoA; PL, fosfolípidos; CE, ésteres de colesterol; Qms, Quilomicrones; ACBP, proteína unidora de Acil-CoA; ACS, Acil-CoA Sintetasa; FAS, ácido graso sintetasa; EML, Enzimas del metabolismo lipídico; FT, factores de transcripción.

Los resultados disponibles hasta el momento nos permiten proponer un modelo para la transferencia vectorial de ligandos en el enterocito en el que IFABP y LFABP tendrían funciones específicas (**Figura 7.1**). LFABP se cargaría con FA al interactuar con membranas gracias a su marcada capacidad de asociación a las mismas en su forma apo; mientras que IFABP descargaría los ligandos durante la interacción con membranas, diferencialmente de acuerdo a la composición de las membranas aceptoras. Además, ambas proteínas serían capaces de intercambiar FA en forma colisional, de acuerdo a sus afinidades relativas. Por otro lado, LFABP también es capaz de unir otros ligando hidrofóbicos, como Acyl-CoA, MG o sales biliares; por lo que estaría participando además del transporte de otros metabolitos, que competirían con los FA. Para sus funciones, la región  $\alpha$ -helicoidal de ambas FABP intestinales sería de gran importancia, sentando así las bases moleculares para un modelo de transporte vectorial de ligandos desde y hacia compartimentos intracelulares membranosos de distinta composición. También es necesario tener en cuenta que la caracterización *in vitro* descrita y la interacción con membranas podrían estar funcionando como un suplente de las estructuras reales presentes en las células. Por tal motivo también es necesario considerar la presencia de otras proteínas, en particular enzimas que participan del metabolismo lipídico (FAS, FAT/CD36, ACS, FATP4 o ACBP, sólo para nombrar algunas) y que serían los verdaderos dadores/receptores de los FA que transportan las FABP.

Los resultados de sobreexpresión de IFABP en distintos tipos celulares, y en particular células Caco-2, resultaron en una inhibición de la asimilación de FA y de la diferenciación celular; mientras que la sobreexpresión de LFABP promueve la asimilación de los mismos. Una posible nueva interpretación podría ser planteada para reinterpretar el efecto de la IFABP. Mientras que la expresión de la LFABP en células Caco-2 favorece al diferenciación y la asimilación de lípidos, la sobre expresión de IFABP podría estar compitiendo con LFABP por los ligandos, disminuyendo así la estimulación que ejerce esta última proteína. Para probar esta hipótesis, nuevos ensayos en células Caco-2 deficientes en LFABP pero que sobreexpresen IFABP ya se han planteado para el desarrollo de las herramientas necesarias.

### 7.1.2. - Perspectivas futuras

A pesar del enorme progreso en el conocimiento de las características biofísicoquímicas de las FABP, aún mucho trabajo es necesario para poder describir correctamente las funciones de este grupo de proteínas. Estudios más profundos y detallados se encuentran actualmente en curso en nuestro laboratorio orientados a identificar los dominios y/o residuos que intervienen en la interacción de las FABP intestinales con membranas fosfolipídicas. Por otro lado, se planea expandir los estudios metabólicos a distintos ligandos y generar nuevos modelos de enterocitos dotados de distinta carga de FABP, incluyendo algunas de las variantes estructurales ya estudiadas a fondo *in vitro*. Por último, una batería de ensayos de interacción proteína-proteína se están poniendo a punto a fin de poder identificar potenciales compañeros de interacción de IFABP y LFABP.

Una de las FABP mejor estudiadas es la FABP4 o AFABP. Esta proteína se expresa abundantemente en adipocitos y en macrófagos por lo que existe gran interés en torno de ella por su posible vinculación a procesos fisiopatológicos presentes en enfermedades como aterosclerosis, obesidad y diabetes. En un principio, se describió su capacidad de transferir ligandos en forma colisional y, al igual que IFABP, muestra una mayor velocidad de transferencia hacia vesículas cargadas negativamente. Los residuos cargados positivamente de la región  $\alpha$ -helicoidal,  $\beta A$  y el giro- $\beta$  CD de esta proteína resultaron ser de gran importancia para estas características (Liou, *Biochemistry* 2001). Más recientemente se describió su capacidad de interacción con la lipasa sensible a hormona (HSL, de sus siglas en inglés *Hormone Sensitive Lipase*) (Smith. *J Biol Chem.* 2004); que, por acción de adrenalina o glucagón, cataliza la hidrólisis de TG de reserva en el tejido adiposo para poner los FA a disposición de los demás tejidos para su oxidación y así obtener energía. Ya que el ratón AFABP<sup>-/-</sup> mostró una marcada disminución de la lipólisis del tejido adiposo (Coe, *J. Lipid Res.* 1999), inicialmente se supuso que el rol de la AFABP consistía en favorecer la acción enzimática de la HSL al remover los FA que esta producía. Pero un estudio más detallado reveló que la interacción entre estas proteínas sólo se observa cuando

la HSL está fosforilada y la AFABP está cargada con un FA; y, por tal motivo, ahora se supone que en realidad la AFABP estaría cumpliendo una función reguladora al inhibir la acción de la HSL cuando hay un exceso de FA libre que no puede ser vertido dentro del torrente sanguíneo (*Smith, J Biol Chem. 2007*). En particular se identificó el cuarteto de residuos de la región  $\alpha$ -helicoidal Asp<sup>17</sup>, Asp<sup>18</sup>, Lys<sup>21</sup> y Arg<sup>30</sup>, que forman dos pares iónicos o puentes salinos (Asp<sup>17</sup>-Arg<sup>30</sup> y Asp<sup>18</sup>-Lys<sup>21</sup>), como responsables de la interacción entre estas proteínas (*Smith, J Biol Chem. 2008*). Este conjunto de residuos está conservado en las isoformas de EFABP y HFABP, que también parecerían ser capaces de interactuar con la HSL; pero no así en las secuencias de IFABP o LFABP, para las cuales dicha interacción no se ha comprobado. Sin embargo, estos resultados muestran un posible mecanismo general de acción de las FABP como reguladores del metabolismo lipídico. Un interesante campo de estudio se abre al querer encontrar los compañeros correctos con los que interactúan las FABP intestinales y poder definir su rol específico en el metabolismo de los lípidos dietarios.

Teniendo estos últimos datos en cuenta, se han diseñado una serie de proteínas de fusión de las FABP intestinales a proteínas fluorescentes (VFP, del inglés *Visible Fluorescent Proteins*) o a motivos altamente afines por fluoróforos biarsenicales; con los que se espera poder estudiar estas proteínas en un ambiente más complejo como células en cultivo que permitan, como fin último, poder describir las funciones específicas de cada una de ellas.

En el mediano/largo plazo, comprender las funciones específicas de las FABP intestinales puede abrir nuevas líneas de tratamiento de enfermedades relacionadas al metabolismo lipídico, como problemas malabsortivos, diabetes, aterosclerosis, obesidad, etc

## **7.2. - SCP-2 de *Yarrowia lipolytica***

### **7.2.1. - Conclusiones finales**

Los microorganismos expresan una cantidad muy limitada de SLBP en comparación con los eucariotas superiores. Además, existe gran variedad entre distintas especies que expresan distinto número o distinto tipo de SLBP. Por tal motivo se supone que estas proteínas o bien no son esenciales para la supervivencia de los microorganismos, o existe una importante redundancia funcional. En cuanto al sistema analizado en este trabajo de tesis, *Yarrowia lipolytica* expresa sólo dos miembros de este conjunto de familias, la ACBP, que une exclusivamente acil-CoA, y la SCP-2, que puede unir además otros ligandos.

En particular, a diferencia de eucariotas superiores, el dominio SCP2 de levaduras parece ser expresado únicamente como un dominio de expresión aislado y sin una secuencia N-terminal previa que regule sus funciones. La YLSCP2 muestra una afinidad muy alta por FA libres y activados, más que por esteroides. Sin embargo, más ensayos son requeridos para analizar la afinidad por otros ligandos hidrofóbicos como PL y MG, pero también sería interesante estudiar la afinidad por la variedad de hidrocarburos que puede utilizar *Y. lipolytica* como sustrato.

Los resultados aquí presentados nos permitieron comprobar que la YLSCP2 puede actuar como un transportador de FA intracelular al transferir sus ligandos a membranas fosfolípicas mediante la formación de un intermediario de colisión con estas. La YLSCP2 funciona, muy posiblemente, dirigiendo los FA hacia el metabolismo lipídico en la fracción peroxisomal. Las interacciones electrostáticas entre las cargas superficiales positivas de la proteína y las negativas de las vesículasceptoras serían cruciales para que la YLSCP2 pueda distinguir la composición lipídica de la membrana fosfolípica y, así, se comienzan a sentar las bases moleculares que permitirán establecer los mecanismos de transporte y direccionamiento de nutrientes en esta levadura de gran importancia biotecnológica.

## 7.2.2. - Perspectivas futuras

Los resultados presentados en esta tesis respecto al análisis funcional de la YLSCP2 se enmarcan en un proyecto de colaboración entre nuestro laboratorio (dirigido por la Dra. Betina Córscico, INIBIOLP-UNLP-CONICET) y los laboratorios dirigidos por el Dr. Marcelo Ceolin (INIFTA-UNLP-CONICET) y el Dr. Mario Ermácora (Laboratorio de plegamiento de proteínas - UNQ). Estos primeros resultados serán ampliados, por un lado, analizando la transferencia de distintos ligandos para analizar la influencia de la estructura del mismo. Por otro lado, se planea estudiar la remoción de FA de vesículas dadoras, así como los factores que modulen dicho proceso. Para comprobar la capacidad de transportar específicamente FA entre estructuras membranosas de distinta composición se planea estudiar también el rol facilitador de la YLSCP2 del transporte de ligandos hidrofóbicos entre vesículas.

Por otro lado, el estudio de esta proteína es muy reciente por lo que hay grandes incógnitas en cuanto a sus características estructurales, biofísicas y bioquímicas además de las funcionales que se comenzaron a tratar en este texto. Así, se encuentran en desarrollo, por ejemplo, estudios para describir la estructura de la YLSCP2 que nos permitirá formular hipótesis más detalladas sobre los residuos importantes para la transferencia diferencial de FA hacia membranas de distinta composición. La construcción de mutantes puntuales u otras variantes estructurales puede ser importante para establecer el rol fisiológico de esta proteína. Además, una comparación exhaustiva con las otras estructuras cristalográficas ya publicadas para SCP-2 permitirá identificar determinantes estructurales compartidos importantes para las funciones que presentan en común las SCP2 de distintas especies.

Los estudios metabólicos con la levadura y variantes con distinta expresión de la YLSCP2 serán críticos para definir el rol específico de esta proteína dentro del metabolismo o la regulación del mismo. Asimismo, la comprensión del metabolismo lipídico y su regulación en *Y. lipolytica* es fundamental para poder realizar un uso más eficiente de sus características bioquímicas tanto en la industria alimenticia, química fina o tratamiento de efluentes, así como posibles aplicaciones.





# Apéndice A:

## Materiales y Métodos

### A.1. - Protocolos de Bioinformática

#### A.1.1. - Modelado por homología

La predicción de estructura de una secuencia aminoacídica se lleva a cabo en varias etapas. Varios algoritmos pueden emplearse para predecir la estructura secundaria de un polipéptido. Otros algoritmos reconocen posibles secuencias transmembrana, sitios de modificación postranscripcional, y motivos de plegado recurrentes. Pero si la secuencia de aminoácidos se corresponde con la de otra proteína similar, para la cual ya se conoce su conformación, se puede recurrir a un modelado por homología (también llamado modelado por comparación, o basado en el conocimiento de otra estructura) y así obtener un modelo estructural tridimensional completo. Este proceso se divide en los siguientes pasos:

- 1) Elección de una secuencia molde adecuada con estructura conocida.
- 2) Alineamiento de las secuencias molde y blanco.
- 3) Construcción del esqueleto peptídico para la secuencia blanco.
- 4) Construcción de los giros conectores y agregado de las cadenas laterales.

Actualmente existen varios programas que realizan el modelo en forma automatizada y que obtienen resultados razonablemente aceptables, pero sólo si el molde y la secuencia blanco tienen una identidad de secuencia mayor al 50% en el alineamiento. Para encontrar un molde adecuado normalmente se emplea una búsqueda tipo BLAST contra secuencias que tengan su estructura ya depositada en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, *Protein Data Bank*, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), en los que se almacenan los archivos que contienen la información de la estructura cristalográfica o de NMR con las coordenadas de la posición relativo de cada átomo de una proteína. Por lo general se emplean todas aquellas secuencias que tengan su estructura publicada y presenten un E-value

por debajo de cierto límite como moldes para la secuencia blanco; en especial si existen dominios conservados dentro de una familia de proteínas que sirven como molde. Varios métodos se usan para construir los giros conectores y reconstruir las cadenas laterales. Por ejemplo, los Diagramas de Ramachandran sirven para calcular ángulos de torsión apropiados para el polipéptido, en el cual se supone que los átomos son esferas macizas con radios de van der Waals que no pueden colisionar (*Ramachandran, Adv Protein Chem. 1968*). También se emplean para el mismo fin los Valores de Campos de Fuerza (Force Field Scores) (*Sippl, J. Mol. Biol. 1990; Sippl, Proteins. 1993*).

A pesar de todo lo expresado anteriormente, la obtención de modelos, para mutantes puntuales en particular, es bastante más sencillo si se conoce la estructura de la proteína nativa; ya que contamos con una estructura que se amolda casi a la perfección a la estructura que estamos buscando. De este modo, simplemente es necesario cambiar la cadena lateral de uno de los residuos de la estructura conocida.

#### **A.1.1.1. - Construcción de modelos virtuales de mutantes virtuales.**

El éxito de estos estudios radica en la calidad del modelo que se emplea como molde para empezar a trabajar en el modelado por homología de los mutantes puntuales. En este caso, se empleó la estructura cristalográfica de IFABP de rata (rIFABP) en formas apo (PDB-ID: 1IFC) (*Scapin, J. Biol. Chem. 1992*) y holo (PDB-ID: 2IFB) (*Sacchettini, J. Biol. Chem. 1992*), resueltas a 2.0 Å y 1.2 Å, respectivamente. Los modelos iniciales se obtienen reemplazando de a uno a la vez los residuos de Lisina (Lys) de interés por los residuos de Isoleucina (Ile) o Ácido Glutámico (Glu) con el programa INSIGHTII (Accelrys, San Diego, CA) operando sobre una computadora Workstation de Silicon Graphics.

El modelo se refina dejándolo relajarse mediante una minimización simple de energía conformacional, que es una aplicación del módulo Discover 3 v98.0 del INSIGHTII. Para ello es necesario tener en cuenta los hidrógenos, ausentes en la estructura derivada de la difracción de Rayos X, donde sólo ven los átomos

pesados, las moléculas estructurales de H<sub>2</sub>O y el palmitato ligado (en el caso de las formas holo) presentes en el PDB original.

El software INSIGHTII también cuenta con la utilidad SOAK (“sumergir” o “empapar”) que agrega una esfera de moléculas de H<sub>2</sub>O de 5 Å de grosor alrededor de la superficie de la proteína que sirven para simular un entorno acuoso, como si la proteína estuviera en suspensión. Esta consideración final es crucial ya que el H<sub>2</sub>O estructural que figura en el PDB original es sólo una pequeña fracción de la que estabiliza a la proteína en el cristal o en suspensión acuosa. De lo contrario, las distancias interatómicas crecen exageradamente y la estructura se pierde con respecto al PDB molde por parecer que la proteína se encuentra en un vacío pero con la constante dieléctrica del buffer. Otro punto importante a tener en cuenta es la carga de los residuos de aminoácidos polares, ya que en algunos casos es indispensable agregar contraiones que las neutralicen para que se pueda desarrollar una simulación exitosa.

Luego se realiza el proceso de minimización de energía, con el pH fijo en 7.4, según el método CG (Polar-Ribiere), a lo largo de tantas iteraciones como sea necesario para alcanzar la convergencia del proceso en un pozo energético con una barrera menor a 0.01 kJ/mol. Este procedimiento se repitió para los mutantes K16I, K16E, K20I, K20E, K27I, K27E, K29I, K29E, K92I y K92E de la rIFABP, además de la proteína nativa, tanto en forma apo como en su forma holo, conteniendo una molécula de palmitato en el sitio de unión. Es importante notar que también se debe someter a la estructura madre, es decir al archivo PDB de la proteína nativa sin modificar, a los mismos pasos para poder compararla con las obtenidas para los mutantes puntuales.

### **A.1.2. - Validación de los modelos**

Los modelos obtenidos en la sección anterior deben ser validados para asegurarse de que no presentan aberraciones. Lo primero que se observa es que el largo de los enlaces sean correctos y los ángulos en los enlaces caigan dentro

de las zonas permitidas en el gráfico de Ramachandran. Pero para un análisis más detallado, también se emplea una serie de programas que analizan la superficie expuesta al solvente y los volúmenes de los modelos finales.

Para ello los archivos que devuelve el programa INSIGHTII son compilados por los siguientes programas:

- Procesador de textos: Primero es necesario eliminar todos los átomos que no corresponden a la proteína, lo que se logra fácilmente con cualquier procesador de textos borrando todas las líneas del archivo en formato pdb después del átomo de O del extremo C-terminal de la proteína.

- H.Streap: este programa sirve para editar los archivos PDB y así remover automáticamente todos los átomos de Hidrógeno que se agregaron para la simulación ya que los otros programas no pueden procesarlos.

- ACCESS: este programa analiza los archivos PDB, sin Hidrógenos, y calcula la superficie accesible al solvente de acuerdo al método de Lee y Richards (*Lee, J Mol Biol. 1971*), es decir, calculando el área que describe el centro de masa de una esfera del tamaño de una molécula de H<sub>2</sub>O que se desplaza por la superficie de la proteína (*Richards, Methods Enzymol. 1985*).

- BINS: este programa compila la información calculada por el ACCESS y la agrupa por residuo, tipo de residuo, polaridad y para la proteína entera. Este paso es fundamental para poder hacer las comparaciones en forma más sencilla y eficiente (*Kajander, Structure. 2000*).

- VOLUME: Este programa toma los resultados del ACCESS y calcula los volúmenes de los residuos de la proteína basándose en el método de Voronoi (*Richards, J Mol Biol. 1974*).

- VOLFMT: este programa es análogo al BINS, pero compila y agrega los resultados que devuelve el VOLUME según residuo, tipo de residuo, polaridad y

para la proteína entera. En este sentido, también ayuda al análisis de los resultados obtenidos (*Richards, J Mol Biol. 1974*).

Los resultados obtenidos de los programas anteriores pueden ser comparados entre sí y con los de las bases de datos. La comparación entre sí de las estructuras se realiza mayoritariamente en forma manual con la ayuda de los programas comunes para editores de texto y planillas de cálculo.

### A.1.3. - Comparación de los modelos

Para poder evaluar los efectos que las mutaciones puntuales y la presencia del ligando tienen sobre la estructura de la proteína, se superponen las estructuras y se miden las distancias entre los átomos correspondientes en la estructura de la proteína nativa superpuesta sobre cada uno de los mutantes. La superposición se logra minimizando la desviación standard cuadrática promedio (rmsd) de todas las distancias entre los mismos átomos de los pares de estructuras. Esto se realiza con el mismo software INSIGHT II con el que se obtuvieron los modelos, que posee una aplicación que orienta pares de estructuras según este criterio.

Para un análisis más detallado, los modelos son luego despojados de los átomos de H (con el software H.Strip) y las coordenadas de cada átomo pesado (C, N, O y S) en ambas proteínas son importadas en una planilla para calcular los desplazamientos propios de cada átomo individual así como los desplazamientos promedio (desplazamiento cuadrático medio) de distintas regiones empleando las siguientes fórmulas:

Desplazamiento del átomo  $i$ :

$$d_i = [(x_{i-2}-x_{i-1})^2 + (y_{i-2}-y_{i-1})^2 + (z_{i-2}-z_{i-1})^2]^{1/2}$$

Desplazamiento cuadrático medio:

$$\text{rmsd} = \Sigma_i^N [ \{ (x_{i2}-x_{i1})^2 + (y_{i2}-y_{i1})^2 + (z_{i2}-z_{i1})^2 \} / N ]^{1/2}$$

En el caso de analizar los efectos sobre una región de la proteína, cabe destacar que los puntos de contacto entre los mismo se dejan de lado para desconectar ambas porciones, así como los aminoácidos N- y C-terminales, que presentan mucha mayor dispersión por tener menos restricciones conformacionales. De esta forma, para analizar el efecto de las mutaciones puntuales sobre el dominio portal (residuos 24-33, 53-54 y 73-74) y el no portal (2-22, 35-51, 56-71 y 76-130), se dejaron fuera del análisis los residuos 1, 21, 34, 52, 55, 72, 75 y 131.

Para determinar qué efectos resultan significativos en la conformación de las proteínas mutantes, se emplea como referencia los cambios observados en el dominio portal entre las conformaciones apo y holo para la proteína nativa, y cuyas diferencias han sido ampliamente analizadas en los estudios de cristalografía de rayos X y NMR de la IFABP (*Scapin, J. Biol. Chem. 1992; Sacchettini, J. Biol. Chem. 1992*).

Por otro lado se analizan las modificaciones en el área expuesta al solvente y en el volumen de las proteínas debido a las mutaciones puntuales en forma individual para cada aminoácido y agrupadas por tipo y familia de aminoácidos. Para esto se importan los resultados que devuelven los programas Access y Volume en una planilla de datos y se agrupan según se desee para graficarlos.

## **A. 2. - Protocolos de Biología Molecular**

### **A.2.1. - Minipreparación de Plásmidos.**

Para poder analizar, amplificar y modificar las secuencias de ADN con las que uno desea trabajar, es necesario tener una fuente madre fácilmente manipulables. Las secuencias de cDNA de las proteínas empleadas en el presente trabajo de tesis fueron cedidas por otros laboratorios en forma de vectores con los distintos insertos, o modificadas por el nuestro para obtener las variantes estructurales de interés. A escala de laboratorio lo más práctico resulta una minipreparación de plásmidos.

La obtención de DNA plásmídico a partir de bacterias de *E. coli* se realizó siguiendo el protocolo que figura en el manual de laboratorio de Sambrook & Russell, (*Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2001*). Brevemente, se cosecharon 1 a 3 ml de cultivo bacteriano fresco (crecido toda la noche a 37°C) en un tubo eppendorf de 1,5 ml centrifugándolo a 12000 rpm durante 1-2 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet de bacterias se resuspendió con 100 µl de una solución Tris-ClH 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8, agitando en vortex. La lisis alcalina se realizó adicionando 200 µl de una solución de NaOH 0,2 M y SDS 1% recientemente preparada, agitando suavemente por inversión, hasta la disolución del pellet, e incubando a temperatura ambiente por no más de 5 minutos. La lisis se finaliza por neutralización adicionando 150 µl de una solución de acetato de potasio 5 M y ácido acético 11,5% v/v, enfriada en hielo. Nuevamente se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Es importante no agitar vigorosamente ni vortexear en éstos últimos pasos para evitar que se fragmente el DNA cromosómico que podría contaminar nuestra muestra e interferir con algunos de sus usos. La muestra se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, sin arrastrar nada del precipitado blanquecino.

La muestra de ADN se purifica en varios pasos. El primero consiste en adicionar 450 µl de fenol-cloroformo (1:1), estabilizado con solución de Tris.HCl 100mM pH 8, e incubar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar proteínas y restos de lípidos. Luego se centrifuga la muestra a 12000 rpm

por 5 minutos y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo limpio. La muestra se concentra por el agregado de 1 ml de etanol 96% e incubando a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante por lo menos 30 minutos. Se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos, se remueve el sobrenadante por inversión y se lava el pellet con 500  $\mu\text{l}$  etanol 70% y volviendo a centrifugarla a 14000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, se invierte cuidadosamente el tubo sobre un papel absorbente y se deja secar a temperatura ambiente. El último paso de purificación se lleva cabo resuspendiendo el pellet en 200  $\mu\text{l}$  de Tris.HCl 100 mM pH 8 e incubándolo 30 minutos en hielo con 200  $\mu\text{l}$  de una solución de PEG 13% en NaCl 1.6 M. Se centrifuga la muestra a 14000 rpm durante 15 minutos, se remueve el sobrenadante por inversión y se lava el pellet con etanol 70% como en el caso anterior.

El pellet se disuelve en 20-50  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril, se agrega RNAsa en una concentración aproximada de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al ADN plasmídico purificado se le midió su concentración en una dilución apropiada por absorbancia a 280 y 260 nm, para evaluar también su grado de pureza. La presencia de plásmidos con los distintos insertos se evidencia luego mediante una digestión con las enzimas de restricción correspondientes seguida de una electroforesis en gel de agarosa.

### **A.2.2. - Digestión con enzimas de restricción.**

Para preparar y analizar los plásmidos y construcciones empleadas a lo largo de este trabajo de tesis se recurrió al corte con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son herramientas útiles e indispensables debido a su alta especificidad y a que generan terminales ligables de fragmentos de ADN. Esto permite el corte de DNA plasmídicos en lugares específicos para su posterior manipuleo o análisis. Las digestiones fueron realizadas según el mismo protocolo básico y empleando un buffer adecuado en el cual la combinación de enzimas empleadas en la mezcla tenga una actividad igual o mayor al 50%. Básicamente, para un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , 1 a 5  $\mu\text{l}$  de DNA (0.5-1.0  $\mu\text{g}$ ) se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  Buffer 10X provisto junto con las enzimas a utilizar; 0,1  $\mu\text{l}$  BSA; y 0,5  $\mu\text{l}$  de

cada enzima de restricción y H<sub>2</sub>O bidestilada estéril necesaria para completar el volumen. Las muestras se incubaron por lo menos 2 hs a 37°C, o la temperatura óptima para la mezcla de enzimas empleadas.

### **A.2.3. - Electroforesis en geles de agarosa.**

La electroforesis de ADN en geles de agarosa es una técnica útil para separar fragmentos de ADN de distinto tamaño. La aplicación de un campo eléctrico induce el desplazamiento de las moléculas de ADN, cargadas negativamente, a través de la trama del gel de agarosa. Los fragmentos de ADN se separan en base a su peso molecular, es decir, tamaño o número de bases; a medida que se desplazan del cátodo al ánodo. Durante este trabajo de tesis, esta técnica fue utilizada en el análisis y purificación de fragmentos de DNA. El protocolo consiste en preparar una solución de agarosa con un porcentaje adecuado como para resolver el/los fragmentos de interés. En el caso de los plásmidos linealizados se emplean geles del 0.7-0.8%. Mientras que para los productos de PCR de menor tamaño se emplearon geles de hasta 1.75%. La solución se preparó en buffer Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8 y se le agrega 1 µl de Bromuro de Etidio 10 mg/ml para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador UV.

### **A.2.4. - Construcción de mutantes puntuales de IFABP de rata**

En este trabajo de tesis se emplearon distintas variantes estructurales de la IFABP de rata (rIFABP). La variante carente de la región  $\alpha$ -helicoidal fue diseñada y gentilmente cedida por el laboratorio del Dr Cistola en Washington University (St. Louis, MI USA); y las variantes quiméricas entre IFABP y LFABP fueron construídas durante la estadía postdoctoral de la Dra Córscico en el laboratorio de la Dra Storch en Rutgers, The State University of New Jersey (USA). Por otro lado, el diseño y construcción de los mutantes puntuales de

residuos específicos de Lisina en el dominio  $\alpha$ -helicoidal de IFABP es parte del presente trabajo de tesis doctoral.

Los mutantes puntuales se obtuvieron por mutación sitio dirigida de los residuos de Lisina (Lys) por residuos de Isoleucina o por Ácido Glutámico, con el fin de neutralizar y revertir la carga superficial en esa posición respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron sobre el cDNA de la proteína nativa contenido en el plásmido recombinante pET11d-rIFABP, gentilmente cedido por los doctores Alan Kleinfeld y Ron Ogata (Medical Biology Institute, La Jolla, CA, USA).

#### **A.2.4.1. - Reacción en cadena de la Polimerasa**

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy poderosa y versátil que permite simular, con cambios de temperatura, los distintos cambios en la estructura del ADN que ocurren en su replicación semiconservativa en la naturaleza, y en presencia de una ADN polimerasa y los sustratos necesarios. Es crítico para las utilidades de este trabajo de tesis el uso de una enzima termo-resistente que posea capacidad correctora, por lo cual se empleó la enzima Pfx, provista por Invitrogen. El protocolo consiste en mezclar en un tubo eppendorf de 200  $\mu$ l para PCR 5  $\mu$ l de Buffer 10X con  $MgSO_4$  1.0 mM, dNTP 200  $\mu$ M de cada uno, los primers 1  $\mu$ M, el ADN molde en una concentración aproximada de 0.5-1.0 nM y la Pfx 1.0-1.5 Unidades. El volumen final de 50  $\mu$ l se completa con  $H_2O$  bidestilada estéril. La mezcla de reacción luego se somete a una serie de ciclos de temperatura.

Un protocolo general incluye 30-35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 seg a 55°C y 1 min a 68°C. En la primera fase del ciclo a 94°C se desnaturaliza el ADN desapareando las hebras complementarias. La segunda fase a 55°C sirve para que se unan en forma complementaria los primers al ADN molde. Y la última fase a 68°C corresponde a la temperatura óptima a la cual actúa la enzima Pfx. El protocolo también incluye un único paso de 5 min a 94°C antes del primer ciclo para favorecer la desnaturalización total del ADN molde; así como un último paso

al final del protocolo de 5 min a 68°C para permitir que los últimos fragmentos de ADN sintetizados sean concluidos por completo.

Es importante resaltar que la temperatura de la segunda fase debe optimizarse para cada par de primers a usar y normalmente se establece entre 5 y 10°C por debajo de la  $T_m$  (Temperatura de *melting* o de desnaturalización de la doble hebra de ADN) de los mismos. Otros parámetros que pueden optimizarse para obtener la máxima eficiencia de la reacción son la concentración de  $MgSO_4$ , la concentración y proporción de los primers o la concentración del ADN molde.

#### A.2.4.2. - PCR de Solapamiento

Para construir los mutantes puntuales es necesario diseñar pares de primers complementarios de 20 a 25 bases de largo cuyas secuencias contienen las mutaciones a introducir; más un par de primers externos que flanquean la secuencia del cDNA de rIFABP y que para este caso son complementarios al vector en el que se encuentra, pET11d. Las posiciones mutadas corresponden a las 4 lisinas presentes en la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP (Lys<sup>16</sup>, Lys<sup>20</sup>, Lys<sup>27</sup> y Lys<sup>29</sup>). Además se incluyeron los mutantes de neutralización y reversión de la carga de la Lys<sup>92</sup>, que sirven como controles de los mismos cambios introducidos en el barril- $\beta$  de la proteína.

La secuencia de los primers *sense* (Primer 3, sentido o 5') empleados está detallada en la **Tabla 3.1**, y se ven resaltados los codones correspondientes a la mutación introducida. La secuencia de los primers *anti-sense* (Primer 2, anti-sentido o 3') son complementarios a los descritos en la tabla.

La construcción de los mutantes se lleva a cabo empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Solapamiento (u Overlapping PCR). Esta técnica fue descrita originariamente por Higuchi et al. en 1988 (*Higuchi, Nucleic Acids Res. 1988*); y consiste en obtener por separado dos productos de PCR con un primer externo y un primer interno (con la mutación) según el protocolo general de la PCR. Luego los productos son purificados de un gel de agarosa y se emplean en una tercer PCR que sirve para recuperar el cDNA

completo, pero con la mutación en la posición deseada, tal y como se evidencia en el esquema de la **Figura 3.1**. El protocolo de ésta última reacción de PCR es ligeramente diferente ya que primero se realizan unos 5-10 ciclos en ausencia de primers para permitir que se encuentren las secuencias complementarias, originales de los primers internos que contenían la mutación, para generar un molde del tamaño completo del cDNA mutado. El mismo, luego, es amplificado por el agregado de los primers externos en los próximos 25 ciclos.

### **A.2.5. - Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

Luego de separar los fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción por electroforesis es necesario extraerlos del gel de agarosa. Esto se realiza con filtros DNA Pure de Millipore. Brevemente, se corta con bisturí la banda de ADN de interés del gel bajo luz ultravioleta y se tritura sobre un vidrio liso. Los trocitos de gel se depositan en filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , los cuales encastran en tubos Eppendorf de 1,5 ml, y se centrifuga la muestra a 13000 rpm en una microcentrífuga refrigerada durante 10 minutos. Se repite el procedimiento rehidratando el gel previamente con 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril. Con el volumen eluido se realiza una precipitación con etanol para recuperar el fragmento de DNA lineal de interés concentrado.

### **A.2.6. - Precipitación de ADN con etanol.**

Para concentrar o purificar una muestra de ADN se recurre a una precipitación con etanol. El protocolo, según Sambrook & Russell. (2001), consiste en agregar dos volúmenes de etanol 96% y un 10% del volumen de la muestra de una solución de acetato de sodio 3M. La mezcla se incuba por al menos unos 30 min a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y luego se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se descarta por inversión y se lava el pellet con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70%. Luego de una centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos, se remueve el etanol, se deja secar a temperatura ambiente 10 min y se resuspende el pellet en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril o bufferTris.HCl y se guarda a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **A.2.7. - Ligazón de fragmentos de ADN.**

Para poder unir covalentemente los fragmentos de ADN lineales provenientes de las digestiones con enzimas de restricción de los productos de PCR y las miniprep del vector de expresión, se emplea la enzima recombinante Ligasa del fago T4 que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster, pudiendo unir así covalentemente fragmentos de DNA con extremos complementarios. Para las reacciones de ligazón, se utilizó generalmente 100 ng de ADN, con una relación inserto/vector 3:1 (mol:mol), en un volumen final de 10 µl junto con 1 µl buffer 10X de ligazón (provisto junto con la enzima y que aporta el ATP necesario), 1 µl de enzima T4 DNA ligasa y H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta completar el volumen final. Para maximizar la eficiencia, las reacciones fueron incubadas durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

### **A.2.8. - Construcción del vector anti-mRNA hLFABP**

El plásmido empleado para obtener la línea de células Caco-2 con la expresión disminuída de LFABP, se construyó a base del vector pcDNA3.1-Neo(+), un plásmido optimizado para la expresión de mRNA en células eucariótica. Tiene una longitud de 5,4 kb y 6,0 kb una vez ligado el inserto con la secuencia del cDNA de hLFABP. El vector contiene el origen de replicación ColE1, que le permite ser replicado en bacterias E.coli, junto con el gen de selección *amp<sup>r</sup>* que confiere resistencia a Ampicilina, por lo que las bacterias satisfactoriamente transformadas pueden ser seleccionadas en un medio selectivo conteniendo este antibiótico. La presencia del inserto se confirma por secuenciamiento empleando primers específicos que reconocen las secuencias de los promotores T7 y SP6, a ambos extremos del sitio de clonación múltiple, y que también sirven para su transcripción *in vitro*. La transcripción en células eucariotas es posible gracias a la presencia del promotor de citomegalovirus humano (CMV) “río arriba” del sitio de clonación múltiple. Antes del sitio de terminación de la transcripción también se incluye en el RNA resultante una secuencia poli-Adenilación derivada del gen de la hormona de crecimiento

bovina, justo después del sitio de clonación múltiple. El marcador de selección eucariota es el gen *neo<sup>r</sup>* bajo control del promotor de SV40, que codifica para la Aminoglicósido 3'-Fosfotransferasa, y confiere resistencia contra la Geneticina (G418) a las células que lo expresan. Por último, el vector también contiene la secuencia de origen de replicación SV40, que permite su replicación episomal en eucariotas, fundamental para establecer una línea celular modificada.

Para la construcción del vector de transfección se construye insertando el cDNA de la LFABP humana (hLFABP) en posición antisentido en vector pcDNA3.1-Neo(+). El fragmento del cDNA de la hLFABP (aproximadamente unas 600bp) es subclonado desde el vector pET11 (cedido por los Doctores Alan Kleinfeld y Ron Ogata (Medical Biology Institute, La Jolla, CA, USA) empleando los sitios de corte de BamHI y XbaI. Brevemente, una minipreparación de plásmidos, a partir de bacterias conteniendo el plásmido pET11a-hLFABP, se digiere con las enzimas de restricción BamHI y XbaI para obtener un fragmento de 600bp conteniendo el cDNA de hLFABP. En paralelo se digiere el vector pcDNA3.1-Neo(+) con las mismas enzimas. Luego de purificar los fragmentos de interés de geles de agarosa, se ligan entre sí, quedando el cDNA de hLFABP en orientación anti-sense respecto a los promotores CMV y T7. Este nuevo vector denominado pcDNA3.1-ASL se transforma en bacterias JM109 para su propagación y chequear por secuenciamiento la presencia del inserto en la orientación correcta.

### **A.2.9. - Obtención de células competentes.**

Para amplificar los ADN plasmídicos y para expresar las proteínas recombinantes es necesario incorporar los vectores dentro de la cepa apropiada de *Escherichia coli*. Este protocolo permite generar y almacenar bacterias competentes para su transformación posterior con ADN plasmídico, tanto de las cepas de *E.coli* JM109 como BL21 (DE3). Brevemente, se inoculan 3 ml de medio de cultivo líquido LB (triptona 1%, levadura 0,5%, NaCl 1%) sin antibiótico con un stock de bacterias no competentes recién descongeladas o con una colonia aislada crecida en un Agar LB. Se incuba el cultivo toda la noche a 37°C, con

agitación fuerte y se diluye a la mañana siguiente en 100 ml de medio LB fresco sin antibiótico. La incubación debe mantenerse hasta alcanzar una Densidad Óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0,5. Una vez que el cultivo llega a la concentración deseada, se lo deja enfriar depositándolo sobre hielo durante aproximadamente 15 minutos. Se centrifugan las células a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C en tubos tipo Falcon de 50ml estériles y se descarta el sobrenadante. El pellet de bacterias se resuspende en 30 ml de buffer TFB1 (RbCl 100 mM,  $MnCl_2$  50 mM, acetato de potasio 30 mM,  $CaCl_2$  10 mM, Glicerol 15%, pH 5,8; esterilizado por filtración), se incuba sobre hielo durante 90 minutos y se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante. Y se resuspende el pellet en 4 ml de buffer TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM,  $CaCl_2$  75 mM, Glicerol 15%, pH= 8,0; esterilizado en autoclave). Las bacterias pueden ser empleadas en el momento o ser almacenadas a -70°C en un ultrafreezer en alícuotas de 500  $\mu$ l.

Es importante destacar que es imprescindible maximizar los cuidados para evitar cualquier foco de contaminación ya que los cultivos no pueden contener ningún agente de selección que la prevenga.

### **A.2.10. - Transformación de Bacterias competentes.**

La incorporación de ADN plasmídico en el citoplasma bacteriano se logra gracias a que las células bacterianas han sido pretratadas, cómo se indicó en la sección anterior. En este trabajo de tesis se han empleado distintas cepas de *E. coli* de acuerdo a su aplicación posterior. La cepa JM109 es ideal para todo el trabajo de Biología Molecular ya que puede hospedar cómodamente y en alta concentración vectores multicopia, como los de la serie del Sistema pET, a la vez que carece de la T7 RNAPol necesaria para la expresión de las proteínas recombinantes. En cambio, la cepa BL21 (DE3) brinda doble control para la expresión de proteínas recombinantes cuando están bajo regulación del Promotor LacZ.

El protocolo es equivalente para cualquier cepa que se desea transformar. Brevemente, se toman 50 ng de plásmido en no más de 10  $\mu$ l de la mezcla

reacción de ligazón y se depositan en un Eppendorf de 1,5 ml en un baño de hielo. Luego se le agregan 100  $\mu$ l del stock de bacterias competentes, mezclando por pipeteo gentilmente, ya que las bacterias competentes son muy frágiles; y se incuban en hielo durante 30 minutos. Luego se aplica un shock térmico colocando el tubo en un baño termostatzado a 42°C durante 45 segundos, seguidos de dos minutos de incubación sobre hielo. Es necesario dar un tiempo para que comiencen a expresarse los marcadores de selección. Para ello se agregan 900  $\mu$ l de medio LB sin antibiótico y se incuban con agitación fuerte durante 90 min a 37°C. La selección se realiza creciendo colonias aisladas en un medio sólido que contenga al agente de selección. Por lo tanto se toman al menos dos alícuotas de distinto tamaño del cultivo y se distribuyen con ayuda de una espátula de Drigalsky (esterilizada por incineración a la llama con alcohol 70%) sobre placas de medio LB con Agar 1.5% conteniendo el antibiótico correspondiente, que depende del vector que se usó para la transformación. Las placas se incuban toda la noche invertidas en estufa a 37°C. Al día siguiente se seleccionan varias colonias repicándolas en 3 ml de medio fresco LB, se prepara un stock de Glicerol para guardar (500  $\mu$ l cultivo + 500  $\mu$ l medio fresco con Glicerol 20%) y se constata la presencia del plásmido mediante una mini-preparación y corte con enzimas de restricción. Los stock de Glicerol de las bacterias transformadas se almacenan a -70°C en un ultrafreezer.

Los antibióticos empleados más comunes son Ampicilina en una concentración 100  $\mu$ g/ $\mu$ l, Cloranfenicol 170  $\mu$ g/ $\mu$ l y Kanamicina 50  $\mu$ g/ $\mu$ l, y deben agregarse en el momento del plaqueo del medio o, en su defecto, media hora antes del plaqueo de las bacterias.

### **A.3. - Protocolos de Bioquímica**

#### **A.3.1. - Screening de expresión de proteínas recombinantes**

Las proteínas recombinantes deben ser purificadas y analizadas antes de poder emplearlas en los ensayos biofísicos orientados a elucidar su función específica. El primer paso en la obtención de las proteínas recombinantes es contar con una cepa de bacteria que la produzca en gran cantidad y para eso se seleccionan de un agar LB varias colonias de E.coli transformadas con los plásmidos de expresión con el cDNA de las proteínas recombinantes. Las colonias se repican en 3ml de medio líquido con Ampicilina (100 µg/ml) y se deja creciendo toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, se preparan glicerol-stocks, como se indicó anterior mente, y se diluyen 500 µl a 5 ml de medio fresco con antibiótico. El cultivo se deja crecer por dos horas en las mismas condiciones que antes, se le agrega el inductor Isopropil-tiogalactósido (IPTG), en una concentración final de 400 µM, y se deja actuar durante 2 horas. Luego las células se cosechan por centrifugación 5 min a 7000 rpm y se resuspenden en buffer TEK (tris 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM pH 7,4). Una alícuota de 200 µl se mezcla con 200 µl de buffer muestra 2X para SDS-PAGE y se incuba 5 min en un baño de agua hirviendo. Una alícuota de 20 µl de las muestras se siembra en un gel de SDS-PAGE y se analiza la presencia de una banda prominente dentro del patrón de bandas de la bacteria a la altura de la proteína recombinante.

#### **A.3.2. - Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida con SDS**

La electroforesis de proteínas es una técnica que se emplea para analizar una mezcla de proteínas compleja o para caracterizar una proteína. Debido a que las proteínas poseen coeficientes electroforéticos muy variados y que dependen de la conformación así como del pH del buffer en el que se encuentra es fundamental fijar algunas variables para poder realizar comparaciones. En particular se fija el pH del gel y de los buffer de corrida; y se recurre a un agente

desnaturalizante que permite desplegar los péptidos de forma que la conformación de cada proteína no influya en el proceso. En la mayoría de los casos la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método glicina-SDS-PAGE de Laemmli (*Laemmli, Nature 1970*), en la cual el agregado de SDS permite tanto desnaturalizar las muestras como dotarlas de una relación carga/masa prácticamente uniforme y, así de este modo, se logra una separación en base al tamaño molecular de los péptidos exclusivamente. Las muestras son incubadas, en el “buffer muestra”, durante 5 min en un baño de agua a 100°C antes de la siembra. El agregado de beta-mercaptoetanol en el buffer muestra permite romper los enlaces disulfuro. Junto con las muestras se siembra también un Standard de Peso Molecular como referencia. Generalmente, en este trabajo de tesis, se emplea el Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech Inc/GE Healthcare, USA), que tiene bandas de proteínas de los siguientes tamaños: 97, 66, 45, 30, 20.1 y 14.4kDa.

Se emplearon geles en una concentración de 15% acrilamida 0,4% bisacrilamida, que permite resolver péptidos de hasta 10-12k Da. Los mismos se forman en dos pasos. Primero se forma el gel de 15% acrilamida donde se resuelven las proteínas y que tiene un espesor de 0,7 ó 1 mm, unos 6 cm de alto y 8 cm de largo. Luego de su gelificación, se forma sobre el anterior el gel de “apilamiento” o *stacking*, un gel con menor contenido de acrilamida (3,9% acrilamida 0.1% bisacrilamida), en el cual, por los cambios de pH se producen una pérdida de electrolitos que logra concentrar la muestra a una banda concentrada de unos pocos mm de espesor. Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (BioRad) y se corrieron generalmente en dos tiempos: 30-45 min a 40 Volt, para que se concentre la muestra en el gel *stacking*, y 90-120 min a 140 Volt, hasta que el frente de corrida llega a pocos milímetros del borde inferior del gel.

La tinción de los geles se realizó en una solución 0,1 % Coomassie Blue R-250 en H<sub>2</sub>O:metanol:acético (5:5:2). La decoloración se efectuó con una solución acuosa con 10% ácido acético 30% metanol. Los geles fueron digitalizados en un scanner adosado a una PC y analizados por densitometría con software 1D

Kodak-Image (KODAK) o ImageJ (NIH). Los pesos moleculares de las bandas se estima por comparación con las bandas de Standard incluido en la corrida electroforética.

### **A.3.3. - Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

La purificación de una proteína puede realizarse por varios métodos. Por lo general se recurre a una serie de pasos que van enriqueciendo la muestra en nuestra proteína de interés progresivamente. A lo largo de la purificación es necesario poseer algún método para reconocer la presencia de nuestra proteína y así poder determinar qué pasos son más eficientes y cuáles sólo representan una pérdida de muestra y, por lo tanto, deben ser evitados en el protocolo. Como ya se mencionó anteriormente, las SLBP tienen la característica de que no poseen una actividad enzimática que pueda medirse, por lo que el seguimiento debe realizarse por la única capacidad que tienen bien determinada, la unión de compuestos hidrofóbicos, o por el reconocimiento por anticuerpos específicos. Ésta última opción, puede no ser la mejor opción cuando uno desea trabajar con proteínas mutantes o quiméricas ya que los cambios introducidos pueden ser demasiado grandes y así disminuir la afinidad de anticuerpo por la misma, en especial si se emplean anticuerpos monoclonales, ahora disponibles en el mercado para muchas de las SLBP.

#### **A.3.3.1. - Expresión y Purificación de las FABP nativas y mutantes puntuales**

La purificación de las proteínas nativas, quimeras y mutantes puntuales se realizó con un protocolo adaptado del método descrito por Hsu et al. (*Hsu, J. Biol. Chem.* 1996) (ver esquema de la **Figura 3.3**). El protocolo consiste en crecer 20 ml medio líquido LB con Ampicilina (100 µg/ml) con *E.coli* BL21 (DE3) transformadas con pET11-“FABP” durante toda la noche a 37°C con agitación. A la mañana siguiente, el cultivo es repartido en 8 frascos erlenmeyer (1000 ml de

capacidad cada uno), diluido 100 veces con medio fresco e incubado hasta que alcance una  $DO_{600nm}$  entre 0,6 y 1,0. En ese instante, la expresión de la proteína es inducida por el agregado de IPTG desde una solución madre 1000X (concentración final: 400  $\mu$ M). Las bacterias se incubaron unas 3 horas más con agitación a 37°C y se cosecharon por centrifugación 5 min a 7000 rpm en una centrifuga refrigerada (SORVAL). En este punto las bacterias pueden ser almacenadas a -70°C para ser procesadas más adelante.

El pellet de bacterias se resuspende en buffer TEK hipotónico (Tris 10 mM, EDTA 1 mM y KCl 40 mM) y se lisan en un sonicador de punta Brandson en un baño de agua-hielo. Los restos de pared celular y complejos supramacromoleculares se descartan centrifugando la muestra a 20.000 rpm durante 45 minutos en una ultracentrífuga (Beckmann). El sobrenadante se colecta con cuidado y se somete a una primera etapa de purificación incubándolo por el agregado de medio volumen de una solución sobresaturada de  $(NH_4)_2SO_4$ , que se agrega gota a gota lentamente y se incuba a 4°C durante 1-2 hs. La muestra se centrifuga a 10.000 rpm durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada. Esta técnica permita la precipitación fraccionada de proteínas según su grado de solvatación, y las FABP se recuperan en la fracción soluble.

El sobrenadante obtenido del paso anterior es apto para ser sembrado en una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex G-50 (Farmacia/GE Healthcare, USA), pero para contribuir al seguimiento de la proteína en la marcha de purificación se agregan unas 300.000 cpm de  $[1-^{14}C]$  Palmitato y se incuba 15 min a 4°C para permitir que el ácido graso se reparta entre las distintas proteínas que lo unen, en particular a la FABP que estamos purificando. La cromatografía de exclusión molecular se lleva a cabo en columnas preparativas (1,20 m de largo y 5 cm de diámetro aproximadamente) y se usa buffer  $KCl.PO_4$  (10 mM fosfatos, 150 mM KCl, pH 7.4) como eluyente. Se colectan fracciones de 10 ml aproximadamente a un flujo de 1,5-2,5 ml/min en tubos de 15 ml en un colector de fracciones (Amersham/Farmacia, ahora GE Healthcare). Luego se obtienen los perfiles de Absorbancia a 280 nm ( $A^{280}$ ) y cpm/100  $\mu$ l de la corrida cromatográfica, donde se debe observar cómo la FABP eluye como un pico

importante luego de la mezcla de proteínas que salen en el volumen muerto de la columna. La pureza relativa de las fracciones en FABP se analiza en un gel de SDS-PAGE, se seleccionan aquellas que no contienen contaminantes y se obtiene un pool de FABP pura. Normalmente este protocolo tiene un rendimiento lo suficientemente alto como para no requerir más etapas, pero de ser necesario las fracciones impuras pueden concentrarse y volver a separarse en una nueva corrida por la columna de exclusión molecular.

La proteína purificada es concentrada en un dispositivo concentrador de presión positiva (Millipore) para alcanzar una concentración superior a 1 mg/ml, lo que parece prolongar su vida útil almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el último paso de purificación es la deslipidización de la FABP pura utilizando una columna rellena con Lipidex-1000 (hidroxialcoxi-propil-dextran Tipo IV, Sigma) (Glatz, *J Biochem Biophys Methods*. 1983) que retiene todos los sustratos hidrofóbicos. La corrida también se realiza a 1 ml/min con el mismo buffer fosfato KCl para todas las proteínas derivadas de la IFABP, pero para la LFABP se setea la bomba a 0,5 ml/min, y normalmente se requiere repetir la operación si la deslipidización no es mayor al 95% (según las cpm remanentes).

La pureza de las proteínas purificadas se constata mediante una corrida electroforética en un gel de SDS-PAGE al 15%. La concentración fue asignada en base a su  $\text{DO}_{280\text{nm}}$  utilizando su coeficiente de extinción molar,  $\epsilon_{\text{IFABP}} = 16900$  y  $\epsilon_{\text{LFABP}} = 6000$  (Richieri, *J. Biol. Chem.* 1994), se alícuota de a 0,5-1,0 ml y se almacena a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **A.3.3.2. - Expresión y purificación de las variantes estructurales de las FABP intestinales**

La purificación de las variantes estructurales de IFABP y la LFABP siguió un protocolo similar a los empleados para la proteína nativa y sus mutantes puntuales, pero con algunas modificaciones. La variante de IFABP carente de la región  $\alpha$ -helicoidal, HL-IFABP, fue sobreexpresada en *E. coli* BL21 transformadas con el vector pMON-HL-IFABP, por lo que la inducción se realizó con ácido nalidíxico (0,1 mM concentración final) (Córsico, *Porc. Natl. Acad. Sci.* 1998). La

HL-IFABP es inestable si se congelara, por lo que se guarda a 4°C y tiene una vida útil de no más de 30 días. Por otro lado, la proteína quimérica  $\alpha\beta$ IFABP se expresará en BL21(DE3) clonada en un vector pET11 y se purificará a partir de cuerpos de inclusión desnaturalizándola primero con urea (*Córsico, Biochemistry. 2004*).

### **A.3.3.3. - Expresión y purificación de YLSCP2**

La expresión y purificación de la YLCP2 fue realizada en el laboratorio del Dr Mario Ermácora según descrito por Ferreira et al. (2006). La proteína recombinante se sobreexpresa en bacterias E.coli BL21 (DE3), que contienen el plásmido pYLSCP2, por inducción con 1mM IPTG durante 3 hs; de forma similar a cómo se detalló para las FABP. Las células se cosechan por centrifugación y se resuspenden en 10 ml de buffer de lisis. Luego se lisan las bacterias con una prensa francesa French Pressure Cell Press (Thermo IEC, USA) y la YLSCP2 se recupera de los cuerpos de inclusión resuspendiéndola en buffer A (25 mM Acetato de Sodio, 8 M Urea y 10 mM Glicina, pH 5.5) durante 1 hr en un incubador orbital. La solución resultante se clarifica, por ultracentrifugación a 15.000 g por 15 min a 4°C, y cargada en una columna de intercambio catiónico SP Sepharose Fast-Flow (Pharmacia Biotech, Sweden) equilibrada con buffer A. La YLSCP2 se eluye con un gradiente lineal de 200 ml con un rango de 0 a 500 mM NaCl en buffer A. La pureza de las fracciones se analiza en un gel de SDS-PAGE y las fracciones conteniendo la YLSCP2 pura se juntan y almacenan en alícuotas de 0,5-2,0 ml a -20°C.

Al purificarla y almacenarla en forma desnaturalizada (8 M Urea), la proteína debe ser renaturalizada por diálisis a 4°C en bolsas para diálisis de corte de 10.000 kDa contra buffer 50 mM fosfato, por 3 cambios como mínimo de 350 volúmenes cada uno, durante 16 hs en total. El último paso es eliminar los restos de material particulado centrifugando la muestra 30 min a 15.000 g a 4°C. La concentración de la proteína se mide por Absorbancia a 280 nm conociendo su coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon^{280} = 9640 \text{ M}^{-1}$ ), publicado por Ferreyra et al (*Ferreyra, Arch Biochem Biophys. 2006*).

### **A.3.4. - Cuantificación de Proteínas.**

Una forma de estimar la masa celular en un cultivo es midiendo la cantidad de proteínas, y así se puede estandarizar una determinación de otro parámetro. Para la mayor parte de los experimentos en cultivo, se crecieron células en paralelo cultivadas en iguales condiciones para la determinación de interés y para medición de proteínas. Las monocapas celulares se colectaron en buffer de lisis conteniendo 10mM Tris, 1mM EDTA y Cocktail Inhibidor de proteasa animales (SIGMA), y luego son mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Una vez descongeladas las muestras, se homogeneizan por sonicado, se centrifugan para eliminar restos celulares 2 min a 1000 g y el contenido de proteínas celulares se determinó por distintos métodos.

En el caso de los ensayos *in vitro*, también es fundamental poder conocer la concentración de una muestra de proteína pura para poder eliminar diferencias en los ensayos biofísicos debido a cambios de stock.

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando distintas metodologías acorde a los distintos requerimientos experimentales:

#### **A.3.4.1. - Coeficiente de Extinción Molar**

En los casos donde se posee una muestra pura de proteína y el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) es conocido, se calcula la concentración de la misma aplicando la Ley de Lambert-Beer, midiendo la Absorbancia a 280 nm. Así,

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times l \times C$$

donde  $l$  es el camino óptico (1 cm para este caso),  $C$  es la concentración de la muestra (expresada en M) y  $\epsilon_{280}$  es el coeficiente de extinción molar de la proteína (expresado en  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Por lo general, es necesario realizar una

dilución 1/100-1/1000 con H<sub>2</sub>O bidestilada para obtener un valor confiable de A<sub>280</sub>, entre 0,5 y 1,0 unidades de Absorbancia.

#### **A.3.4.2. – Bradford**

Esta es una técnica práctica y ampliamente difundida para cuantificar la presencia de proteínas en muestras biológicas basada en el cambio en el espectro de absorción que muestra el colorante Coomasie Brilliant Blue G250 al unirse a los residuos de los aminoácidos en una proteína, el máximo de absorción pasa de 465nm a 595nm. Debido al tipo de interacción con los residuos de proteínas, principalmente Lys, muestra gran variación con la secuencia de las mismas cuando se analizan muestras puras y se prefiere su uso con muestras complejas.

La técnica se desarrolla preparando diluciones de las muestras a analizar y del patrón, para armar una curva de calibración. Cada muestra se lleva a 50 µl con solución fisiológica y se le agregan 1,5ml de la solución de reacción (Coomasie Brilliant Blue G250 0,01% en 8,5% Ácido fosforico, 10% Etanol 96°). También puede reducirse para la técnica en microplaca mezclando 10 µl de muestra y 300 µl de la solución del colorante para medir en un lector de placas. El color tarda 5min en desarrollarse y es estable por 90min. El rango lineal de detección abarca una concentración en la muestra de 100 a 1500ug/ml

#### **A.3.4.3. - Ensayo de proteínas con ácido bicinconínico**

Una variación del método de Lowry (*Lowry, J. Biol. Chem. 1951*) es el ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (BCA, Sal disódica del ácido 2,2'-Biquinoline-4,4'-dicarboxílico) en el cual se emplea este compuesto para revelar la presencia del Cu<sup>+1</sup> que se forma en presencia de péptidos en medio alcalino, con una mínima variación con la secuencia de aminoácidos. Sólo la presencia de residuos de Trp o Cys parece tener un efecto visible al trabajar con proteínas puras. Este método tiene la ventaja de mostrar un rango más amplio de

estabilidad y tolerancia de sustancias interfirientes, por lo que es el método de elección al trabajar con muestras pequeñas y limitadas.

En una primera etapa el  $\text{Cu}^{+2}$ , que se mantiene en solución en medio alcalino gracias a un complejo con tartrato, se reduce en presencia de péptidos y da la clásica reacción de Biuret al complejarse con péptidos y da un color azul-violáceo. En la segunda etapa, el complejo es rápidamente desplazado por dos moléculas del BCA que forma un complejo muy estable y de color violáceo más intenso, mejorando el límite de detección. Ésta técnica tiene un rango de linealidad de 2.0 a 40 ug de proteína cuando se realiza en microplacas, y de 0.5 a 20ug en tupos de vidrio. La curva de calibración también se realiza con BSA.

El protocolo para microplacas consiste en colocar en cada posillo el volumen adecuado de muestra y se lleva a 150  $\mu\text{l}$  con solución fisiológica. También se colocan 150  $\mu\text{l}$  de las diluciones del Standard. Luego se agregan 150  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo, que consiste en la mezcla de 25 partes de la Solución A (4% tartrato de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , 3%  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  en  $\text{NaOH}$  0,2N); 24 partes de la Solución B (0,5% BCA) y 1 parte de la Solución C (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). La microplaca se agita y se incuba 2hs a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente, se mide la intensidad del color midiendo la Absorbancia a 562 nm. Se traza la curva patrón, y a partir de ella se interpola la concentración de proteínas de las muestras, corrigiendo por la dilución efectuada en cada caso.

La ventaja principal de éste método es que la gran estabilidad del producto final minimiza la interferencia de productos con poder reductor y detergentes, pudiendo contener la muestra hasta 5 mM DTT y 1% Triton X-100, que normalmente se emplean en la obtención de las muestras de células en cultivo o tejidos. Para realizar este ensayo se empleó el kit comercial provisto por Pierce Biotechnology/Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) y se empleó el Standard de 2 mg/ml de BSA provisto junto con el kit para preparar las diluciones de la curva patrón.

### **A.3.5. - Obtención de anticuerpos policlonales anti-LFABP en conejo**

Para poder estimar la expresión de la proteína en las células en cultivo, se emplearon anticuerpos policlonales en un ensayo de Western Blot. La obtención de los anticuerpos se realiza siguiendo un protocolo de inoculación de la proteína en conejos (Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. 1985). Básicamente se somete a una primera exposición a la LFABP recombinante de rata a dos conejos machos blancos, de unos 3 kgr cada uno, junto con el Adyuvante de Freund Completo para aumentar su inmunogenicidad. Se aplican 2mg LFABP en 1,0ml buffer mezclada con 1,0ml de Adyuvante de Freund en 4 alícuotas en distintas zonas sobre el lomo de cada conejo. El procedimiento se repite otras 3 veces cada 21-25 días, pero con el Adyuvante de Freund Incompleto. Durante este tiempo los conejos se mantienen en jaulas individuales con suministros de alimento balanceado y agua diarios. A los 10-12 días de la última aplicación, los conejos son anestesiados y la sangre se extrae por punción cardíaca. La sangre se deja coagular y el suero se recupera luego por centrifugación.

El antisuero así obtenido contiene los anticuerpos policlonales y se analiza su título ensayando la capacidad de reconocer diferentes cantidades de la proteína recombinante en un Western Blot a distintas diluciones. Al mismo tiempo se evalúa la reactividad cruzada con IFABP de rata recombinante. Si se observan resultados positivos a diluciones mayores de 1/1000 sin reactividad cruzada con IFABP, el antisuero se considera apto para los ensayos deseados.

### **A.3.6. - WesternBlot de Proteínas**

El ensayo de WesternBlot se empleó para detectar la presencia de las FABP o  $\beta$ -actina (como control interno) en una muestra compleja mediante el uso de anticuerpos específicos. La técnica consiste en la transferencia e inmovilización de proteínas, separadas previamente por electroforesis en gel de PAGE (nativo) o SDS-PAGE (desnaturalizante), a un soporte sólido seguida de la detección inmunológica de la proteína de interés.

En este trabajo de tesis se emplearon los anticuerpos obtenidos según el protocolo detallado en la sección anterior para detectar la presencia de LFABP. Para la detección de beta-Actina e IFABP se emplearon anticuerpos comerciales o un antisuero gentilmente cedido por el laboratorio de la Dra Storch, (Rutgers University, NJ - USA) respectivamente. Éste último también corresponde a anticuerpos policlonales obtenidos en conejo, por lo que son reconocidos con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo unido a HRP (peroxidasa de rábano, *HorseRadish Peroxidase*). Pero los anticuerpos anti-betaActina son monoclonales, obtenidos en ratones por lo que requieren de un segundo anticuerpo de burro anti-IgG de ratón unido a HRP. El uso de anticuerpos secundarios unidos a HRP permite el uso de los kits comerciales que acoplan la oxidación del ácido cumárico y luminol con la reducción del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como el SuperSignal WestPico (Pierce).

La separación de las proteínas se realiza por SDS-PAGE, pero empleando el standard de peso molecular Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker que contiene bandas de proteínas precoloreadas (250 kDa Azul, 160 kDa Rojo, 105 kDa Verde, 75 kDa, Amarillo, 50 kDa Violeta, 35 kDa Azul, 30 kDa Naranja, 25 kDa Verde, 15 kDa (doblete) Azul, 10 kDa Rojo). Éste Standard sirve, además de cómo referencia del peso molecular de las bandas identificadas, para verificar que la transferencia de las proteínas fue eficiente en todo el rango de pesos moleculares. Las proteínas del gel de SDS son transferidas a una membrana de PVDF por electroblotting en una celda Inmunoblot para cubas MiniProtean III (BioRad). Para este procedimiento se emplea el buffer de Transferencia (25mM Tris, 192mM Glicina, 20%v/v Metanol pH 8.3), que debe embeber completamente los geles y la membrana (ésta última del lado del ánodo) dispuestos en el medio de un "sandwich" de papel de filtro y esponjas para mantenerlos inmóviles.

La transferencia dura unos 60min a 100Volts, luego de los cual la membrana se bloquea toda la noche a 4°C con 5% leche descremada en polvo resuspendida en buffer PBS suplementado con Tween-20 0,05% (PBST o Buffer de lavado). Al día siguiente se incuba 1hr a temperatura ambiente la membrana

con agitación suave con una dilución del primer anticuerpo 1/5000 ó 1/10000 (según el anticuerpo empleado) preparada en buffer PBST con 1% leche descremada en polvo. Se lava la membrana 5 veces durante 30 min con buffer PBST y luego se incuba 1hr a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo preparado del mismo modo que el primero (dilución 1/10000). Se vuelve a lavar como antes y se incuba con la solución de revelado, formada por cantidades iguales de ambos reactivos quimioluminiscentes del kit SuperSignal West Pico, según las instrucciones del proveedor. La membrana se escurre y envuelve en una película de nylon previamente a impresionar una placa radiográfica Kodak en un cassette de autoradiografías dotado de amplificadores de señal (*Intensifying Screens*). La placa se revela luego de 30 segundos a 5 minutos de exposición (de acuerdo la concentración de proteínas) como cualquier placa radiográfica.

En el caso de querer volver a desafiar la membrana con otro anticuerpo primario, ésta se somete a un proceso de *stripping* que elimina todas las proteínas asociadas a la membrana luego de la electrotransferencia. La membrana se incuba en solución de *stripping* (100mM mercaptoetanol, 50mM tris, 2% SDS pH 6.8) durante 15-30 min en caliente (50°C), y luego se lava en buffer PBS. Al final este procedimiento, la membrana está lista para volver a ser bloqueada e incubarla con otro anticuerpo primario, específico contra otra proteína de interés. Es importante destacar que el Strippingo no es conveniente repetirlo más de 2 ó 3 veces y siempre hay que tratar de detectar primero las proteínas que se encuentran en menor concentración ya que se van perdiendo paulativamente en cada ciclo las proteínas transferidas desde el gel.

Las placas de autoradiografía son digitalizadas en un Scanner HP Precision y almacenadas para su análisis posterior. Las bandas se cuantifican por densitometría utilizando el programa Kodak Digital System, y la señal correspondiente a las FABPs se normaliza por la correspondiente a  $\beta$ -Actina, que funciona como control interno.

### **A.3.7. - Ensayo de determinación de fósforo inorgánico**

La cuantificación de membranas fosfolipídicas artificiales se realiza por el ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico (Pi) según la técnica de Gomori et al. en 1942 (*Gomori, J Lab Clin Med 1942*). Se prepara la curva Standard empleando una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mM. Las muestras se preparan en tubos limpios (sin detergente) tomando alícuotas de 5-15  $\mu\text{l}$  por duplicado, al igual que los Standard, que abarca el rango de 2 a 60 nmoles de Pi, y el blanco. Se agregan 30  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)$  10% en etanol y se carboniza a la flama. Luego se agregan 400  $\mu\text{l}$  de HCl 0,5 N, se agita bien en vortex y los tubos se incuban por 30 minutos en baño de agua hirviendo. A continuación, se agrega a cada tubo 930  $\mu\text{l}$  de una solución 1:6 (vol/vol) de ácido ascórbico (10% peso/vol): ácido molíbdico, se vortexea y se incuban nuevamente las muestras durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a 820 nm en un espectrofotómetro y se calcula la concentración de las vesículas interpolando su valor desde la curva patrón. La concentración de las vesículas que contienen CL en su composición debe ser corregida de acuerdo a la relación de 2 grupos fosfatos por molécula de CL y a su proporción en la mezcla de lípidos, es decir dividiendo por 1.25.

## **A.4. – Protocolos de Biofísica**

### **A.4.1. - Control de la integridad estructural de los mutantes puntuales de IFABP**

Como vimos en el Capítulo 2, el análisis de los modelos obtenidos por Modelado por Homología para los mutantes puntuales de IFABP no logró evidenciar ninguna alteración significativa en la conformación de la proteína. Sin embargo, ésta es sólo una aproximación por simulación y debe ser comprobada experimentalmente. Por tal motivo se recurre a una batería de ensayos que permiten comparar distintas características asociadas a la conformación de las proteínas en forma empírica.

#### **A.4.1.1. - Dicroísmo Circular**

Las moléculas quirales tiene la peculiaridad de interactuar de forma distinta con la luz polarizada en sentidos opuestos. Así, el análisis de su interacción con la luz polarizada brinda información de su configuración espacial. Por eso, la obtención del espectro de Dicroísmo Circular (CD, de las siglas en inglés *Circular Dicroism*) de una proteína contiene información de la estructura tridimensional de la misma. Esta técnica mide las diferencias de interacción de una molécula con la luz circularmente polarizada en sentidos opuestos debido a su quiralidad en sus grupos funcionales como en las estructuras regulares que forman. En el caso de proteínas y el espectro obtenido en el UV lejano (180-240 nm), se puede obtener información de la estructura secundaria de las proteínas. En la región del UV cercano (240-320 nm), en cambio, el espectro de CD brinda información sobre la estructura terciaria de la proteína.

Para comprobar que los mutantes se pliegan correctamente se midieron espectros de CD en el UV lejano con el objetivo de evaluar los componentes de estructura secundaria. Los espectros de CD fueron tomados en un espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco Corporation, Japan). Las condiciones generales que se utilizaron para tomar los espectros fueron; velocidad de 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 segundo. Los datos se obtuvieron en el UV lejano (180-240 nm) midiendo en cubetas de 1 mm una suspensión de 0,15

mg/ml. Se toman 5 espectros para cada proteína, incluyendo la proteína nativa, y se promedian.

La concentración exacta de la proteína en la muestra analizada fue medida a continuación en un espectrofotómetro por  $A_{280}$ . Los datos de elipticidad que mide el equipo son luego normalizados por la medida de concentración y son expresados como Elipticidad Molar en función de la longitud de onda.

La determinación de la concentración suele tener asociado mayor error, por lo que los espectros pueden no ser exactamente superponibles; pero, por esta misma razón, tiene más sentido comparar la forma y posiciones de máximos y mínimos en el espectro que los valores absolutos. De ser necesario, los porcentajes de las distintas estructuras secundarias ( $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$ ) pueden calcularse utilizando distintos algoritmos, disponibles en internet, como por ejemplo: SELCON3, CONTINLL, y CDSSTR; accesibles en el servidor del Department of Crystallography, Birkbeck College, University of London (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>).

#### **A.4.1.2. - Rendimiento cuántico**

Cuando una molécula fluorescente es excitada, la misma puede volver al estado basal por diferentes caminos: relajación térmica, una reacción química, interacción con el solvente u otro quencher, fluorescencia, etc. La fracción de las moléculas que se relajan por fluorescencia se conoce como rendimiento cuántico de fluorescencia, y depende en gran medida de la interacción del fluoróforo con su entorno lo que condiciona cuales mecanismo de relajación estarán favorecidos. Así, el rendimiento cuántico es útil para evaluar la hidrofobicidad relativa del entorno de un fluoróforo, determinado con respecto a un fluoróforo de referencia.

Se midió el rendimiento cuántico ( $Q_f$ ) del análogo fluorescente del ácido oléico antroiloxy-derivado (12AO) unido a proteínas nativas y mutantes puntuales, usando quinina-hemisulfato como fluoróforo de referencia, que posee un  $Q_{ref} = 0,7$  en  $H_2SO_4$  0,1 N (Storch, *J Biol Chem.* 1989). Se preparan distintas soluciones de

quinina-hemisulfato en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N, y soluciones 4 μM 12AO en buffer TBS y etanol absoluto. Las muestras conteniendo las distintas proteínas con el ligando 12AO en una proporción 20:1 (proteína:ligando) más los estándares antes mencionados fueron excitadas a 352 nm y 383 nm. Se registró la intensidad de emisión de fluorescencia del ligando en el rango de 430-460 nm y, por otra parte, se midió la absorbancia a 352 nm y 383 nm de las soluciones.

Con los valores obtenidos se calcula primero el factor de corrección de la lámpara debido a que por un lado la lámpara no tiene la misma intensidad de emisión en todo el rango de longitudes de onda y, por otro, el detector también presenta variaciones con la longitud de onda que se registra. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de corrección de la Lámpara (LF)} = \frac{\text{Int prot 352} \times \text{Abs prot 383}}{\text{Int Prot 383} \times \text{Abs prot 352}}$$

Calculado el factor de corrección, se procede a calcular el rendimiento cuántico del 12AO dentro de cada una de las FABP. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$Q_{f,prot} = \frac{\epsilon_{quinina 352}}{\epsilon_{12AO 383}} \times \frac{[Qs]}{[12AO]} \times LF \times Q_{f,Qs} \times \frac{\text{Int Prot 383}}{\text{Int Qs 352}}$$

#### **A.4.1.3. - Determinación de la constante de afinidad por ácidos grasos naturales empleando el método de ADIFAB**

ADIFAB es una sonda fluorescente que permite monitorear la concentración de FA libres en equilibrio con la proteína cuyo  $K_D$  se quiere determinar. La sonda fluorescente ADIFAB es una IFABP modificada químicamente que contiene un grupo fluorescente acrilodan unido covalentemente. La unión de los FA a la sonda ADIFAB modifica el entorno hidrofóbico del fluoróforo y determina un corrimiento hacia el rojo en el máximo del espectro de emisión del acrilodan (*Richieri, J. Biol. Chem. 1994*), de 432 a

505 nm. Así, con el valor de  $K_d$  conocido de ADIFAB por el ligando natural específico, se pueden determinar las afinidades para otras proteínas.

Básicamente, se prepara una solución stock de ácido oleico 25 mM (o el ligando a estudiar) en una solución de BHT 25  $\mu$ M (pH 9,7). Con la misma se titula una solución HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 mM (pH 7,4), conteniendo 0,2  $\mu$ M ADIFAB y 4 $\mu$ M IFABP. Se incuba por 5 minutos a 37°C y se mide la emisión de fluorescencia a 432 y 505 nm, excitando a 386 nm. Se calcula el cociente R (emisión a 505 dividido por la emisión a 432 nm) para los 10 pares de medidas para distintos agregados de ácido oleico. El análisis del equilibrio de unión, utilizando un  $R_{\text{max}}$  de 11,5 (Richieri et al., 1994), se ajusta para la unión a un solo ligando en el caso de IFABP y sus mutantes por el método de Scatchard para obtener los valores respectivos de  $K_D$ .

#### **A.4.2. – Determinación de la constante de disociación de AOFA y DHE**

Cómo se explicó en el capítulo 2, la afinidad de un ligando por una proteína puede expresarse como la Constante de Disociación ( $K_D$ ) del complejo que se forma entre ambos. Se analiza la unión de varios derivados fluorescentes de compuestos hidrofóbicos naturales, como los AOFA y el DHE que son análogos de los ácidos grasos y del colesterol, respectivamente; para identificar los ligandos naturales de la YLSCP2. Si la intensidad de fluorescencia es significativamente distinta cuando se encuentran en buffer que cuando están unidos a la proteína, se considera un indicio de que el análogo fluorescente deriva de un ligando natural de la proteína.

La  $K_D$  se calcula mediante una titulación fluorimétrica. Para la YLSCP2, el protocolo de titulación fluorimétrica a emplear es equivalente al descrito para FABP. Consiste en monitorear el incremento de la fluorescencia del ligando fluorescente como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de proteína. Se registra el espectro de fluorescencia a 25°C de la muestra luego de cada agregado de proteína entre 400 y 500 nm excitando con luz de 383 nm,

para los AOFA; o entre 350 y 500 nm excitando a 325 nm, para el DHE. Las cantidades de proteína deben abarcar un rango de proporciones proteína/ligando hasta alcanzar la saturación, o como mínimo de 0 a 20. Se realiza una incubación de 3-5 minutos a 25°C, para alcanzar el equilibrio previamente a la obtención de los espectros. En este caso, los datos fueron analizados por dos métodos para obtener las  $K_D$  para YLSCP2. Primero se recurrió al método de Scatchard ya mencionado anteriormente. Además se extendió el análisis por el método de ajuste no lineal empleando la ecuación cuadrática para un único sitio de unión (Miller, *J. Biol. Chem.* 1983):

$$PL = \frac{(P_0 + L_0 + K_D) - \sqrt{(P_0 + L_0 + K_D)^2 - 4P_0L_0}}{2}$$

dónde  $PL$ ,  $P_0$  y  $L_0$  son las concentraciones del complejo, proteína total y ligando total, respectivamente. La señal de fluorescencia en el equilibrio fue asumida como

$$y = Y_P (P_0 - PL) + Y_{PL} PL + Y_L (L_0 - PL)$$

dónde  $Y_P$  es la fluorescencia de la proteína libre,  $Y_{PL}$  es la fluorescencia del complejo, y  $Y_L$  es la fluorescencia del ligando libre. El ajuste se realiza empleando el módulo *Solver* del Excel MS Office, que minimiza el error cuadrático medio entre los datos y la curva del modelo.

#### **A. 4.3. - Ensayos de desplazamiento de 16AP**

No todos los ligandos que uno quiere analizar poseen un análogo fluorescente útil para realizar el ensayo descrito en el inciso anterior. Otras veces, los análogos fluorescentes no son lo suficientemente similares como para garantizar que la proteína tiene afinidad por ambos simplemente observando la unión a uno solo de ellos. Es por eso que se recurre a un ensayo de desplazamiento de ligandos. El ensayo consiste en, una vez identificado un ligando con buena afinidad y señal para la proteína en estudio, se monitorea el desplazamiento de éste análogo fluorescente por una titulación con el o los ligandos naturales, los cuales no producen ninguna señal fluorescente, pero sí evita que el primero se una a la proteína. Esto se evidencia como una

disminución de la señal del ligando fluorescente. Esta técnica tiene la ventaja de que puede ser empleada con cualquier compuesto natural.

Para la YLSCP2 el 16AP fue el ligando fluorescente que demostró tener mejor señal unido a la proteína, por lo que se empleó para el protocolo de desplazamiento. El ensayo es nuevamente una titulación fluorimétrica, pero esta vez la titulación se realiza con un ligando natural (no fluorescente) sobre un complejo YLSCP2:16AP preformado. El protocolo consiste en mezclar en una proporción 10:1 proteína: ligando (concentración final aproximada 0,5  $\mu$ M ligando) y permitir que se forme el complejo incubándolos a 25°C durante 5-10min. Luego se registran los espectros de emisión entre 400 y 500nm del 16AP, excitando con luz de 383nm, luego de cada agregado del ligando natural (ácido oleico o colesterol) desde una solución stock cubriendo un rango de 0 a 20 veces la concentración de la proteína. El colesterol se agrega desde una solución etanólica bien concentrado, de forma tal que al cubrir todo el rango del ensayo no se supere un 0,5% de etanol en la mezcla final. No hay problema con el Oléico ya que se agrega como oleato de sodio desde un stock acuoso.

Los datos se corrigen por dilución y los espectros se superponen para evaluar el efecto del ligando natural. Si se observa una disminución de la fluorescencia del 16AP se puede interpretar como que la YLSCP2 une también al ligando natural.

#### **A.4.4. - Cálculo del coeficiente de partición**

El coeficiente de partición ( $K_P$ ) de un ligando nos brinda información de la afinidad relativa que tiene un soluto por dos medios o, en este caso, de un ligando hidrofóbico por una proteína y una membrana fosfolipídica artificial. En este trabajo de tesis, se obtuvo el  $K_P$  del ligando AOFA entre las SLBP y vesículas unilamelares pequeñas (SUV). Este valor se usó como parámetro para comparar la afinidad por el 12AO de los mutantes puntuales de IFABP y para establecer las condiciones del experimento de transferencia que se detalla más adelante.

El protocolo se basa en el método propuesto por Massey et al. (*Massey, Biophys J. 1997*). Brevemente, se mide el espectro de fluorescencia de una solución conteniendo la proteína más el ligando fluorescente en una proporción 10:1 (1,5  $\mu\text{M}$  12AO ó 1,0  $\mu\text{M}$  16AP) en buffer TBS, luego del agregado de cantidades crecientes de SUV. Las vesículas contienen NBD-PC (una molécula de fosfatidilcolina que tiene unido un derivado de ácido grasos con el grupo NBD en la porción hidrofóbica) que funciona como quencher de la fluorescencia de grupo antroiloxi. Las muestras se incuban por 3-5 min, y se les realiza la medida de fluorescencia a una temperatura de 25°C, excitando con luz de 383 nm y se toman espectros de emisión entre 400-500 nm.

El  $K_p$  se define como:

$$K_p = \frac{([\text{SLBP-AOFA}]/[\text{SLBP}])}{([\text{SUV-AOFA}]/[\text{SUV}])}$$

donde [SLBP-AOFA] y [SUV-AOFA] representan las concentraciones de 12AO unido a la proteína o a las vesículas, respectivamente.

El agregado de las vesículas conteniendo NBD-PC determina una disminución de la fluorescencia inicial del ligando en presencia de la proteína. Los cambios en la fluorescencia del AOFA se relacionan al  $K_p$  según la siguiente ecuación:

$$1/\Delta F = K_p \times (1/\Delta F_{\text{max}}) \times \frac{[\text{SLBP}]}{[\text{SUV}]} + 1/\Delta F_{\text{max}}$$

donde  $\Delta F$  es la diferencia entre la fluorescencia inicial del AOFA con la proteína en ausencia de SUV y la fluorescencia del mismo a una determinada proporción SLBP:SUV; y  $\Delta F_{\text{max}}$  es la máxima diferencia en la fluorescencia del AOFA. Así, graficando  $1/\Delta F$  versus  $(1/\Delta F_{\text{max}})([\text{SLBP}]/[\text{SUV}])$  se obtiene una recta, de la cual la pendiente corresponde al  $K_p$ .

### **A.4.5. - Preparación de membranas artificiales**

A lo largo de este trabajo de tesis se recurre al uso de membranas fosfolipídicas artificiales en reiteradas oportunidades. Las mismas son preparadas a partir de sus componentes puros (AVANTI Lipids) por dos metodologías distintas, que permiten obtener vesículas unilamelares de distinto tamaño.

#### **A.4.5.1. - Vesículas unilamelares pequeñas (SUV)**

Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV, de sus siglas en inglés: Small Unilamellar Vesicles) se preparan de acuerdo al protocolo presente en los trabajos de Huang et al. (1974) y Storch et al. (1986). Los lípidos puros disueltos en  $\text{CHCl}_3$  se mezclan, secan bajo una corriente de  $\text{N}_2$  y se resuspenden en buffer TBS. La mezcla de fosfolípidos se sonica bajo  $\text{N}_2$  en un baño de agua-hielo hasta clarificar la suspensión, lo que lleva unos 45 minutos aproximadamente. Las vesículas son clasificadas por ultracentrifugación a 45.000 rpm durante 45 minutos y se guardan sólo las SUV del sobrenadante a 4°C en una atmósfera de  $\text{N}_2$ . La concentración de las SUV obtenidas se calcula en base al ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico.

Para la determinación de  $K_p$  y los ensayos de transferencia es necesario incorporar un 10% mol/mol de NBD-PC, que contiene el grupo que funciona como quencher de la fluorescencia de los antroiloxiderivados de ácidos grasos (AOFA). Así, se preparan vesículas zwitteriónicas con una composición de 90 mol% fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 10 mol % NBD-PC. Para incrementar la densidad de la carga superficial negativa de las vesículas aceptoras, se incorporan un 25 mol% de fosfatidilserina (PS) o de cardiolipina (CL) en las SUV. Para las vesículas que contienen CL se suplementa el buffer TBS con 1 mM EDTA. El EDTA sirve para complejar las impurezas de iones metálicos pesados, que catalizan los procesos de oxidación, ya que la CL es muy sensible al  $\text{O}_2$ .

#### **A.4.5.2. - Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV)**

Las vesículas unilamelares grandes (LUV, de sus siglas en inglés: *Large Unilamellar Vesicles*) se preparan por extrusión según la técnica descrita en Córscico et al. 2001. Primero los lípidos puros disueltos en  $\text{CHCl}_3$  se mezclan, se secan bajo una corriente de  $\text{N}_2$  y se resuspenden en buffer TBS, de la misma manera que se realizó para las SUV. Para las vesículas que contienen CL también se utiliza buffer TBS con 1mM EDTA. Finalmente, las LUV se obtienen extruyendo 11 veces la suspensión de fosfolípidos empleando un filtro de policarbonato de 0,1 $\mu\text{m}$  de poro y un extrusor Liposofast (Avestin, Canada). Las LUV se colectan en un vial de vidrio y se guardan a 4°C en una atmósfera de  $\text{N}_2$ .

#### **A.4.6. - Transferencia de antroiloxi-ácidos grasos (AOFA) desde SLBP hacia SUV.**

La técnica de Stopped-Flow o Flujo Detenido se emplea para estudiar procesos muy rápidos, menores a unos pocos segundos. Por eso se recurre a la mezcla directa de los componentes del sistema en la cubeta del espectrofluorómetro donde se realiza el ensayo. La transferencia de los AOFA se monitorea por el fenómeno Förster de Transferencia de Energía de Resonancia (FRET, de sus siglas en inglés *Förster Resonance Energy Transfer*), que se evidencia cuando el ligando se introduce en las membranas aceptoras preparadas con el quencher NBD-PC, fluoróforo que funciona como aceptor FRET del grupo antroiloxi. Para estudiar la transferencia de AOFA desde los mutantes puntuales de IFABP y la YLSCP2 hacia las SUV aceptoras se recurre a la técnica descrita por Storch et al. en 1990 (*Storch, Mol Cell Biochem. 1990*). Brevemente, se registra, con la ayuda del módulo de cinética rápida Stopped-Flow Module RX2000 (Applied Photophysics Limited, UK), la disminución de la fluorescencia del grupo antroiloxi de los AOFA, a medida que el ligando se transfiere desde las SLBP hacia las SUV.

La curva resultante de la transferencia del ligando se ajusta a una curva de cinética de decaimiento exponencial simple:

$$F(t) = A \times e^{-b \cdot t} + C$$

donde **b** corresponde a la velocidad inicial de transferencia del ligando. El ajuste de las distintas curvas fue realizado utilizando el software provisto por el espectrofluorómetro o procesadas posteriormente con el software SigmaPlot (SPSS Inc., UK). Los valores de velocidad fueron tomados del parámetro **b** que tiene unidades de  $\text{seg}^{-1}$ . En la **Figura 3.8** se muestra un esquema del ensayo de transferencia.

#### **A.4.6.1. - Efecto de la concentración de las vesículas aceptoras**

Para analizar el efecto de la concentración de las vesículas zwitteriónicas (90% EPC, 10% NBD-PC), se realiza el experimento a distintas proporciones proteína:SUV. Así, a mayor concentración de vesículas, aumenta la frecuencia de choque de las proteínas con las membranas, lo que favorece la transferencia de ligandos a través de un mecanismo colisional, como el que presenta la proteína IFABP nativa.

Para el caso de la IFABP y sus mutantes puntuales, se preparan soluciones 2X en buffer TBS de las proteínas, y se las incuba con 12AO en una proporción 10:1 (concentración final en el ensayo 1,5  $\mu\text{M}$  ligando) durante aproximadamente 10 minutos para permitir que la formación del complejo proteína-ligando llegue al equilibrio. El 12AO se agrega desde una solución stock concentrada en etanol, quedando una concentración final de etanol en el medio menor al 0.05% (v/v). Basados en el  $K_D$  publicado para wtIFABP (0,16  $\mu\text{M}$ ) (*Hsu, J Biol Chem. 1996*), la proporción 10:1 proteína:ligando asegura que más de un 95% del ligando se halle unido a la proteína. Por otro lado, se preparan las soluciones 2X de las vesículas aceptoras, tal que al diluirlas al medio den concentraciones de 150 a 600  $\mu\text{M}$ . El complejo proteína-12AO se inyecta junto con las SUV en la celda del módulo de cinética rápida, termostatzado a 25°C, y se mezclan al mismo tiempo que se monitorea la fluorescencia de la muestra a

una velocidad de 1 punto cada 3-10  $\mu\text{seg}$  durante 5-30 segundos de forma de obtener un mínimo de 2000 puntos por ensayo. Ya que todos los controles estructurales y la afinidad por lignados naturales no mostró diferencias en los mutantes puntuales (ver resultados), las mismas condiciones se emplearon para estudiar la transferencia de todas las variantes de IFABP.

En el caso de las transferencias de AOFA medidas desde YLSCP2, el protocolo consiste en preparar soluciones 2X en buffer TBS de la YLSCP2 y se la incuba con 16AP en una proporción 10:1 (concentración final en el ensayo 0,25  $\mu\text{M}$  ligando) durante aproximadamente 10 minutos para permitir que la formación del complejo proteína-ligando llegue al equilibrio. El 16AP se agrega desde una solución stock concentrada en etanol, quedando una concentración final de etanol en el medio menor al 0,05 %V/V. Basados en los  $K_D$  obtenidos, la proporción 10:1 proteína:ligando asegura que más de un 95% del ligando se halle unido a la proteína. Por otro lado, se preparan las soluciones 2X de las vesículas aceptoras, tal que al diluirlas al medio den concentraciones de 75 a 600 $\mu\text{M}$ . El procedimiento continúa análogamente como para las FABP.

Los datos de la transferencia se guardan en un archivo ASCII, para su análisis posterior, y el ensayo se repite hasta obtener al menos 5 curvas superponibles de fluorescencia vs. tiempo, las cuales se promedian. Un set de medidas para cada condición en el mismo día y los resultados se expresan generalmente como velocidades absolutas de transferencia.

#### **A.4.6.2. - Efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras**

En este caso el ensayo es equivalente al descrito en el inciso anterior, pero con la diferencia de que, para analizar el efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras, se fija la concentración final de las SUV a 150  $\mu\text{M}$  y se emplean SUV de distinta composición. El ensayo se repite con SUV que poseen un 90% EPC (un 10% siempre corresponde al quencher NBD-PC) con carga neta nula (zwitteriónicas), con SUV que poseen un 65% EPC y un 25% PS, que

presentan una carga superficial negativa; y con SUV que poseen un 65% EPC y un 25% CL y que presentan el doble de carga negativa que las anteriores. Las medidas se realizan en un mismo día para un set de condiciones y los resultados se expresan como valores de velocidad relativa de transferencia de 12AO respecto a las SUV zwitteriónicas.

#### **A.4.6.3. - Efecto de la fuerza iónica**

Para analizar el efecto del medio en la transferencia de ligandos se estudia el efecto de la fuerza iónica. Cambios en la concentración de sales del medio pueden alterar la velocidad de transferencia de ligandos cuando el mecanismo es difusional, debido a que se disminuye la solubilidad de compuestos hidrofóbicos (*Charlton, Biochemistry 1982; Constantinides, J Biol Chem 1985*), desfavoreciendo así la etapa limitante de este mecanismo. Sin embargo, no se ven efectos significativos de apantallamiento de las cargas superficiales por debajo de 2000 mM NaCl, por lo que un mecanismo colisional impulsado por la interacción electrostática entra la proteína y las vesículas no sería mayormente afectado (*Kim, J. Biol. Chem. 1992a*).

El ensayo es equivalente al descrito anteriormente, pero con la diferencia de que, para analizar el efecto de la concentración de NaCl, se fija la concentración final de las SUV zwitteriónicas a 150  $\mu$ M y se varía la fuerza iónica del buffer entre 0 y 2000 mM NaCl. Las SUV y el complejo YLSCP2-16AP son estabilizados a estas concentraciones de sales a 25°C durante al menos 10 min antes del ensayo. En el caso de observarse una tendencia, los resultados se representan como  $\ln(b)$  vs. la concentración de sales para calcular de la pendiente su factor termodinámico de influencia sobre la velocidad de transferencia del ligando.

#### A.4.7. - Obtención de parámetros termodinámicos de la transferencia de AOFA

El análisis del efecto de la temperatura sobre la velocidad de transferencia de ligandos sirve para calcular los parámetros termodinámicos del fenómeno (Kim, J. Biol. Chem. 1992a). Basándose en la teoría del estado de transición de Arrhenius y la teoría cinética de Eyring, es posible calcular los cambios de Energía Libre de Gibbs del Estado de transición ( $\Delta G^\ddagger$ ), así como los correspondientes cambios de Entalpía ( $\Delta H^\ddagger$ ) y Entropía ( $\Delta S^\ddagger$ ) del estado de transición y la Energía de activación (EA).

Se mide la velocidad de transferencia del ligando en función de la temperatura entre 5 y 45°C, a intervalos de 10°C y los resultados se grafican en un gráfico de Arrhenius, logaritmo de la velocidad de transferencia,  $\ln(\mathbf{b})$ , en función de la inversa de la temperatura ( $1/T$ ), donde  $\mathbf{b}$  es la velocidad inicial de transferencia a una dada temperatura y T está expresada en grados Kelvin (K). Esto da una recta de pendiente ( $\mathbf{m}$ ) negativa y cuya pendiente está relacionada con la Energía de Activación del estado de transición según la siguiente ecuación:

$$m = - \frac{EA}{R}$$

El valor de EA está relacionado con el  $\Delta H^\ddagger$  de la siguiente manera:

$$\Delta H^\ddagger = EA - RT$$

Luego, basándose en la teoría cinética de Eyring, el cambio de Entropía se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\Delta S^\ddagger = R \ln[N_A h X / RT]$$

con,

$$X = b/e^{-\Delta H^\ddagger/RT}$$

y  $N_A$  es el Número de Avogadro,  $h$  es la constante de de Plank,  $b$  es la velocidad de transferencia a 25°C y T es 298K. Luego, se calcula el cambio en Energía Libre a partir de éstos resultados empleando la ecuación:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

#### A.4.8. - Ensayo de fotomarcación con $^{125}\text{I}$ -TID-PC

Los reactivos fotoactivables son compuestos que están “silenciados” y que son sensibles a la luz de cierta longitud de onda, la que induce una excitación de la molécula y lo vuelve disponible para una reacción química. En este caso, empleamos un compuesto fotoactivable derivado de un fosfolípido, por lo que puede ubicarse cómodamente en una bicapa fosfolipídica, el  $^{125}\text{I}$ -TID-PC o 1-O-hexadecanoyl – 2 – O - [9 - [[[2 - [ $^{125}\text{I}$ ] yodo – 4 - (trifluoromethyl - (3H) – diazirin – 3 - yl) benzyl] oxy] carbonyl] nonanoyl] – sn - glycerol-3-phosphocholine (**Figura 4.1**). Cuando la mezcla de reacción es iluminada con la luz que emite una lámpara de Xenon ( $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ ), se produce la fotólisis del grupo diazo que es rápidamente convertido en un grupo carbeno, el cual es capaz de unirse covalentemente con una gran variedad de grupos funcionales, incluso los enlaces C-H de las cadenas aciladas vecinas. Así, si hay presentes segmentos proteico insertados o en contacto con la región hidrofóbica de la bicapa fosfolipídica, estos quedan unidos al reactivo fotoactivable, y la unión es evidenciada por la marca radioactiva que tiene unido el  $^{125}\text{I}$ -TID-PC (*Weber, J. Am. Chem. Soc., 1995*). De este modo, al enfrentar las proteínas con membranas conteniendo el reactivo fotoactivable marcado radioactivamente, podemos evidenciar el contacto físico entre ellas.

##### A.4.8.1. - Síntesis $^{125}\text{I}$ -TID-PC

La marca radioactiva se introduce al reactivo fotoactivable por síntesis orgánica a partir del precursor unido a Estaño, Sn-TID-PC, gentilmente donado por el Prof. J. Brunner (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich). El primer paso de la síntesis consiste en obtener una solución de ácido peracético. Para ello, bajo campana de gases, en una ampolla de reacción se mezclan 2,5 gr de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 250 Volúmenes con 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, a los que se le agregan muy lentamente 9,5 ml de anhídrido acético, 1 gota/min, con agitación en un baño térmico a 35°C. El proceso lleva aproximadamente 3 hs y se obtiene la solución buscada.

Luego, el reactivo <sup>125</sup>I-TID-PC se prepara por radioiodinación de su precursor no radiactivo, según Weber et al. (*Weber, J. Am. Chem. Soc. 1995*). Se transfieren 50 nmoles de Sn-TID-PC a un reactival de 1 ml. Se evapora el solvente orgánico con una corriente de N<sub>2</sub>, se aplica vacío durante 10 minutos y luego se redisuelve en 25 µl de ácido acético. A continuación, bajo campana de gases, se agregan 2,5 mCi de <sup>125</sup>I<sup>-</sup>Na y se agregan 5 µl de ácido peracético para iniciar la reacción. La mezcla se agita bien y se incuba 2 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 125 µl de 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fresco. El producto se extrae por el agregado de 100 µl de Cloroformo:Metanol (2:1) agitando bien y se centrifuga a 2000rpm por 5 minutos para que se separen las fases. Luego, siempre bajo campana de gases, se extraen los lípidos de la fase orgánica inferior y se transfieren a otro vial; donde se seca con N<sub>2</sub> y una chimenea de carbón activado, para absorber posibles desechos radioactivos volátiles. Una vez secos, los lípidos se resuspenden en 100 µl de metanol:cloroformo:agua (9:1:1).

El <sup>125</sup>I-TID-PC se purifica mediante cromatografía de alta presión de fase reversa (RF-HPLC) usando la misma mezcla de solventes en la que se resuspende y una columna 208HS54 C8 (Vydac) en un cromatografo HPLC (Merck-Hitachi) con detector UV a 254 nm. El flujo de la corrida se setea a 1 ml/min, y se colectan fracciones de 0.5 ml en tubos tipo eppendorf. El <sup>125</sup>I-TID-PC eluye alrededor de los 20 minutos, mientras que el exceso de precursor sin marcar sale a los 40 minutos. Se toman alícuotas de 5 µl de fracción de la corrida y se miden en un Contador Gamma (Packard Multiprias 1). El control de la marcación se realiza mediante una cromatografía en capa fina (TLC) sembrando alícuotas de 3 µl en placas de silica gel (LK6D, 60 Å; Whatman, Clifton, NJ). Se emplea el mismo solvente que para la purificación y las placas son analizadas por autoradiografía. Las fracciones conteniendo radioactividad a la altura esperada se

juntan, llevan a sequedad con vacío y resuspenden en 1ml de etanol absoluto. El  $^{125}\text{I}$ -TID-PC puede ser guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y su vida útil depende en realidad del tiempo de vida media del  $^{125}\text{I}$ , el cual es de unos 60 días.

Para controlar la degradación del reactivo con el tiempo, se corre una TLC antes de usar con el mismo sistema de solventes empleado para separar lípidos neutros (ver más adelante **Apéndice A5**) en busca de los productos de hidrólisis.

#### **A.4.8.2. - Experimento de fotomarcación**

El ensayo de fotomarcación consiste en enfretar a las FABP nativas y las distintas variantes estructurales con vesículas unilamelares grandes (LUV) conteniendo el reactivo fotoactivable radioiodinado. Las condiciones experimentales finales son  $16\text{ }\mu\text{M}$  FABP preincubadas con  $240\text{ }\mu\text{M}$  LUV en buffer TBS (pH 7,4) suplementado con glutatión  $50\text{ mM}$ , que neutraliza productos secundarios de la reacción de fotomarcación. En el caso de vesículas cargadas que contienen CL, además se suplementa el buffer con  $1\text{ mM}$  EDTA para que las vesículas sean estables. Esta técnica permite comparar en forma cualitativa sólo muestras tratadas en paralelo debido a la gran cantidad de variables que es difícil de fijar. Para ello se analizaron muestras de distintas proteínas, en las forma apo- y holo- (proteína:ligando 1:10), y vesículas de diferente composición que permitan caracterizar molecularmente la interacción de las FABP con membranas

Cada muestra se incuba 1 minuto a temperatura ambiente y se irradia con una lámpara de Xenón de 450 Watts a una distancia de 15 cm durante 30 segundos. La muestra luego debe ser deslipidizada agregando 3 volúmenes de Cloroformo:Metanol (2:1) y se extrae la fase clorofórmica con los lípidos. Las proteínas se precipitan con acetona en frío durante 30 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde la fase acuosa y se resuspenden en buffer muestra 1X para sembrarla en un gel de SDS-PAGE. Las muestras son resueltas y los geles se tiñen cómo se indicó anteriormente. Para obtener la autorradiografía los geles deben secarse primero,

utilizando un secador de geles Modelo 543 (Bio Rad) a 80°C durante 30 minutos, y luego son expuestos a placas autorradiográficas a -70°C por distintos períodos de tiempo, dependiendo de la marca radioactiva contenida en las muestras. En la **Figura 4.2** se observa un esquema del protocolo general del ensayo de fotomarcación.

#### **A.4.9. - Ensayo de goteo del complejo Tb/DPA**

El ensayo de goteo o “leakage” del complejo de Terbio/Ácido DiPicolínico (Tb/DPA) sirve para estudiar el efecto que tienen distintos agentes sobre la integridad de las membranas de vesículas fosfolipídicas. Su mayor utilidad en este trabajo de tesis es la de permitir cuantificar la interacción de distintas variantes estructurales de FABPs con membranas. El goteo del complejo fluorescente de Tb/DPA desde el interior de vesículas artificiales se evidencia por la disminución de la fluorescencia cuando el DPA es desplazado por el EDTA, presente en el buffer de reacción. Las SUV que encierran el complejo de Tb/DPA se obtienen preparando las vesículas cómo se describió en la **Sección A.4.1.1**, pero resuspendiendo los lípidos en un buffer de 10 mM Tris, 15 mM TbCl<sub>3</sub>, 150 mM DPA luego de liofilizarlos. Cuando los lípidos se sonicán, el complejo de Tb/DPA queda atrapado en el interior de las SUV. Luego de la ultracentrifugación las vesículas son lavadas en una columna de Superosa 6B de 60 cm de largo, empleando 40 mM Tris, 12,5 mM EDTA y 150 mM NaCl como buffer de corrida. De ser necesario, las SUV lavadas se pueden concentrar en una unidad de filtración CentriPrep con corte no mayor a 100 kDa en una centrifuga refrigerada.

El protocolo del ensayo consiste en mezclar en la cubeta del módulo de cinética rápida una solución de la proteína a analizar con las vesículas. La interacción de la FABP con las SUV induce perturbaciones en la bicapa favoreciendo el goteo desde el interior de las mismas del complejo de Tb/DPA, el cual es desplazado por el EDTA y se traduce en una disminución de la fluorescencia del Tb. Las condiciones finales fueron 10 μM FABP y 500 μM SUV. Al igual que en los ensayos de transferencia de ligandos desde la proteína hacia membrana, se registran al menos 5 determinaciones consecutivas que se superponen para luego promediarlas y obtener un valor de % Leakage. También

se registra la curva del buffer (sin proteína) y de una solución de referencia que contiene detergente, 0.25% Triton X-100. Los resultados se expresan como:

$$\% \text{ Leakage} = \frac{\text{F10min(buffer)} - \text{F10min (FABP)}}{\text{F10min(buffer)} - \text{F10min (Triton X-100)}} \times 100$$

donde **F10min** corresponde a la intensidad de fluorescencia de la cada muestra luego de 10 minutos de la mezcla con las SUV. La **Figura 4.3** muestra el esquema general del ensayo de goteo de Tb.

#### **A.4.10. - Transferencia de ligandos entre FABP nativas de intestino**

La transferencia de ligandos entre las FABP y membranas descrito en el capítulo anterior es posible gracias a la incorporación de un aceptor FRET específico en la composición de las membranasceptoras, lo que disminuye notoriamente la fluorescencia observable del grupo fluorescente de los análogos de FA utilizados. En cambio, en el sistema *in vitro* para analizar la transferencia entre proteínas, se recurre a la diferencia de rendimiento cuántico que muestran los AOFA cuando están unidos a las distintas FABP. Así, la intensidad de fluorescencia observada cuando el AOFA está unido a la LFABP es mayor que cuando se encuentra unido a la IFABP y la transferencia del mismo entre ambas proteínas implica un cambio en la intensidad de fluorescencia. Primero se realizaron ensayos de equilibrio para determinar la partición (afinidad relativa) del 12AO entre ambas proteínas y luego se realizaron los ensayos cinéticos siguiendo el cambio en la intensidad de fluorescencia en función del tiempo, análogamente a la partición y transferencia entre FABP y membranas.

Conociendo las afinidades relativas y los Kd para cada proteína, el sistema se prepara preincubando el AOFA con la proteína de menor afinidad, IFABP en este caso, para formar el complejo FABP:ligando durante al menos 10 minutos a 25°C; y analizando la velocidad de transferencia de ligando en el módulo de Stopped-Flow como se describió en el capítulo anterior. El aumento de la fluorescencia del ligando es un indicio de la transferencia del mismo desde la

IFABP hacia la LFABP (**Figura 4.4**). Cambiando las proporciones entre proteína dadora y aceptora, y las condiciones en las que se realiza el ensayo se puede estudiar el mecanismo de la transferencia y los factores que la modulan. Las condiciones finales empleadas fueron las siguientes: una proporción 10:1 IFABP:AOFA (1.5  $\mu\text{M}$  final de AOFA) y un rango de concentración entre 15 y 45  $\mu\text{M}$  LFABP. Los experimentos se realizaron a 25°C y en condiciones isotónicas.

Se realizaron al menos 5 medidas para cada condición y se promediaron. La curva resultante se ajustó a una curva de crecimiento exponencial simple de 3 parámetros empleando el Software SigmaPlot y los resultados se expresan como medias de velocidades iniciales absolutas, con sus respectivas desviaciones standard de al menos 3 experimentos independientes.

## **A.5. – Protocolos de Biología Celular**

### **A.5.1. – Propagación, mantenimiento y subcultivo de células Caco-2**

Las células en cultivo deben ser mantenidas en condiciones bastante exigentes y nutritivas para que crezcan correctamente y no se seleccionen sublíneas menos diferenciadas que tienen características distintas a la línea establecida. Se emplearon células Caco-2 que son ampliamente empleadas como un modelo de células epiteliales del intestino delgado, ya que expresan varias similitudes fenotípicas de los enterocitos del intestino delgado, tanto morfológicas como marcadores bioquímicos. La manipulación de las líneas celulares se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos que se detallan en el manual de cultivo de células animales (*Freshney, Cultura of Animal Cells. A manual of basic techniques. 2000*) y la bibliografía disponible para la línea celular Caco-2 (*Ho, Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001).

Las células Caco-2 y las líneas derivadas transfectadas se cultivan rutinariamente en placas o botellas con medio de mantenimiento compuesto por Medio Esencial Mínimo Dulbeco (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gensa) (previamente inactivado a 56°C durante una hora), NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, 100 UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina, 1% solución de vitaminas para MEM, 1% aminoácidos no esenciales. La incubación se realiza en una estufa gaseada Forma a 37°C y en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad.

Las placas o botellas se mantienen en estas condiciones entre 4 y 10 días y deben ser subcultivadas antes de que alcancen una confluencia mayor al 80%. Los subcultivos o repiques de las células se realizan diluyendo 1/8 el cultivo empleando una solución de Tripsina y EDTA (Gibco/Invitrogen) como agente desagregante que suelta las células del soporte y las separa entre sí. El protocolo consiste en descartar el medio de cultivo viejo aspirándolo dentro de una trampa de vacío con una pipeta de vidrio tipo Pasteur estéril, siempre dentro de un flujo laminar adecuadamente repasado con Etanol 70%. Luego se lava la monocapa de células con buffer fosfato 50mM con NaCl 0,85%, pH 7,4, esterilizado en autoclave. Las células se aíslan por la acción de 1-2ml de la solución de Tripsina

y EDTA 0,05% sobre la monocapa durante 5-10min a 37°C. La tripsina se neutraliza luego por el agregado de 9ml de medio fresco suplementado con FCS, que posee el Inhibidor de Tripsina Sérico; y se pipetea varias veces con ayuda de una pipeta automática motorizada para disgregar bien la monocapa. El procedimiento se sigue observando la suspensión de células en un microscopio invertido Leica y cuando las células están bien individualizadas se toman 1-2ml y se subcultivan a una placa o botella con 8ml de Medio de mantenimiento fresco.

La incubación con Geneticina se mantuvo hasta luego del aislamiento de los clones. Las células transformadas se crecieron y criopreservaron varios viales. Al momento de descongelar estos viales o con cultivos muy prolongados, también se mantuvo la incubación con Geneticina por al menos 7 días extras a modo de ejercer una presión de selección que no bloquee la expresión del vector.

Es importante remarcar que es buena costumbre rotular todas las placas y botellas con el nombre de la línea celular, el número de pasaje, el nombre o las iniciales del operador y la fecha en que se realizó el subcultivo.

### **A.5.2. - Congelado y descongelado de células Caco-2**

Las líneas derivadas de Caco-2 y las células normales se guardan almacenadas en un termo con nitrógeno líquido (-195,8°C) para asegurar su permanencia. Esto se logra tripsinizando las células de una placa o botella como se describió en la sección anterior, pero en lugar de diluir las células, estas se depositan en el fondo de un tubo tipo Falcon de 15ml estéril mediante una breve centrifugación a baja velocidad. El medio sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en 4ml de medio de congelamiento con extremo cuidado de no generar burbujas, ya que son muy frágiles en este medio. La suspensión de células se reparte en 2 alícuotas de 1,8ml en crioviales de 2ml con sello de siliconas, se cierran bien y se dejan en un Ultrafreezer de -70°C toda la noche (aunque lo ideal sería un enfriamiento lento, 1°C/min, de 0 a -70°C). La fracción restante de la suspensión se emplea para sembrar una placa de cultivo fresca que sirve como control de contaminación del procedimiento. Al día siguiente los crioviales se pasan al termo de Nitrógeno líquido y se anota en el registro su

posición con un rótulo equivalente al del cultivo, más la confluencia aproximada que se alcanzaría si se sembrara íntegramente el stock a congelar en una sola placa, como estimativo del número de células que contiene.

El medio de congelamiento debe prepararse con antelación y resulta de suplementar el medio de mantenimiento primero con 10% DMSO, mezclar bien, y luego con 20% FCS, para evitar la precipitación de las proteínas del suero.

Por otro lado, cuando es necesario descongelar un criovial, una vez lista el área de trabajo, éste se retira del termo de Nitrógeno líquido y se mantiene en hielo hasta el momento de su utilización, que debe ser lo antes posible. El descongelado rápido se logra flotando el criovial en un recipiente con agua a 40°C unos instantes. Antes de que se haya descongelado por completo el contenido del criovial, se retira, se rocía con Etanol 70% y se lleva al flujo laminar para abrirlo en un ambiente estéril y repartir distintas cantidades de células en 2 o 3 placas con medio de mantenimiento fresco. Luego de 24 hs se renueva el medio de cultivo para eliminar las células que no se adhirieron, porque eventualmente mueren y liberan compuestos tóxicos para las otras células. Luego se mantiene el cultivo como de costumbre.

### **A.5.3. - Obtención de clones Caco-2 con expresión disminuida de hLFABP**

El plásmido de expresión pcDNA3.1-AShL y el vector control, pcDNA3.1-Neo(+) vacío, se introdujeron en las células complejándolos con lípidos catiónicos como Effectene<sup>®</sup> (Stratagene), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los lípidos catiónicos, forman liposomas que interaccionan electrostáticamente con el ADN ya que posee carga negativa. Esta es una de las estrategias comúnmente usadas para introducir ácidos nucleicos en células eucariotas; aunque el tráfico intracelular de estos complejos o cómo el ADN llega al núcleo son escasamente comprendidos, pero una vez en él, el ADN plasmídico puede insertarse en el genoma de la célula huésped o quedar en forma epigénica.

En paralelo se transfectan células con el vector pcDNA3.1-GFP. La evidencia de fluorescencia verde luego de 48hs del procedimiento sirve como un rápido control de la transfección de estas células.

Una vez transfectadas las células Caco-2 con el plásmido pcDNA3.1-ASL o el pcDNA3.1-Neo(+) vacío deben obtenerse líneas estables sometiéndolas a selección con 600  $\mu\text{g/ml}$  de Geneticina en el medio de cultivo durante un mínimo de 14 días. Para obtener poblaciones homogéneas, se aíslan colonias clonales (i.e. que hayan crecido a partir de una única célula) crecidas en forma aislada en una placa de cultivo de 100mm de diámetro hasta que alcanzan un tamaño de 20 a 30 células. Luego, se individualizan y marcan en la placa con la ayuda de un microscopio óptico invertido. Se retira el medio de cultivo de la placa y se lava con PBS para eliminar trazas de suero. Utilizando cilindros de clonado sellados con grasa siliconada estéril se aíslan 5-10 colonias del resto de las células en la placa, y se tripsinizan agregando 100-200  $\mu\text{l}$  de Tripsina/EDTYA (de acuerdo al tamaño del cilindro empleado). Las células así sueltas se pasan a un frasco de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  con la ayuda de 250-500  $\mu\text{l}$  de medio fresco para enjuagar el interior del cilindro de clonado. El medio de cultivo se completa luego con 5ml de medio fresco.

Los clones así obtenidos se denominan "ASL" por Anti-Sense LFABP, y se agrega un número para diferenciarlos. Las células Caco-2 transfectadas con el vector vacío se las denominó "control" y no fueron sometidas al proceso de selección clonal para eliminar la influencia derivada del sitio de inserción del vector en el conjunto de células control.

Los niveles de expresión de LFABP se analizan por WesternBlot, empleando el antisuero obtenido en nuestro laboratorio. Los resultados se expresan como Unidades Arbitrarias (UA), normalizadas por la presencia de betaActina. Complementariamente, se analiza la posible compensación por la falta de LFABP con IFABP también por WesterBlot.

#### **A.5.4. - Determinación de la capacidad de crecimiento**

Las líneas celulares derivadas de tumores o de células embrionarias tienen comúnmente una capacidad de crecimiento mayor a la que muestran los cultivos primarios o secundarios. Esta característica está íntimamente relacionada al grado de diferenciación celular que presentan, es decir, a la especialización de dicha célula para cumplir una función determinada en el organismo. Es por esto que analizar la capacidad de crecimiento de las líneas celulares modificadas y su comparación con la línea de origen es fundamental para la correcta interpretación de los resultados de los ensayos metabólicos. Los ensayos más frecuentes para estudiar la capacidad de proliferación de las células en cultivo son la determinación del tiempo de duplicación de la línea celular y la capacidad de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en el DNA.

##### **A.5.4.1. - Tiempo de duplicación**

La forma de estimar el tiempo de duplicación de una línea celular es analizando el crecimiento celular mediante curvas de crecimiento. Estas curvas permiten estudiar la cinética poblacional del cultivo celular bajo las condiciones fijadas para el ensayo. Esto implica determinar la duración de las fases “lag”, de crecimiento exponencial (“fase log”) y estacionaria (si se alcanza), y determinar parámetros como el tiempo de duplicación poblacional.

Para este estudio se tripsiniza una placa o botella con células preconfluentes de cada línea celular a estudiar y se cuentan en una cámara de Neubauer. Luego se siembran  $1.0 \times 10^5$  células en 20 placas de petris de 60 mm para cada línea celular y se cambia el medio de mantenimiento por medio fresco cada 48-72hs. Las células de 3 placas por línea celular son tripsinizadas a distintos tiempos, dentro de los 10 días posteriores al inicio del ensayo (normalmente 24, 48, 72, 120, 168 y 240hs), y se colectadan en un tubo de 15ml tipo falcon. Las células se pelletean y se resuspenden en un volumen conocido de buffer PBS. Se evalúa la viabilidad celular por el método de exclusión de Trypan Blue (*Freshney, Cultura of Animal Cells. A manual of basic techniques. 2000*), por lo que una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  se mezcla con 50  $\mu\text{l}$  de una solución de Trypan Blue 0,4% en buffer PBS. Las células vivas (refringentes y no coloreadas)

se cuentan en los 5 recuadros de  $0,1\text{mm}^3$  de una cámara de Neubauer por duplicado.

Se deben contar un mínimo de 100 células, de no ser así debe repetirse la lectura recargando la cámara de Neubauer con nueva muestra. Hay que tener en cuenta que las células se mueren con el tiempo por lo que no se puede tardar más de 30 minutos para la determinación una vez que se mezclaron las células con la solución de Azul de Trypán.

#### **A.5.4.2. - Asimilación de $^3\text{H}$ -Timidina**

El crecimiento celular puede estimarse también midiendo la incorporación de timidina marcada radioactivamente, por un corto período de tiempo, al DNA celular. La incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina al DNA celular se determina según el protocolo descrito en *Ogretmen et al (Ogretmen, J. Biol. Chem. 2001)*. Brevemente, Se siembran alrededor de  $1,0 \times 10^5$  células de cada línea celular en 6 placas de petri de 60mm. Entre 5 y 7 días después, las células preconfluentes de 3 de las 6 placas se incuban durante 4hs con medio fresco suplementado con  $0,5 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]-Timidina. Luego de dos lavados con PBS frío, el ADN celular se precipita con 2 ml/placa de una solución de 0.5% ácido tricloroacético (TCA) durante 20 min en hielo. El precipitado se lava con 2 ml de etanol absoluto frío y luego se disuelve bien en 2 ml de una solución 0.1 M NaOH, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Una alícuota de  $400 \mu\text{l}$  se coloca en un vial de centelleo y se neutraliza con  $144 \mu\text{l}$  de 1,0 M HCl y se le agregan 3 ml de líquido de centelleo HiSafe 3 Plus (Perkin Elmer). Luego se mide la radioactividad de la alícuota en un contador de centelleo líquido.

En paralelo se cosechan las células de las otras 3 placas y se resuspenden en  $500 \mu\text{l}$  de buffer de lisis (10 mM tris, 1 mM EDTA, suplementado con una mezcla de Inhibidores de Proteasas (SIGMA)) y se sonicán 2 veces por 30 seg a potencia 1 en un sonicador de punta Brandson. La concentración de proteínas de estas muestras se determina por el método de BCA. Este valor se

emplea para normalizar los resultados de marcación total con  $^3\text{H}$ -Timidina, que se expresan como dpm  $^3\text{H}/\text{mg}$  Proteína.

### **A.5.5. - Diferenciación de células Caco-2**

La línea celular Caco-2, cómo ya se mencionó anteriormente, provienen de un carcinoma de colon humano y presentan muchas de las características de las células del epitelio intestinal. En particular, estas células expresan marcadores típicos de los enterocitos como por ejemplo la LFABP, disacaridasas, fosfatasa alcalina. Pero más notable es aún la capacidad que presentan de secretar complejos lipoprotéicos similares a las VLDL y los Quilomicrones. Los estudios morfológicos además muestran una distribución asimétrica de los componentes celulares, típica de una célula polarizada, con un ribete en cepillo en la región apical. Los cultivos confluentes también muestran la formación de prolongaciones de células apiladas como si fueran microvellosidades intestinales. Por último cabe destacar que estas células también forman uniones intercelulares estrechas o impermeables, lo que les permite formar una monocapa de permeabilidad selectiva sobre una superficie porosa.

Las características antes descriptas no son permanentes y para que sean expresadas en todo su potencial es necesario permitir que las células atraviesen un proceso de diferenciación celular, similar al que sufren los enterocitos en su camino desde el fondo de las criptas intestinales hasta la cima de las microvellosidades. Este fenómeno puede ser estimulado *in cultivo* por el mantenimiento de las células a una confluencia mayor al 100%. Sin embargo, para el mantenimiento de la línea celular, es aconsejable no permitir que las células alcancen la confluencia.

El protocolo general para inducir la diferenciación de las células Caco-2 consiste en tripsinizar placas o botellas con células preconfluentes y mezclarlas en un pool común. Las células se pelletean por centrifugación y se resuspenden en un volumen conocido previamente a contar su concentración como se explicó en la sección anterior. Las células se siembran a una densidad de 300%

(aproximadamente unas 300,000 células por  $\text{cm}^2$ ) en filtros transwell, a fin de promover su diferenciación. Al día siguiente se lavan con PBS las células que no se adhirieron y se cambia el medio estrictamente cada 48hs para evitar que se sobreacidifique. El proceso de diferenciación celular lleva aproximadamente unos 15-18 días y los experimentos deben realizarse dentro de la semana siguiente (entre los 18 y 21 días). Este proceso de diferenciación se lleva a cabo en celdas transwell, filtros sobre los que se crecen las células permitiendo el acceso independiente a la cara apical y basal de la monocapa y la medición de la resistividad eléctrica de la misma. De este modo, también se evita la formación de “domos” que aparecen en las placas comunes de cultivo por desprendimiento de una región de la monocapa debido a la acumulación de secreciones por la cara basolateral.

El proceso de diferenciación puede seguirse por varios métodos. El método enzimático más frecuente es la medición enzimática de disacaridasas, pero el más práctico y preciso consiste en la medición de la resistividad de la monocapa con un potenciómetro (ELS Voltimeter, Millipore), por lo que se empleó en cada experimento metabólico aquí descrito. Así, se observa un aumento de la resistividad medida con un electrodo a cada lado del filtro transwell cuando las células alcanzan una monocapa diferenciadas e inmediatamente antes del ensayo. Las celdas se lavan dos veces con PBS y se mide la resistividad que presenta cada monocapa. Se considera que las células se han diferenciado si se superan los  $250 \text{ Ohm.cm}^2$ , y sólo estas resultan aceptables para realizar el experimento.

#### **A.5.6. - Asimilación de ácidos grasos**

Para analizar el rol de la LFABP en la asimilación de FA, se realizaron incubaciones de monocapas diferenciadas para cada línea celular derivada de Caco-2 modificadas con cantidades crecientes de oleico o palmítico. Las células se incuban con FA marcados radioactivamente solubilizándolos en buffer PBS suplementado con 10 mM taurocolato y aplicándolo sólo en el compartimiento

apical de las transwell, para simular la llegada de nutrientes de la dieta desde la luz intestinal.

El seguimiento de los FA se lleva a cabo gracias a la incorporación de un 1-10% de FA marcado radioactivamente con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ , dependiendo del ensayo, en el medio de cultivo. Los compuestos marcados radioactivamente permiten el estudio dinámico de los procesos biológicos con un mínimo de perturbación del sistema. Por otra parte, la sensibilidad de los métodos de detección de radiotrazadores es mucho mayor que la de la mayoría de los otros procedimientos físicos y químicos, por lo que moléculas poco abundantes pueden ser detectadas con alto grado de confianza.

Luego de 20 seg de incubación, los filtros se pasan a una placa prelavada y que reposa en un baño de hielo. Las células se lavan dos veces con PBS con 1% Albúmina deslipidizada (SIGMA) en frío y 2 veces más con PBS solamente, para eliminar los restos de FA unidos a la monocapa pero no internalizados a la célula. Luego las células se cosechan raspando el filtro con un tip de punta roma con PBS frío suplementado con 0,1% Triton X-100 e inhibidores de proteasas, 3 veces con 365  $\mu\text{l}$  (total 1,0 ml) para los filtros de 0,33  $\text{cm}^2$ . Las muestras se homogenizan por pipeteo y se separan 2 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  para determinar la concentración de proteínas por duplicado. Una tercera alícuota de 500  $\mu\text{l}$  se utiliza para medir la radioactividad presente en el homogenato agregándole 3 ml de líquido de centelleo en un contador Wallac (modelo 1214 Rackbeta).

Los resultados se expresan como dpm/mg/20 seg o nmol Oleato/mg/20 seg, y se grafica una curva de velocidad de asimilación en función de la concentración de FA, que se ajusta a una ecuación tipo Michaelis-Menten, de la cual se obtienen los parámetros de  $V_{\text{max}}$  y la afinidad aparente ( $K_M$ ) de la célula por cada FA.

### **A.5.7. - Distribución y Metabolismo de FA**

Una vez asimilados desde la cara apical, los FA pueden tener varios destinos metabólicos distintos, ya sea ser degradados en la mitocondria o incorporados a glicéridos para formar parte de membranas o almacenarse como reserva energética. Para analizar el rol de la LFABP en esta distribución de los FA entre sus posibles destinos se repite el ensayo de asimilación pero en celdas transwell de 35 mm de diámetro (9.6cm<sup>2</sup>) para obtener suficiente masa para el ensayo. En este caso, a partir del homogenato (3x500 ul, 1,5ml total en este caso), se toma una fracción de 1 ml para realizar la extracción de lípidos totales. Los 500 µl restantes se emplean para cuantificar proteínas y el resto se reserva para WesternBlots o mediciones enzimáticas. Los lípidos extraídos se resuelven por Cromatografía en Capa Fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) y se analiza la radioactividad de cada familia de lípidos para estudiar el metabolismo que sufre el FA.

#### **A.5.7.1. - Extracción de lípidos totales**

La extracción de los lípidos totales de las células se realiza siguiendo el método descrito originalmente en Bligh & Dyer en 1959 (*Bligh, Can J Biochem Physiol. 1959*); con pequeñas modificaciones. Esencialmente, las monocapas de células se lavan con buffer PBS frío con 1% Albúmina deslipidizada dos veces y dos veces más sólo con PBS frío, para eliminar los FA marcados que pudieran quedar adsorbidos a la superficie celular. Las células se cosechan raspando como se describió en la sección 6.2.10., pero obteniendo un volumen final de 1,5ml de homogenato.

Una alícuota de 1 ml de homogenato se coloca en un tubo de vidrio con tapa de teflón en hielo. La mezcla de solventes para la extracción se completa con el agregado de 4ml de Metanol frío (-20°C) y 2ml de Cloroformo (Solución de Bligh & Dyer Metanol:Cloroformo:H<sub>2</sub>O 2:1:0,5 por volúmenes), se mezcla bien y se realiza la extracción toda la noche a -20°C. Este sistema de solventes asegura una buena extracción de los lípidos celulares debido a que es lo suficientemente apolar como para que los lípidos se disuelvan y, al mismo tiempo, tan polar como

para vencer las fuertes fuerzas de asociación entre los lípidos y otros constituyentes celulares como las proteínas. A continuación, al extracto se le agregan 1 ml de Cloroformo y 1 ml de agua bidestilada para particionar el sistema y poder eliminar los contaminantes no lipídicos junto con la fase acuosa. El sistema turbio debe ser clarificado previamente por centrifugación durante 5 min a 3000 rpm, y luego se aspira la fase acuosa (superior) en una trampa de vacío. La fase clorofórmica (inferior), que contiene los lípidos purificados, se pasa a un tubo de vidrio con tapa de teflón limpio y se lleva a sequedad por evaporación en una centrífuga concentradora con trampa de vapores Speed Vac SC110 (Savant). Los lípidos luego son resuspendidos en un volumen conocido de Cloroformo (normalmente 500ul) y una alícuota de 50  $\mu$ l se seca en un vial de centelleo para contar la incorporación de marca en la fracción de lípidos totales.

#### **A.5.7.2. - Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica simple que sirve para separar lípidos de acuerdo a su afinidad relativa por un adsorbente polar (fase estacionaria) y un sistema de solventes (fase móvil). Tanto el adsorbente como el sistema de solventes utilizados son escogidos de acuerdo al tipo de lípidos que se desea separar. En este trabajo de tesis sólo se recurrió a la separación de las distintas familias de lípidos neutros que denotan los posibles destinos anabólicos que pueden sufrir los FA incorporados desde la dieta. Así, los distintos lípidos neutros se separan de la fracción original de lípidos polares totales mediante el sistema de solventes hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:2, en volúmenes).

Para ello, se concentran los 450  $\mu$ l restantes de la muestra clorofórmica de lípidos totales a 50-100  $\mu$ l y se siembran puntualmente, gota a gota, en la línea de siembra (a 2-3 cm del borde inferior) de una placa de TLC 51250 (J.T.Baker Cat# 7000-04) activada durante 30-60 min en estufa. Mientras tanto, se satura la cuba en los vapores de la mezcla de corrida (no más de 60 ml). Las cromatografías se realizan de modo unidireccional permitiendo a la mezcla de solventes ascender por capilaridad hasta 1 ó 2 cm del borde superior.

La detección de las especies lipídicas se realiza por tinción en una cámara con vapores de yodo y se detectan por comparación con una mezcla de estándares puros corridos en paralelo. Las manchas de Yodo se refieren a una de las cinco familias de lípidos, Fosfolípidos (PL), Ácidos Grasos (FA), Diacilglicerol (DG), Triacilglicéridos (TG) o Ésteres de Colesterol (CE). Vale la pena mencionar que el Diacilglicerol corre casi a la misma altura que Colesterol libre, pero en los tiempos cortos de los ensayos antes mencionados no se observa marca significativa proveniente del metabolismo de los FA en el colesterol.

Para medir la radioactividad presente en cada familia de lípidos se pueden emplear dos técnicas de acuerdo al radioisótopo empleado. Por un lado, algunos de los ensayos con  $^{14}\text{C}$  se leyeron en un equipo PhosphorImager Storm 840 (Amersham/GE) impresionando un *screen* con la placa de TLC (envuelta en parafilm) por 24hs y obteniendo una imagen del perfil de radioactividad de la placa completa. La imagen luego es analizada por el software provisto con el equipo. Cuando esto no fue posible, o en el caso de emplear  $^3\text{H}$  en el ensayo, las manchas de yodo se rasparon de la placa de TLC, se resuspendieron vigorosamente por vortex en 3 ml de líquido de centelleo HiSafe3 Plus (Perkin Elmer) y se contaron al día siguiente en un contador de centelleo. Los PL se recuperan de la sílica gel por extracción con 2 volúmenes de 1 ml cloroformo:metanol:agua (5:5:1 por vol.) y los lípidos neutros con metanol:cloroformo:hexano (1:1:2 por vol.).

Los resultados se expresan como porcentajes de la radioactividad total en la muestra para cada grupo de lípidos. Por otro lado, con el dato de la actividad específica del medio de incubación y los datos de radioactividad en lípidos totales y de mg por proteína es posible calcular los pmoles de FA incorporados en cada familia por mg de proteína en el tiempo del ensayo.

## **A.6. - Análisis estadísticos.**

Los experimentos se realizaron cómo mínimo por triplicado en forma independiente, cambiando al menos la preparación o stock de algún componente en cada caso. En el caso de no haberse realizado tres medidas independientes, se lo ha indicado convenientemente. Los resultados se expresan como las medias con sus respectivos errores estándar (SEM). Las diferencias entre las mismas son analizadas estadísticamente empleando el test “*t*” de Student para comparar dos condiciones puntuales. En las regresiones lineales, las tendencias se evalúan por el coeficiente de correlación. En los casos en que se necesita comparar tendencias se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Los límites de confianza utilizados se señalan para cada experimento, pero nunca fueron menores al 95%.







## Bibliografía:

- Abumrad NA, Perkins RC, Park JH, Park CR. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem*. 1981 Sep 10;256(17):9183-91.
- Adamski J, Normand T, Leenders F, Monté D, Begue A, Stéhelin D, Jungblut PW, de Launoit Y. Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem J*. 1995 Oct 15;311 ( Pt 2):437-43.
- Agellon LB, Drozdowski L, Li L, Iordache C, Luong L, Clandinin MT, Uwiera RR, Toth MJ, Thomson AB. Loss of intestinal fatty acid binding protein increases the susceptibility of male mice to high fat diet-induced fatty liver. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Oct;1771(10):1283-8. Epub 2007 Aug 22.
- Agellon LB, Li L, Luong L, Uwiera RR. Adaptations to the loss of intestinal fatty acid binding protein in mice. *Mol Cell Biochem*. 2006 Mar;284(1-2):159-66.
- Agellon LB, Toth MJ, Thomson AB. Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem*. 2002 Oct;239(1-2):79-82. Review.
- Ali-Khan SE, Hales BF. Retinoid receptor antagonists alter the pattern of apoptosis in organogenesis stage mouse limbs. *Toxicol Sci*. 2006 Mar;90(1):208-20.
- Alvite G, Di Pietro SM, Santomé JA, Ehrlich R, Esteves A. Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 31;1533(3):293-302.
- Anantharamaiah GM, *The Amphipathic Helix* 1993, CRC Press, Boca Raton, FL
- Anthony ML, Zhao M, Brindle KM. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19686-92.
- Antonenkov VD, Sormunen RT, Ohlmeier S, Amery L, Fransen M, Mannaerts GP, Hiltunen JK. Localization of a portion of the liver isoform of fatty-acid-binding protein (L-FABP) to peroxisomes. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(Pt 2):475-84.
- Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer S.M. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2004, 18(1):146-8.
- Atshaves BP, Foxworth WB, Frolov A, Roths JB, Kier AB, Oetama BK, Piedrahita JA, Schroeder F. Cellular differentiation and I-FABP protein expression modulate fatty acid uptake and diffusion. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 1):C633-44.
- Baburina I, Jackowski S. Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2169-73.
- Bagnato C, Igal R.A. Overexpression of diacylglycerol acyltransferase-1 reduces phospholipid synthesis, proliferation, and invasiveness in simian virus 40-transformed human lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 2003, 278(52):52203-11.
- Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC. A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):10892-6.
- Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995 Mar;95(3):1281-7.
- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem*. 1994;45:89-151.

- Barnes TM, Jin Y, Horvitz HR, Ruvkun G, Hekimi S. The *Caenorhabditis elegans* behavioral gene *unc-24* encodes a novel bipartite protein similar to both erythrocyte band 7.2 (stomatin) and nonspecific lipid transfer protein. *J Neurochem*. 1996 Jul;67(1):46-57.
- Barth, G., and C. Gaillardin. 1996. *Yarrowia lipolytica*, p. 313–388. In W. K. Wolf (ed.), *Nonconventional yeasts in biotechnology*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Bass NM. Fatty acid-binding protein expression in the liver: its regulation and relationship to the zonation of fatty acid metabolism. *Mol Cell Biochem*. 1990 Oct 15-Nov 8;98(1-2):167-76. Review.
- Bass NM. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. *Chem Phys Lipids*. 1985 Aug 30;38(1-2):95-114.
- Bass NM. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol*. 1988;111:143-84. Review.
- Bell RM, Coleman RA. Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:459-87.
- Black SL, Stanley WA, Filipp FV, Bhairo M, Verma A, Wichmann O, Sattler M, Wilmanns M, Schultz C. Probing lipid- and drug-binding domains with fluorescent dyes. *Bioorg Med Chem*. 2008 Feb 1;16(3):1162-73.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7.
- Boggs KP, Rock CO, Jackowski S. Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *J Biol Chem*. 1995 May 12;270(19):11612-8.
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*. 2008 Sep 19;134(6):933-44.
- Carlsson M, Orho-Melander M, Hedenbro J, Almgren P, Groop LC. The T54 Allele of the Intestinal Fatty Acid-Binding protein 2 is associated with a parental history of stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Aug;85(8):2801-4
- Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusic AJ, Erickson SK, Farese RV Jr. Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13018-23.
- Cases S, Stone SJ, Zhou P, Yen E, Tow B, Lardizabal KD, Voelker T, Farese RV Jr. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38870-6.
- Caviglia J.M, de Gomez Dumm I.N, Coleman R.A, Igal R.A. Phosphatidylcholine deficiency upregulates enzymes of triacylglycerol metabolism in CHO cells. *J Lipid Res*. 2004, 45(8):1500-1509.
- Chan L, Wei CF, Li WH, Yang CY, Ratner P, Pownall H, Gotto AM Jr, Smith LC. Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications. *J Biol Chem*. 1985 Mar 10;260(5):2629-32.
- Charlton SC, Smith LC. Kinetics of transfer of pyrene and *rac*-1-oleyl-2-[4-(3-pyrenyl)butanoyl]glycerol between human plasma lipoproteins. *Biochemistry*. 1982 Aug 17;21(17):4023-30.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1866-70.
- Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*. 2006;47(1):39-48.
- Choinowski T, Hauser H, Piontek K. Structure of sterol carrier protein 2 at 1.8 Å resolution reveals a hydrophobic tunnel suitable for lipid binding. *Biochemistry*. 2000 Feb 29;39(8):1897-902.

- Cistola DP, Kim K, Rogl H, Frieden C. Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochemistry*. 1996 Jun 11;35(23):7559-65.
- Clement JM, Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase: insights into regulatory mechanisms and novel functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 21;257(3):643-50.
- Clérico EM, Peisajovich SG, Ceolín M, Ghiringhelli PD, Ermácora MR. Engineering a compact non-native state of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Feb 9;1476(2):203-18.
- Cnop M., Hannaert J.C., Hoorens A., Eizirik D.L., and Pipeleers D.G. Inverse Relationship Between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation. *Diabetes*, 2001, 50:1771-1777.
- Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*. 2004 Mar;43(2):134-76.
- Constantinides PP, Steim JM. Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape. *J Biol Chem*. 1985 Jun 25;260(12):7573-80.
- Cornell RB, Horwitz AF. Apparent coordination of the biosynthesis of lipids in cultured cells: its relationship to the regulation of the membrane sterol:phospholipid ratio and cell cycling. *J Cell Biol*. 1980 Sep;86(3):810-9.
- Corsico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13;95(21):12174-8.
- Corsico B, Franchini GR, Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J Lipid Res*. 2005 Aug;46(8):1765-72.
- Corsico B, Liou HL, Storch J. The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry*. 2004 Mar 30;43(12):3600-7.
- Córscico B, Toledo JD, Garda HA. Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):16978-85.
- Cupp D, Kampf JP, Kleinfeld AM. Fatty acid-albumin complexes and the determination of the transport of long chain free fatty acids across membranes. *Biochemistry*. 2004 Apr 20;43(15):4473-81.
- Dai J, Xie Y, Wu Q, Wang L, Yin G, Ye X, Zeng L, Xu J, Ji C, Gu S, Huang Q, Zhao RC, Mao Y. Molecular cloning and characterization of a novel human hydroxysteroid dehydrogenase-like 2 (HSDL2) cDNA from fetal brain. *Biochem Genet*. 2003 Jun;41(5-6):165-74.
- Darimont C, Gradoux N, Cumin F, Baum HP, De Pover A. Differential regulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in human intestinal cell line (Caco-2): role of collagen. *Exp Cell Res*. 1998 Nov 1;244(2):441-7.
- Darimont C, Gradoux N, Persohn E, Cumin F, De Pover A. Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J Lipid Res*. 2000 Jan;41(1):84-92.
- de Vries J. E., Vork M. M., Roemen T. H. M., de Jong Y. F., Cleutjens J. P. M., van der Vusse G. J., and van Bilsen M. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Lipid Res.*, 1997, 38:1384-1394.
- Dell'Angelica EC, Ermácora MR, Santomé JA. Purification and partial characterization of a fatty acid-binding protein from the yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Mol Biol Int*. 1996 Jun;39(3):439-45.
- Dell'Angelica EC, Stella CA, Ermácora MR, Ramos EH, Santome JA. Study on fatty acid binding by proteins in yeast. Dissimilar results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica*. *Comp Biochem Physiol B*. 1992 Jun;102(2):261-5.

- Dell'Angelica EC, Stella CA, Ermácora MR, Santomé JA, Ramos EH. Inhibitory action of palmitic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol* (Praha). 1993;38(6):486-90.
- Demoulin JB, Ericsson J, Kallin A, Rorsman C, Rönnstrand L, Heldin CH. Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35392-402.
- Di Pietro SM, Córscico B, Perduca M, Monaco HL, Santomé JA. Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry*. 2003 Jul 15;42(27):8192-203.
- Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003 Jan 7;2:10.
- Doody MC, Pownall HJ, Kao YJ, Smith LC. Mechanism and kinetics of transfer of a fluorescent fatty acid between single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*. 1980 Jan 8;19(1):108-16.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin M.E, Dufour S, Cline G.W, Slezak L.A, Andersen D.K, Hundal R.S, Rothman D.L, Petersen K.F, Shulman G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999, 103(2):253-9.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 2004 Jul 1;430(6995):35-44.
- Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*. 2000 Oct 6;275(40):30749-52
- Durrer P, Galli C, Hoenke S, Corti C, Glück R, Vorherr T, Brunner J. H<sup>+</sup>-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *J Biol Chem*. 1996 Jun 7;271(23):13417-21.
- Durrer P, Gaudin Y, Ruigrok RW, Graf R, Brunner J. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17575-81.
- Dyer DH, Wessely V, Forest KT, Lan Q. Three-dimensional structure/function analysis of SCP-2-like2 reveals differences among SCP-2 family members. *J Lipid Res*. 2008 Mar;49(3):644-53.
- Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger H.M, Spinas G.A, Donath M.Y. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*, 2001, 50(9):2105-13.
- Edqvist J, Blomqvist K. Fusion and fission, the evolution of sterol carrier protein-2. *J Mol Evol*. 2006 Mar;62(3):292-306.
- Edqvist J, Rönnberg E, Rosenquist S, Blomqvist K, Viitanen L, Salminen TA, Nylund M, Tuuf J, Mattjus P. Plants express a lipid transfer protein with high similarity to mammalian sterol carrier protein-2. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):53544-53.
- Enoch HG, Catalá A, Strittmatter P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem*. 1976 Aug 25;251(16):5095-103.

- Erol E, Kumar LS, Cline GW, Shulman GI, Kelly DP, Binas B. Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPARalpha in fasting mice. *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):347-9.
- Falomir-Lockhart LJ, Laborde L, Kahn PC, Storch J, Córscico B. Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process. *J Biol Chem.* 2006 May 19;281(20):13979-89.
- Ferreyra RG, Burgardt NI, Milikowski D, Melen G, Kornblihtt AR, Dell' Angelica EC, Santomé JA, Ermácora MR. A yeast sterol carrier protein with fatty-acid and fatty-acyl-CoA binding activity. *Arch Biochem Biophys.* 2006 Sep 15;453(2):197-206. Epub 2006 Jul 21.
- Fickers P, Benetti PH, Waché Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, Nicaud JM. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 2005 Apr;5(6-7):527-43.
- Fickers P, Nicaud JM, Gaillardin C, Destain J, Thonart P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Appl Microbiol.* 2004;96(4):742-9.
- Field C.J, Ryan E.A, Thomson A.B, Clandinin M.T. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. *J Biol Chem.* 1990, 265(19):11143-50.
- Finney RE, Nudelman E, White T, Bursten S, Klein P, Leer LL, Wang N, Waggoner D, Singer JW, Lewis RA. Pharmacological inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is associated with induction of phosphatidylinositol accumulation and cytolysis of neoplastic cell lines. *Cancer Res.* 2000 Sep 15;60(18):5204-13.
- Finstad H. S., Drevon C. A., Kulseth M. A., Synstad A. V., Knudsen E. and Kolset S. O. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.*, 1998, 336:451-459.
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Jul;59(1):221-6 Review.
- Franchini GR, Storch J, Corsico B. The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1781(4):192-9.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A manual of basic techniques.* Ed. Wiley-Liss. 2000 4ta Edición.
- Frieden C, Jiang N, Cistola DP. Intestinal fatty acid binding protein: folding of fluorescein-modified proteins. *Biochemistry.* 1995 Feb 28;34(8):2724-30.
- Friedman R, Nachliel E, Gutman M. Fatty acid binding proteins: same structure but different binding mechanisms? Molecular dynamics simulations of intestinal fatty acid binding protein. *Biophys J.* 2006 Mar 1;90(5):1535-45.
- Friedman R, Nachliel E, Gutman M. Molecular dynamics simulations of the adipocyte lipid binding protein reveal a novel entry site for the ligand. *Biochemistry.* 2005 Mar 22;44(11):4275-83.
- Frolov A, Cho TH, Billheimer JT, Schroeder F. Sterol carrier protein-2, a new fatty acyl coenzyme A-binding protein. *J Biol Chem.* 1996 Dec 13;271(50):31878-84.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.
- Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog Lipid Res.* 2001 Nov;40(6):498-563.
- Gangl A, Ockner RK. Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J Clin Invest.* 1975 Apr;55(4):803-13.
- Garner J, Durrer P, Kitchen J, Brunner J, Croke E. Membrane-mediated release of nucleotide from an initiator of chromosomal replication, *Escherichia coli* DnaA, occurs with insertion of a distinct region of the protein into the lipid bilayer. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5167-73.

- Georgopoulos A, Aras O, Tsai MY. Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2000 Sep;85(9):3155-60
- Gericke A, Smith ER, Moore DJ, Mendelsohn R, Storch J. Adipocyte fatty acid-binding protein: interaction with phospholipid membranes and thermal stability studied by FTIR spectroscopy. Biochemistry. 1997 Jul 8;36(27):8311-7.
- Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y, Lodish HF, Stahl A. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. J Biol Chem. 2003 May 2;278(18):16039-44.
- Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. Prog Lipid Res. 1996 Sep;35(3):243-82.
- Glatz JF, Veerkamp JH. Removal of fatty acids from serum albumin by Lipidex 1000 chromatography. J Biochem Biophys Methods. 1983 Aug;8(1):57-61.
- Golfman LS, Bakovic M, Vance DE. Transcription of the CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha gene is enhanced during the S phase of the cell cycle. J Biol Chem. 2001 Nov 23;276(47):43688-92.
- Gomez LC, Real SM, Ojeda MS, Gimenez S, Mayorga LS, Roqué M. Polymorphism of the FABP2 gene: a population frequency analysis and an association study with cardiovascular risk markers in Argentina. BMC Med Genet. 2007 Jun 26;8:39
- Gomori GA. modification of colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. J Lab Clin Med 1942; 27: 955-960.
- Gould R.J, Ginsberg B.H, Spector A.A. Lipid effects on the binding properties of a reconstituted insulin receptor. J Biol Chem., 1982, 257(1):477-84.
- Halldén G, Aponte GW. Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. J Biol Chem. 1997 May 9;272(19):12591-600.
- Hamilton JA. 2004 Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us. Prog Lipid Res. 2004 May;43(3):177-99.
- Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. J Biol Chem. 2002 Jul 19;277(29):25847-50.
- Hardy S., El-Assaad W., Przybytkowski E., Joly E., Prentki M., and Langeliers Y. Saturated Fatty Acid-induced Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. A Role for Cardiolipin. J. Biol. Chem., 2003, 278(34):31861-31870.
- Hardy S., Langelier Y., and Prentki M. Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects. Cancer Res., 2000, 60:6353-6358.
- Haunerland NH, Chisholm JM. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schistocerca gregaria*. Biochim Biophys Acta. 1990 Dec 4;1047(3):233-8.
- Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. Prog Lipid Res. 2004 Jul;43(4):328-49.
- He Y, Yang X, Wang H, Estephan R, Francis F, Kodukula S, Storch J, Stark RE. Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein. Biochemistry. 2007 Nov 6;46(44):12543-56.
- Hennig M, Darimont B, Sterner R, Kirschner K, Jansonius JN. 2.0 Å structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*: possible determinants of protein stability. Structure. 1995 Dec 15;3(12):1295-306.
- Herr FM, Aronson J, Storch J. Role of portal region lysine residues in electrostatic interactions between heart fatty acid binding protein and phospholipid membranes. Biochemistry. 1996 Jan 30;35(4):1296-303.

- Herr FM, Li E, Weinberg RB, Cook VR, Storch J. Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9556-63.
- Herr FM, Matarese V, Bernlohr DA, Storch J. Surface lysine residues modulate the collisional transfer of fatty acid from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry*. 1995 Sep 19;34(37):11840-5.
- Hertzfel AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Jul;11(5):175-80
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 1988 Aug 11;16(15):7351-67.
- Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK, Kastaniotis AJ, Gurvitz A. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Apr;27(1):35-64. Review.
- Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1875-8.
- Ho SY, Delgado L, Storch J. Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1816-23.
- Hodsdon ME, Cistola DP. Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry*. 1997 Feb 11;36(6):1450-60.(b)
- Hodsdon ME, Cistola DP. Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by 15N NMR relaxation and 1H exchange. *Biochemistry*. 1997 Feb 25;36(8):2278-90. (a)
- Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B. Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Jan 29;1021(2):217-26.
- Hsu KT, Storch J. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem*. 1996 Jun 7;271(23):13317-23.
- Huang H, Ball JM, Billheimer JT, Schroeder F. Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature. *Biochem J*. 1999 Dec 1;344 Pt 2:593-603.
- Huang H, Gallegos AM, Zhou M, Ball JM, Schroeder F. Role of the sterol carrier protein-2 N-terminal membrane binding domain in sterol transfer. *Biochemistry*. 2002 Oct 8;41(40):12149-62.
- Huelsenbeck JP, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*. 1997 Apr 11;276(5310):227-32.
- Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ. Regulation of intestinal apolipoprotein B synthesis and secretion by Caco-2 cells. Lack of fatty acid effects and control by intracellular calcium ion. *J Biol Chem*. 1988 Mar 5;263(7):3425-31.
- Hwang CW, Yano K, Takagi M. Sequences of two tandem genes regulated by carbon sources, one being essential for n-alkane assimilation in *Candida maltosa*. *Gene*. 1991 Sep 30;106(1):61-9.
- Igal R.A, Coleman R.A. Acylglycerol recycling from triacylglycerol to phospholipid, not lipase activity, is defective in neutral lipid storage disease fibroblasts. *J Biol Chem*. 1996, 271(28):16644-51.
- Jackowski S, Fagone P. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem*. 2005 Jan 14;280(2):853-6.
- Jackowski S. Coordination of membrane phospholipid synthesis with the cell cycle. *J Biol Chem*. 1994 Feb 4;269(5):3858-67.

- Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8695-9.
- Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1996 Jun;47:627-654.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):473-81.
- Kajander T, Kahn PC, Passila SH, Cohen DC, Lehtiö L, Adolfsen W, Warwicker J, Schell U, Goldman A. Buried charged surface in proteins. *Structure*. 2000 Nov 15;8(11):1203-14.
- Kawashima T, Amano N, Koike H, Makino S, Higuchi S, Kawashima-Ohya Y, Watanabe K, Yamazaki M, Kanehori K, Kawamoto T, Nunoshiba T, Yamamoto Y, Aramaki H, Makino K, Suzuki M. Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14257-62.
- Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Sep 4;1348(1-2):79-90.
- Kim HK, Storch J. Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles. Effect of ligand and solution properties. *J Biol Chem*. 1992 Jan 5;267(1):77-82. (a)
- Kim HK, Storch J. Mechanism of free fatty acid transfer from rat heart fatty acid-binding protein to phospholipid membranes. Evidence for a collisional process. *J Biol Chem*. 1992 Oct 5;267(28):20051-6. (b)
- Kim K, Cistola DP, Frieden C. Intestinal fatty acid-binding protein: the structure and stability of a helix-less variant. *Biochemistry*. 1996 Jun 11;35(23):7553-8.
- King M.E, Spector A.A. Effect of specific fatty acyl enrichments on membrane physical properties detected with a spin label probe. *J Biol Chem*, 1978, 253(18):6493-501.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635-43.
- Kragelund BB, Knudsen J, Poulsen FM. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim Biophys Acta*. 1999 Nov 23;1441(2-3):150-61. Review.
- Kragelund BB, Knudsen J, Poulsen FM. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim Biophys Acta*. 1999 Nov 23;1441(2-3):150-61. Click here to read
- Krebs KC, Lan Q. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2003 Feb;12(1):51-60.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lan Q, Wessely V. Expression of a sterol carrier protein-x gene in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2004 Oct;13(5):519-29.
- Le Beyec J, Delers F, Jourdan F, Schreider C, Chambaz J, Cardot P, Pinçon-Raymond M. A complete epithelial organization of Caco-2 cells induces I-FABP and potentializes apolipoprotein gene expression. *Exp Cell Res*. 1997 Oct 10;236(1):311-20.
- Ledoux S, Runembert I, Koumanov K, Michel J.B, Trugnan G, Friedlander G. Hypoxia enhances Ecto-5'-Nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: role of membrane lipids. *Circ Res*, 2003, 92(8):848-55.
- Lee B, Richards FM. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol*. 1971 Feb 14;55(3):379-400.
- Leenders F, Dolez V, Begue A, Möller G, Gloeckner JC, de Launoit Y, Adamski J. Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *Mamm Genome*. 1998 Dec;9(12):1036-41.
- Lehner R, Kuksis A. Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog Lipid Res*. 1996;35(2):169-201.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger's Principles of Biochemistry* W. H. Freeman and Co. New York USA. 2005. Fourth Edition

- Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J*. 1995 May;9(8):626-35. Review.
- Li E, Norris AW. Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:205-34.
- LiCata VJ, Bernlohr DA. Surface properties of adipocyte lipid-binding protein: Response to lipid binding, and comparison with homologous proteins. *Proteins*. 1998 Dec 1;33(4):577-89.
- Likić VA, Juranić N, Macura S, Prendergast FG. A "structural" water molecule in the family of fatty acid binding proteins. *Protein Sci*. 2000 Mar;9(3):497-504.
- Likić VA, Prendergast FG. Dynamics of internal water in fatty acid binding protein: computer simulations and comparison with experiments. *Proteins*. 2001 Apr 1;43(1):65-72.
- Liou HL, Kahn PC, Storch J. Role of the helical domain in fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid-binding proteins to membranes: analysis of chimeric proteins. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1806-15.
- Liou HL, Storch J. Role of surface lysine residues of adipocyte fatty acid-binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 2001 May 29;40(21):6475-85.
- Listenberger L. L., Han X., Lewis S. E., Cases S., Farese R. V. Jr, Ory D. S., and Schaffer, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2003, 100(6): 3077-3082.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Luchoomun J, Hussain MM. Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19565-72.
- Luchoomun J, Zhou Z, Bakillah A, Jamil H, Hussain MM. Assembly and secretion of VLDL in nondifferentiated Caco-2 cells stably transfected with human recombinant ApoB48 cDNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):2955-63.
- Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*, 2002, 51(5):1437-42.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
- Luxon BA, Weisiger RA. Sex differences in intracellular fatty acid transport: role of cytoplasmic binding proteins. *Am J Physiol*. 1993 Nov;265(5 Pt 1):G831-41.
- Maedler K., Spinas G. A., Dytar D., Moritz W., Kaiser N., and Donath M. Y. Distinct Effects of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on b-Cell Turnover and Function. *Diabetes*, 2001, 50:69-76.
- Maggio B. Geometric and thermodynamic restrictions for the self-assembly of glycosphingolipid-phospholipid systems. *Biochim Biophys Acta*. 1985 May 14;815(2):245-58.
- Martin GG, Danneberg H, Kumar LS, Atshaves BP, Erol E, Bader M, Schroeder F, Binas B. Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem*. 2003 Jun 13;278(24):21429-38.
- Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Tichy SE, Williams BJ, Russell DH, Berg JM, Spencer TA, Ball J, Kier AB, Schroeder F. Structure and function of the sterol carrier protein-2 N-terminal presequence. *Biochemistry*. 2008 Jun 3;47(22):5915-34.
- Massey JB, Bick DH, Pownall HJ. Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys J*. 1997 Apr;72(4):1732-43.
- Maté SM, Brenner RR, Ves-Losada A. Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004 Jan;70(1):49-57.

- Maté SM, Layerenza JP, Ves-Losada A. Incorporation of arachidonic and stearic acids bound to L-FABP into nuclear and endonuclear lipids from rat liver cells. *Lipids*. 2007 Jul;42(7):589-602.
- Matsuoka S, Saito T, Kuwayama H, Morita N, Ochiai H, Maeda M. MFE1, a member of the peroxisomal hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase family, affects fatty acid metabolism necessary for morphogenesis in Dictyostelium spp. *Eukaryot Cell*. 2003 Jun;2(3):638-45.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hastay AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S, Yamada N. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res*. 2002 Jun;43(6):911-20.
- Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):25843-6.
- Miller DM 3rd, Olson JS, Pflugrath JW, Quioco FA. Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem*. 1983 Nov 25;258(22):13665-72.
- Miquel K, Pradines A, Tercé F, Selmi S, Favre G. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Biol Chem*. 1998 Oct 2;273(40):26179-86.
- Mishkin S, Stein L, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM. Z protein in hepatic uptake and esterification of long-chain fatty acids. *Am J Physiol*. 1975 Jun;228(6):1634-40.
- Mishkin S, Stein L, Gatmaitan Z, Arias IM. The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 Jun 9;47(5):997-1003.
- Mishra R., Simonson M. S. Saturated free fatty acids and apoptosis in microvascular mesangial cells: palmitate activates pro-apoptotic signaling involving caspase 9 and mitochondrial release of endonuclease G. *Cardiovasc Diabetol.*, 2005, 4(1):2
- Mlíčková K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T, Nicaud JM. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Jul;70(7):3918-24.
- Montoudis A, Delvin E, Menard D, Beaulieu JF, Jean D, Tremblay E, Bendayan M, Levy E. Intestinal-fatty acid binding protein and lipid transport in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 6;339(1):248-54
- Morley S, Cecchini M, Zhang W, Virgulti A, Noy N, Atkinson J, Manor D. Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):17797-804.
- Murota K, Matsui N, Kawada T, Takahashi N, Fushiki T. Inhibitory effect of monoacylglycerol on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001 Jun;65(6):1441-3.
- Murota K, Storch J. Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *J Nutr*. 2005 Jul;135(7):1626-30.
- Nakamura MT, Nara TY. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Feb;68(2):145-50.
- Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, Gheyi T, Storch J, Mansbach CM 2nd. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):17974-84.
- Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW, Davidson NO. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51664-72.

- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 1972 Jul 7;177(43):56-8.
- Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest*. 1974 Aug;54(2):326-38.
- Ogretmen B, Kraveka JM, Schady D, Usta J, Hannun YA, Obeid LM. Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J Biol Chem*. 2001 Aug 31;276(35):32506-14.
- Ohba T, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF 3rd. Human sterol carrier protein x/sterol carrier protein 2 gene has two promoters. *Biochemistry*. 1995 Aug 22;34(33):10660-8.
- Ohba T, Rennert H, Pfeifer SM, He Z, Yamamoto R, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF 3rd. The structure of the human sterol carrier protein X/sterol carrier protein 2 gene (SCP2). *Genomics*. 1994 Nov 15;24(2):370-4.
- Otera H, Setoguchi K, Hamasaki M, Kumashiro T, Shimizu N, Fujiki Y. Peroxisomal targeting signal receptor Pex5p interacts with cargoes and import machinery components in a spatiotemporally differentiated manner: conserved Pex5p WXXXF/Y motifs are critical for matrix protein import. *Mol Cell Biol*. 2002 Mar;22(6):1639-55.
- Page K, Lange Y. Cell adhesion to fibronectin regulates membrane lipid biosynthesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1997 Aug 1;272(31):19339-42.
- Papanikolaou S, Aggelis G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*. 2002 Mar;82(1):43-9.
- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Mar;58(3):308-12.
- Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Chevalot I, Komaitis M, Marc I, Aggelis G. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Curr Microbiol*. 2006 Feb;52(2):134-42.
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol*. 2002;92(4):737-44.
- Pelech SL, Vance DE. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Jun 25;779(2):217-51.
- Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januskiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem*. 2003 Oct;36(7):529-35.
- Piantedosi R, Ghyselinck N, Blaner WS, Vogel S. Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24286-92.
- Poirier H, Niot I, Degrace P, Monnot MC, Bernard A, Besnard P. Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *Am J Physiol*. 1997 Aug;273(2 Pt 1):G289-95.
- Pratley RE, Baier L, Pan DA, Salbe AD, Storlien L, Ravussin E, Bogardus C. Effects of an Ala54Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein on responses to dietary fat in humans. *J Lipid Res*. 2000 Dec;41(12):2002-8.
- Prows DR, Murphy EJ, Moncecchi D, Schroeder F. Intestinal fatty acid-binding protein expression stimulates fibroblast fatty acid esterification. *Chem Phys Lipids*. 1996 Nov 1;84(1):47-56.
- Prows DR, Murphy EJ, Schroeder F. Intestinal and liver fatty acid binding proteins differentially affect fatty acid uptake and esterification in L-cells. *Lipids*. 1995 Oct;30(10):907-10.
- Ramachandran GN, Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv Protein Chem*. 1968;23:283-438. Review.

- Requena N, Füller P, Franken P. Molecular characterization of GmFOX2, an evolutionarily highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, down-regulated during interaction with rhizobacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 1999 Oct;12(10):934-42.
- Richards FM. Calculation of molecular volumes and areas for structures of known geometry. *Methods Enzymol.* 1985;115:440-64.
- Richards FM. The interpretation of protein structures: total volume, group volume distributions and packing density. *J Mol Biol.* 1974 Jan 5;82(1):1-14.
- Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem.* 1994 Sep 30;269(39):23918-30.
- Sacchettini JC, Gordon JI, Banaszak LJ. Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the *Escherichia coli*-derived protein with bound palmitate. *J Mol Biol.* 1989 Jul 20;208(2):327-39.
- Sacchettini JC, Gordon JI, Banaszak LJ. Refined apoprotein structure of rat intestinal fatty acid binding protein produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):7736-40.
- Sacchettini JC, Scapin G, Gopaul D, Gordon JI. Refinement of the structure of *Escherichia coli*-derived rat intestinal fatty acid binding protein with bound oleate to 1.75-Å resolution. Correlation with the structures of the apoprotein and the protein with bound palmitate. *J Biol Chem.* 1992 Nov 25;267(33):23534-45.
- Salguero ML, Leon RE, Santos A, Roman S, Segura-Ortega JE, Panduro A. The role of FABP2 gene polymorphism in alcoholic cirrhosis. *Hepato Res.* 2005 Dec;33(4):306-312.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001. 3ra Edición.
- Santomé, J A; Di Pietro, S M; Cavagnari, B M; Córdoba, O L; Dell'Angelica, E C. Fatty acid binding proteins. Chronological description and discussion of hypotheses involving their molecular evolution. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* 1998 4:23-38.
- Scapin G, Gordon JI, Sacchettini JC. Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2-Å resolution. *J Biol Chem.* 1992 Feb 25;267(6):4253-69.
- Schaaf G, Ortlund EA, Tyeryar KR, Mousley CJ, Ile KE, Garrett TA, Ren J, Woolls MJ, Raetz CR, Redinbo MR, Bankaitis VA. Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol Cell.* 2008 Feb 1;29(2):191-206.
- Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct;239(1-2):69-77.
- Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J.* 2004 Aug 15;382(Pt 1):239-45.
- Schaffer J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.*, 2003, 14(3):281-7.
- Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):427-36.
- Schlattner U, Gehring F, Vernoux N, Tokarska-Schlattner M, Neumann D, Marcillat O, Vial C, Wallimann T. C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24334-42.
- Schroeder F, Frolov A, Starodub O, Atshaves BB, Russell W, Petrescu A, Huang H, Gallegos AM, McIntosh A, Tahotna D, Russell DH, Billheimer JT, Baum CL, Kier AB. Pro-sterol carrier protein-2: role of the N-terminal presequence in structure, function, and peroxisomal targeting. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25547-55.
- Schroeder F, Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Huang H, Starodub O, Chao H, Yang H, Frolov A, Kier AB. Recent advances in membrane

- microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Nov;226(10):873-90
- Seidel G, Prohaska R. Molecular cloning of hSLP-1, a novel human brain-specific member of the band 7/MEC-2 family similar to *Caenorhabditis elegans* UNC-24. *Gene*. 1998 Dec 28;225(1-2):23-9.
  - Shibata A, Ikawa K, Shimooka T, Terada H. Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Jun 1;1192(1):71-8.
  - Shields HM, Bates ML, Bass NM, Best CJ, Alpers DH, Ockner RK. Light microscopic immunocytochemical localization of hepatic and intestinal types of fatty acid-binding proteins in rat small intestine. *J Lipid Res*. 1986 May;27(5):549-57.
  - Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem*. 1998, 273(49):32487-32490. (b)
  - Shimabukuro M, Zhou Y.T, Levi M, Unger R.H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(5):2498-502. (c)
  - Shimabukuro M., Zhou Y-T., Lee Y. and Unger R. H. Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Biol Chem*. 1998, 273(6):3547-3550.
  - Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):171-6.
  - Shureiqi I, Lippman SM. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001 Sep 1;61(17):6307-12.
  - Sinha S, Perdomo G, Brown N.F, O'Doherty R.M. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*. 2004, 279(40):41294-301.
  - Siperstein MD. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res*. 1984 Dec 15;25(13):1462-8.
  - Sippl MJ. Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. *J Mol Biol*. 1990 Jun 20;213(4):859-83.
  - Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*. 1993 Dec;17(4):355-62.
  - Smith AJ, Sanders MA, Juhlmann BE, Hertzell AV, Bernlohr DA. Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *J Biol Chem*. 2008 Nov 28;283(48):33536-43.
  - Smith AJ, Sanders MA, Thompson BR, Londos C, Kraemer FB, Bernlohr DA. Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52399-405.
  - Smith AJ, Thompson BR, Sanders MA, Bernlohr DA. Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J Biol Chem*. 2007 Nov 2;282(44):32424-32.
  - Spector A. A., and Yorek M. A. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*. 1985, 26:1015-1035.
  - Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF. Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell*. 2002 Apr;2(4):477-88.
  - Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 Aug;12(6):266-73.

- Starodub O, Jolly CA, Atshaves BP, Roths JB, Murphy EJ, Kier AB, Schroeder F. Sterol carrier protein-2 localization in endoplasmic reticulum and role in phospholipid formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000 Oct;279(4):C1259-69.
- Stewart JM, Driedzic WR, Berkelaar JA. Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system. *Biochem J.* 1991 May 1;275 ( Pt 3):569-73.
- Stolowich NJ, Frolov A, Atshaves B, Murphy EJ, Jolly CA, Billheimer JT, Scott AI, Schroeder F. The sterol carrier protein-2 fatty acid binding site: an NMR, circular dichroic, and fluorescence spectroscopic determination. *Biochemistry.* 1997 Feb 18;36(7):1719-29.
- Stolowich NJ, Petrescu AD, Huang H, Martin GG, Scott AI, Schroeder F. Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Feb;59(2):193-212.
- Storch J, Bass NM, Kleinfeld AM. Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J Biol Chem.* 1989 May 25;264(15):8708-13.
- Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:73-95. Click here to read
- Storch J, Kleinfeld AM. Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry.* 1986 Apr 8;25(7):1717-26.
- Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 26;1486(1):28-44.
- Storch J, Zhou YX, Lagakos WS. Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine. *J Lipid Res.* 2008 Aug;49(8):1762-9.
- Storch J. A comparison of heart and liver fatty acid-binding proteins: interactions with fatty acids and possible functional differences studied with fluorescent fatty acid analogues. *Mol Cell Biochem.* 1990 Oct 15-Nov 8;98(1-2):141-7.
- Storz P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem.* 1999, 266(1):17-25.
- Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest.* 1985 Mar;75(3):1068-76.
- Szabo LJ, Small GM, Lazarow PB. The nucleotide sequence of POX18, a gene encoding a small oleate-inducible peroxisomal protein from *Candida tropicalis*. *Gene.* 1989 Jan 30;75(1):119-26.
- Tan H, Bun-Ya M, Hirata A, Kamiryo T. Predominant localization of non-specific lipid-transfer protein of the yeast *Candida tropicalis* in the matrix of peroxisomes. *Yeast.* 1994 Aug;10(8):1065-74.
- Thompson J, Ory J, Reese-Wagoner A, Banaszak L. The liver fatty acid binding protein--comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem.* 1999 Feb;192(1-2):9-16.
- Thumser AE, Storch J. Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J Lipid Res.* 2000 Apr;41(4):647-56.
- Thumser AE, Tsai J, Storch J. Collision-mediated transfer of long-chain fatty acids by neural tissue fatty acid-binding proteins (FABP): studies with fluorescent analogs. *J Mol Neurosci.* 2001 Apr-Jun;16(2-3):143-50
- Tijburg LB, Geelen MJ, van Golde LM. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Jul 17;1004(1):1-19.
- Tijssen, P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Volume 15 Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Editado por Burdon, RH & Knippenberg PH, Ed. Elsevier Amsterdam-New York-Oxford. 1985.

- Tipping E, Ketterer B. The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes. *Biochem J.* 1981 May 1;195(2):441-52.
- Triccerri A, Córscico B, Toledo JD, Garda HA, Brenner RR. Conformation of apolipoprotein AI in reconstituted lipoprotein particles and particle-membrane interaction: effect of cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 6;1391(1):67-78.
- Trotter PJ, Hagerman RA, Voelker DR. A yeast strain defective in oleic acid utilization has a mutation in the RML2 gene. *Biochim Biophys Acta.* 1999 May 18;1438(2):223-38.
- Trotter PJ, Ho SY, Storch J. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res.* 1996 Feb;37(2):336-46.
- Trotter PJ, Storch J. Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10017-23.
- Trotter PJ, Storch J. Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res.* 1991 Feb;32(2):293-304.
- Tsfadia Y, Friedman R, Kadmon J, Selzer A, Nachliel E, Gutman M. Molecular dynamics simulations of palmitate entry into the hydrophobic pocket of the fatty acid binding protein. *FEBS Lett.* 2007 Mar 20;581(6):1243-7.
- Ulloa J. E., Casiano C. A., and De Leon M. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.*, 2003, 84:655-668.
- Unger R. H. and Zhou Y-T. Lipotoxicity of b-Cells in Obesity and in Other Causes of Fatty Acid Spillover. *Diabetes*, 2001, 50(Suppl. 1):S118-S121.
- Unger R.H, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1585(2-3):202-12.
- Unger R.H. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.*, 2002, 53:319-36.
- van Roermund CW, Waterham HR, Ijlst L, Wanders RJ. Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Sep;60(9):1838-51. Review.
- Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J.* 2000 Oct;14(13):2040-6.
- Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jan 4;1081(1):1-24. Review.
- Veerkamp JH, Zimmerman AW. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol Neurosci.* 2001 Apr-Jun;16(2-3):133-42; discussion 151-7.
- Vergères G, Manenti S, Weber T, Stürzinger C. The myristoyl moiety of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein is embedded in the membrane. *J Biol Chem.* 1995 Aug 25;270(34):19879-87.
- Ves-Losada A, Maté SM, Brenner RR. Incorporation and distribution of saturated and unsaturated fatty acids into nuclear lipids of hepatic cells. *Lipids.* 2001 Mar;36(3):273-82.
- Vogel S, Mendelsohn CL, Mertz JR, Piantedosi R, Waldburger C, Gottesman ME, Blaner WS. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. *J Biol Chem.* 2001 Jan 12;276(2):1353-60.
- Wang H, He Y, Kroenke CD, Kodukula S, Storch J, Palmer AG, Stark RE. Titration and exchange studies of liver fatty acid-binding protein with <sup>13</sup>C-labeled long-chain fatty acids. *Biochemistry.* 2002 Apr 30;41(17):5453-61.
- Weber J, Wilke-Mounts S, Senior AE. Cooperativity and stoichiometry of substrate binding to the catalytic sites of *Escherichia coli* F1-ATPase. Effects of magnesium, inhibitors, and mutation. *J Biol Chem.* 1994 Aug 12;269(32):20462-7.
- Weber T Brunner J 2-(Tributylstannyl)-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzyl Alcohol: A Building Block for Photolabeling and Crosslinking Reagents of Very High Specific Radioactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 1995 March; 117(11), 3084–3095.

- Weiss EP, Brown MD, Shuldiner AR, Hagberg JM. Fatty Acid binding protein-2 gene variants an insulin resistance: gene and gene-environment interaction effects. *Physiol Genomics*. 2002 Sep 3;10(3):145-57. Review.
- Whitcomb R.W, Linehan W.M, Knazek R.A. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest*. 1988, 81(1):185-8.
- Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2323-8.
- Wootan MG, Bernlohr DA, Storch J. Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry*. 1993 Aug 24;32(33):8622-7.
- Wootan MG, Storch J. Regulation of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid binding proteins by acceptor membrane lipid composition and structure. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10517-23.
- Wriessnegger T, Gübitz G, Leitner E, Ingolic E, Cregg J, de la Cruz BJ, Daum G. Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr;1771(4):455-61.
- Wu F, Corsico B, Flach CR, Cistola DP, Storch J, Mendelsohn R. Deletion of the helical motif in the intestinal fatty acid-binding protein reduces its interactions with membrane monolayers: Brewster angle microscopy, IR reflection-absorption spectroscopy, and surface pressure studies. *Biochemistry*. 2001 Feb 20;40(7):1976-83.
- Yen CL, Mar MH, Zeisel SH. Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase. *FASEB J*. 1999 Jan;13(1):135-42. Click here to read
- Yip KS, Stillman TJ, Britton KL, Artymiuk PJ, Baker PJ, Sedelnikova SE, Engel PC, Pasquo A, Chiaraluce R, Consalvi V, Scandurra R, Rice DW. The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure*. 1995 Nov 15;3(11):1147-58.
- Zheng BS, Rönnerberg E, Viitanen L, Salminen TA, Lundgren K, Moritz T, Edqvist J. Arabidopsis sterol carrier protein-2 is required for normal development of seeds and seedlings. *J Exp Bot*. 2008;59(12):3485-99.
- Zhou W., Simpson J., McFadden J. M., Townsend C. A., Medghalchi S. M., Vadlamudi A., Pinn M. L., Ronnett G. V., and Kuhajda F. P. Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells. *Cancer Res*. 2003, 63:7330-7337.
- Zinser E, Sperka-Gottlieb CD, Fasch EV, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1991 Mar;173(6):2026-34.
- Zucker RM, Hunter ES 3rd, Rogers JM. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods Mol Biol*. 2000;135:191-202.
- Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol*. 2003 Jul 7;3:6.