



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

Tesis Doctoral

***“Análisis de la Interacción de  
Proteínas que Unen Ácidos Grasos  
con Membranas”***

**Eduardo De Gerónimo**

Tesis propuesta para optar por el  
Título de Doctor de la  
Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata

La Plata  
Marzo 2011

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

***“Análisis de la Interacción de  
Proteínas que Unen Ácidos Grasos  
con Membranas”***

**Eduardo De Gerónimo**

**Directora**

**Dra. Betina Córscico**

**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 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 (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Betina Córscico.**

**Durante la realización del mismo se recibió apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), del FIRCA program de los National Institutes of Health (NIH, USA).**

**Parte de los resultados aquí presentados fueron publicados en Biochimica et Biophysica Acta**

# Índice

Índice.....	4
Agradecimientos.....	8
Abreviaturas.....	10
Resumen.....	13
Introducción.....	17
1. Los lípidos en la naturaleza .....	17
2. Proteínas que unen lípidos (LBP) .....	18
2.1. Proteínas que unen ácidos grasos extracelulares .....	19
2.2. Proteínas de membrana que unen lípidos .....	20
2.3. Proteínas citosólicas que unen ácidos grasos (FABP) .....	20
2.3.1. Distribución tisular de las FABP.....	21
2.3.2. Estructura génica y evolución molecular .....	24
2.3.3. Estructura general de las proteínas pertenecientes a la familia de las FABPs.....	26
2.3.4. La hipótesis del “portal” .....	27
3. Digestión y absorción de lípidos en el intestino de mamíferos: Generalidades.....	28
4. FABP del intestino delgado de mamíferos .....	30
4.1. Diferencias entre I- y LFABP .....	31
4.2. Funciones biológicas de I- y LFABP.....	34
4.2.1. Estudios funcionales <i>in vitro</i> .....	34
4.2.2. Estudios a nivel celular .....	37
4.2.3. Estudios <i>in vivo</i> .....	38
Objetivos .....	42
Materiales y Métodos .....	44
1. Procedimientos generales.....	45
1.1. Técnicas de Biología Molecular .....	45
1.1.1. Minipreparación de Plásmidos.....	45
1.1.2. Electroforesis en geles de agarosa .....	46

1.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa. ....	46
1.1.4. Precipitación con etanol.....	46
1.1.5. Digestión con enzimas de restricción.....	47
1.1.6. Ligación.....	47
1.1.7. Obtención de células competentes.....	47
1.1.8. Transformación de Bacterias competentes .....	48
1.2. Técnicas para análisis de proteínas.....	48
1.2.1. Cuantificación de Proteínas.....	48
1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	49
1.3. Análisis estadístico .....	49
2. Procedimientos específicos.....	50
2.1. Diseño y construcción de cDNAs de los mutantes puntuales de triptófano a partir de IFABP salvaje .....	50
2.1.1. Megaprimer-PCR. ....	50
2.2. Purificación de proteínas recombinantes .....	53
2.2.1. Purificación de las proteínas nativas y los mutantes puntuales. ....	53
2.3. Control de la integridad estructural de las distintas variantes de FABP .....	54
2.3.1. Determinación del coeficiente de extinción molar. ....	54
2.3.2. Cálculo del coeficiente de partición. ....	55
2.3.3. Cálculo de la constante de afinidad. ....	56
2.3.4. Espectros de dicroísmo circular (CD). ....	57
2.4. Preparación de membranas artificiales.....	57
2.4.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV). ....	57
2.4.2. Vesículas unilamelares grandes (LUV). ....	58
2.4.3. Cuantificación de membranas artificiales. ....	58
2.5. Transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) desde FABP hacia SUV .....	59
2.5.1. Efecto de la concentración de las vesículasceptoras. ....	60
2.5.2. Efecto de la carga superficial de las vesículasceptoras. ....	60

2.5.3. Efecto de la fuerza iónica del medio. ....	60
2.6. Ensayos empleando ligandos naturales .....	61
2.6.1. Cálculo de la constante de afinidad de LFABP por ligandos naturales. ....	61
2.6.2. Cálculo del coeficiente de partición (Kp) de ligandos naturales entre LFABP y SUVs.....	62
2.6.3. Transferencia de ligandos naturales desde FABP hacia SUV. ....	62
2.7. Ensayos de quenching por acrilamida de los mutantes puntuales de IFABP.....	63
2.8. Determinación de la profundidad de penetración en membranas lipídicas de los mutantes puntuales de IFABP empleando el método de parallax quenching.....	64
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>68</b>
1. Unión y transferencia de ligandos naturales desde la proteína que une ácidos grasos de hígado (LFABP) hacia membranas.....	68
1.1. Unión de antroiloxi-derivados de ácidos grasos .....	69
1.2. Partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos .....	71
1.3. Transferencia de 12 AO desde los mutantes puntuales de LFABP.....	72
1.4. Unión de ligandos naturales.....	75
1.5. Equilibrio de partición de ligandos naturales entre LFABP y membrana.....	80
1.6. Transferencia de ligandos naturales desde LFABP hacia membrana.....	83
1.6.1. Efecto de la concentración de vesículas.....	84
1.6.2. Efecto de la fuerza iónica del medio. ....	86
1.6.3. Efecto de la carga superficial de las vesículas. ....	87
2. Rol de la región portal de IFABP en la interacción con membranas fosfolipídicas .....	92
2.1. Construcción de los mutantes puntuales de triptófano de IFABP .....	92
2.2. Control de integridad estructural y funcional de los mutantes de triptófanos de IFABP .....	95
2.2.1. Espectros de dicroísmo circular .....	95
2.2.2. Partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos .....	96
2.2.3. Espectros de emisión de fluorescencia de los mutantes puntuales de triptófano de IFABP .....	97
2.3. Quenching de los mutantes de IFABP con acrilamida.....	102
2.4. Determinación de la profundidad de penetración en membranas lipídicas de los mutantes puntuales de IFABP empleando lípidos brominados.....	104

2.4.1. Mutantes puntuales de triptófano de IFABP versus lípidos brominados .....	106
2.4.2. Efecto de la carga superficial de las membranas .....	110
2.4.3. Efecto de la fuerza iónica .....	113
Conclusiones.....	119
Referencias Bibliográficas.....	122

# Agradecimientos

A Betina, por la dirección de mi tesis. Por tener paciencia a mis errores, sobre todo a la hora de completar formularios y todo tipo de trámites burocráticos. Por contagiarme su incesante interés por la ciencia, acompañarme y respetarme en momentos difíciles y obligarme a comprar la heladera. A Gabriel por su simpatía.

A mis compañeros del laboratorio: Gisela (por el yogur y por corregir la tesis), Lisandro, Ximena, Marina, Florencia, Luciana, Jorge, Valeria y Natalia por ser excelentes compañeros, conformar un grupo en el cual he me sentido muy cómodo y me he divertido a diario sin perder los estribos y rigores que el trabajo amerita.

Al personal del INIBIOLP por su apoyo y camaradería durante estos años.

A los “muchachos” por su invaluable y gratificante compañía, los de toda la vida que quedaron en Balcarce, los apóstoles de las “choriceadas santas”, el grupete de los encuentros musicales, a mis excompañeros de cátedra que tantos buenos años me han soportado, y al lindo grupo de dibujo.

A mi papá Jesús que me ha enseñado a como reponerme de duros golpes de la vida, a mi mamá Carmen que demuestra el máximo cariño maternal y tiene infinita paciencia a mi introvertida personalidad, a mi hermano Seba por ser el mejor del mundo, a mi hermana Paula y mi cuñado Francisco, por formar una hermosa familia y por el sobrino/a que viene en camino. A mis Sobrinitos (Valentín y Joaquín), quienes me iluminan en cada viajecito a Balcarce. A los Nonos, quienes tienen una integridad indiscutida.



A Flor, por ser tan especial. A su cariñosa familia: Sofia por aguantarme en cada cena y ayudarme con el índice, A Gussy y Eme por recibirme tan bien cuando los visito, por el matafuego, por cocinarme tan rico y llevarme a la playa.

# Abreviaturas

**12AO** 12-(9-anthroiloxi) oléico

**AFABP** Proteína que une ácidos grasos de adipocito

**ACBP** Proteína que une acil-CoAs

**ACC** Acil-CoAs Carboxilasa

**ACS** Acil-CoS Sintasa

**AOFA** Antróiloxi-derivados de ácidos grasos

**Br-PC** Fosfatidilcolina brominadas.

**BFABP** Proteína que une ácidos grasos de cerebro

**CD** Dicroísmo Circular

**Chol** Colesterol

**CL** Cardiolipina

**CRABP** Proteínas que unen ácido retinoico

**CRBP** Proteínas que unen retinol

**DG** Diacilglicéridos

**DHE** Dehidroergosterol

**EC** Ésteres de colesterol

**EDTA** Etilen-Diamino Tetra-Acetato de sodio

**EFABP** Proteína que une ácidos grasos de epitelio

**EML** Enzimas del metabolismo lipídico

**EPC** Fosfatidil colina de huevo

**FA** Ácidos grasos

**FABP** Proteínas que unen ácidos grasos (fatty acid binding proteins)

**FAS** Ácido graso sintasa

**FAT/CD36** Traslocasa de ácidos grasos

**FATP** Proteína transportadora de ácidos grasos

**FFA** Ácidos grasos libres

**FRET** Foster Resonance Energy Transfer

**HFABP** Proteína que une ácidos grasos de corazón

**HL-IFABP** IFABP carente de la región alfa-helicoidal

**IBABP** Proteína que une ácidos grasos de íleon

**Ile (I)** Isoleucina

**LbFABP** Proteína que une ácidos grasos básica de hígado

**LCFA** Ácido graso de cadena larga

**Leu (L)** Leucina

**LFABP** Proteína que une ácidos grasos de hígado

**LUV** vesículas unilamelares grandes

**Met (M)** Metionina

**MFABP** Proteína que une ácidos grasos de mielina

**MG** Monoacilglicéridos

**MUFA** Ácidos grasos monoinsaturados

**NBD-PC1**-Oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina

**NMR** Resonancia magnética nuclear

**nsLTP** Proteína transportadora de lípidos no específica

**OA** Ácido oleico (oleic acid)

**PA** Ácido palmítico (palmitic acid)

**PAGE** Electroforesis en gel de poli-acrilamida

**PC** Fosfatidil colina

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PE** Fosfatidil etanolamina

**Phe (F)** Fenilalanina

**PI** Fosfatidil inositol

**PL** Fosfolípidos

**pmFABP** Proteína que une ácidos grasos de membrana plasmática

**PPAR** Receptor activador de la proliferación peroxisomal

**PS** fosfatidilserina de cerebro porcino

**PUFA** Ácidos grasos poliinsaturados

**sn-2-MG** sn-2-monoacilglicerol

**SCP-2** Proteína transportadora de esteroides tipo-2

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

**SLBP** Proteínas solubles que unen lípidos

**SUV** Vesículas unilamelares pequeñas

**TFABP** Proteína que une ácidos grasos de testículo

**TG** Triglicéridos

**Trp (W)** Triptofano

# Resumen

Las proteínas que unen ácidos grasos de intestino (IFABP) e hígado (LFABP), son proteínas homólogas que se coexpresan en altos niveles en el citosol de células del epitelio intestinal. Ambas proteínas poseen una estructura típica que consta de 10 cadenas beta antiparalelas empaquetadas formando un barril beta levemente elíptico y dos segmentos alfa-helicoidales cortos que formarían parte de un pequeño portal en la parte superior del barril. Pese a que estas dos proteínas presentan una estructura tridimensional muy similar, poseen un bajo nivel de homología en su estructura primaria.

Si bien tanto IFABP como LFABP son capaces de unir ácidos grasos, presentan una serie de diferencias en cuanto al número de sitios de unión, tipo de ligandos y afinidad por los mismos. Por otra parte, estas proteínas emplean diferentes mecanismos de transferencia de ácidos grasos hacia membranas. La transferencia de ácidos grasos desde IFABP ocurre durante una interacción colisional entre la proteína y la membrana aceptora, mientras que LFABP transfiere los ácidos grasos mediante un mecanismo mediado por difusión acuosa. Más aún, se ha demostrado que el dominio  $\alpha$ -helicoidal de IFABP desempeña un rol crítico en la determinación de mecanismo de transferencia de los ácidos grasos de tipo colisional. Tomando como base estas diferencias estructurales, de unión y de cinética de transferencia del ligando, se ha propuesto que I- y LFABP tendrían funciones diferentes dentro del enterocito, tal vez contribuyendo al transporte diferencial y compartimentación de los lípidos.

Con la finalidad de contribuir al descubrimiento de las funciones específicas de I- y LFABP en el enterocito, en este proyecto se han abordado los siguientes objetivos específicos: a) Analizar la unión, partición de equilibrio entre proteína y membrana, velocidades y mecanismos de transferencia de diversos ligandos naturales desde LFABP hacia vesículas artificiales. b) Analizar la interacción física de la región portal de IFABP con la bicapa fosfolipídica y determinar qué factores modulan dicha interacción.

LFABP presenta características particulares dentro de la familia de las FABPs. Puede unir más de un ácido graso de cadena larga y, además, es capaz de ligar una variedad de ligandos hidrofóbicos como Acil-CoAs, monoglicéridos y sales biliares, entre otros. A su vez, como ya ha sido mencionado, presenta un mecanismo “difusional” de transferencia de análogos fluorescentes de ácidos grasos hacia membranas. Mediante el empleo de mutantes puntuales de triptófano de LFABP, cuya intensidad de emisión fluorescente es sensible a la unión del ligando, nos ha sido posible medir directamente la afinidad de unión, la partición de equilibrio y la transferencia hacia membranas modelo de ligandos naturales, en lugar de los análogos fluorescentes utilizados hasta el momento.

Los resultados de unión de ligandos naturales a LFABP muestran que, mientras los ácidos grasos se unen a través de un mecanismo cooperativo, sus respectivos acil-CoAs presentan un comportamiento hiperbólico no cooperativo. Respecto a la partición de equilibrio entre la proteína y membranas fosfolipídicas, los ácidos grasos saturados parecen tener una mayor partición hacia la fase proteica respecto a la fase lipídica comparada con los ácidos grasos insaturados. En cuanto a la cinética de transferencia de los ligandos naturales, éstos muestran velocidades doscientas veces más rápidas que las halladas para los análogos fluorescentes. Cabe destacar que el oleoil-CoA presenta un comportamiento de transferencia marcadamente distinto al resto de los ligandos estudiados, probablemente indicando la posibilidad de LFABP de orientar distintos ligandos hacia diferentes destinos metabólicos.

Por otro lado, se ha propuesto que la transferencia de los ácidos grasos desde IFABP hacia vesículas ocurre mediante interacciones proteína-membrana. En este trabajo, hemos analizado la profundidad de penetración de la proteína IFABP en la bicapa lipídica. Para ello, se han construido una serie de mutantes puntuales de triptófano de IFABP ubicados estratégicamente en la región portal. Empleando ensayos de quenching de la fluorescencia del triptófano de los mutantes puntuales por vesículas construidas con lípidos brominados, en los cuales el bromo se ubica en distintas posiciones dentro de la bicapa lipídica, se puede determinar la profundidad a la cual se localiza el residuo de triptófano en la membrana. También se analizó como esta

interacción IFABP-membrana es afectada por la carga negativa superficial de la membrana y por la fuerza iónica del medio.

Los resultados muestran claramente que la región portal de IFABP es el dominio de unión a membrana y que las cargas negativas de la superficie de las vesículas y las positivas superficiales de la proteína son importantes para establecer el “complejo colisional” proteína-membrana. De esta manera, las interacciones electrostáticas entre IFABP y las membranas jugarían un rol primordial en la formación del complejo, seguidamente, interacciones hidrofóbicas, mediarían la inserción parcial de la proteína en la fase lipídica.





# Introducción

## 1. Los lípidos en la naturaleza

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diverso, cuya característica general es su escasa solubilidad en agua. Este heterogéneo grupo de compuestos hidrofóbicos cumple las más diversas funciones. Mientras que las grasas y aceites (triglicéridos, TG) son la principal reserva de energía de tejidos animales y vegetales respectivamente, los fosfolípidos (PL) cumplen un rol estructural como la formación de membranas biológicas. Los esteroides también forman parte de las membranas biológicas y, a su vez, funcionan como cofactores de transcripción, hormonas y agentes emulsionantes en el tracto digestivo (sales biliares). Otros lípidos cumplen roles cruciales como cofactores de enzimas (grupo hemo, porfirinas), transportadores de electrones (quinonas), pigmentos fotosensibles (clorofilas, xantonas y carotenos), “chaperonas” de proteínas de membrana y segundos mensajeros (derivados de ácidos grasos poli-insaturados y fosfolípidos).

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 con el 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) 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

inmunomodulación, la angiogénesis y la vasoconstricción, entre otros (Duplus et al., 2000; Chawla et al., 2001; Funk et al., 2001; Hla et al., 2001; Merrill et al., 2002; Hannun et al., 2002; Cao et al., 2008; Vallim et al., 2010). Así, los mensajeros lipídicos resultan fundamentales para la correcta coordinación de los procesos celulares, orgánicos y sistémicos.

Todos los ácidos grasos son indispensables en los animales, pero especies como el linoleico (18:2 n6) y el  $\alpha$ -linolénico (18:2 n3) son además esenciales porque no pueden ser sintetizados en animales a partir de compuestos simples. Los mismos deben ser tomados de la dieta y son utilizados como precursores para la generación de otros ácidos grasos de gran importancia mediante reacciones de desaturación y elongación de la cadena carbonada.

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, transportarlos y transformarlos.

## **2. Proteínas que unen lípidos (LBP)**

Numerosos sistemas biológicos dependen del transporte de distintos tipos de lípidos a través de sistemas acuosos para llevar a cabo diversas funciones. Considerando la poca solubilidad de los mismos en agua, a lo largo de la evolución han surgido una gran variedad de proteínas que facilitan el transporte de dichas sustancias.

En los vertebrados, distintos órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético presentan rutas metabólicas que demandan un importante transporte de lípidos, especialmente ácidos grasos. Los ácidos grasos son transportados entre tejidos, vía torrente sanguíneo, o entre distintos compartimentos citosólicos en el interior celular. Algunos de los

procesos intracelulares que involucran transporte de lípidos incluyen, por ejemplo, la absorción intestinal de ácidos grasos provenientes de la dieta, su almacenamiento y movilización como triglicéridos en adipocitos, producción de energía de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, la incorporación de los mismos en lípidos más complejos como fosfolípidos y ésteres de colesterol, acilación de proteínas específicas, y la función de los ácidos grasos como señales intracelulares (Glatz et al., 1996; Bu et al., 2009).

Se han identificado numerosas proteínas que pueden unir no covalente y reversiblemente ácidos grasos, con la finalidad de mejorar su escasa solubilidad en sistemas acuosos y, por ende, facilitar su transporte. Dicho grupo está compuesto por proteínas que transportan ácidos grasos tanto en el espacio extracelular como intracelular.

## **2.1. Proteínas que unen ácidos grasos extracelulares**

En el plasma sanguíneo y en los fluidos intersticiales de mamíferos, la albúmina es la proteína que transporta los ácidos grasos no esterificados. 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 (Glatz et al., 1996; Zunszain et al., 2003; Cupp et al., 2004; Black et al., 2008). 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.

El transporte de triacilglicéridos y ésteres de colesterol se lleva a cabo bajo la forma de estructuras especializadas denominadas *lipoproteínas*. Las lipoproteínas son partículas con un centro altamente hidrofóbico y una superficie externa relativamente hidrofílica. Una partícula lipoproteica típica, consiste en un centro de triacilgliceroles y ésteres de colesterol y una cubierta de fosfolípidos y colesterol libre. Cada partícula lipoproteica está asociada con

una o más moléculas proteicas, las *apolipoproteínas* que se encuentran en su superficie.

## **2.2. Proteínas de membrana que unen lípidos**

Originalmente se creía que la entrada de los ácidos grasos 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 ácidos grasos de cadena larga en distintos tejidos, que coexistiría con la difusión simple de los ácidos grasos (Stahl et al., 2001). Asimismo, se han identificado varias de las proteínas responsables de este transporte a través de membrana. Se han caracterizado al menos tres grupos de proteínas receptoras y transportadoras de ácidos grasos existentes en membranas: Las proteínas que unen ácidos grasos de membrana plasmática (PM-FABP) (Stremmel et al., 1985), las translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) (Abumrad et al., 1981) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (Schaffer et al., 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 et al., 2002; Gimeno et al., 2003).

## **2.3. Proteínas citosólicas que unen ácidos grasos (FABP)**

La naturaleza intrínseca de los compuestos lípidicos, 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 proteínas solubles que unen lípidos (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, del inglés *Fatty Acid Binding Proteins*) (Storch et al., 2008), la proteína que une acil-CoA (ACBP, del inglés *Acyl-CoA Binding Protein*) (Kragelund et al., 1999), las proteínas transportadoras de lípidos no específicas (nsLTP, *non-specific Lipid Transfer Proteins*) (Kader et al., 1996), la proteína transportadora de esteroides tipo 2 (SCP2, *Sterol Carrier Protein-2*) (Edqvist J. et al., 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 et al., 2008; Morley et al., 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.

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABP) son miembros de una familia multigénica que codifican para la expresión de proteínas citosólicas pequeñas (14-15 kD) que unen ácidos grasos intracelulares (Vogel Hertz et al., 2000). Desde su primer hallazgo en 1972 (Ockner et al., 1972) hasta la actualidad se han sumado numerosos representantes de esta familia pertenecientes a distintos grupos del reino animal. Es importante destacar que las proteínas que unen retinol (CRBP) y ácido retinoico (CRABP) están estrechamente relacionadas con las FABP ya que presentan una estructura terciaria muy similar. Entre los miembros de ésta 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.

### **2.3.1. Distribución tisular de las FABP**

La denominación original que se ha otorgado a las distintas proteínas de esta familia está relacionada con el tejido en el que originariamente fueron encontradas (**Tabla I**).

Distintos miembros de la familia de las FABP han sido encontrados en todos los tejidos y son especialmente abundantes en aquellos con un alto

metabolismo lipídico. Hoy en día se sabe que la mayoría de los tejidos expresan varios tipos de FABP variando solamente en los niveles de expresión (Storch et al., 2010). Específicamente, LFABP se expresa en hepatocitos, enterocitos, colonocitos y células de los túbulos proximales del riñón. Por otra parte IFABP, que se expresa mayoritariamente en intestino, también se expresa en mucha menor proporción en hígado. De esta manera se pueden encontrar tipos celulares específicos, como el enterocito, que expresan más de un tipo de FABP.

Tabla I. Miembros de la familia de las FABP

Gen	Nombre	Nombre original	identificada en:	Expresión	Ligandos naturales
<i>fabp1</i>	FABP1	LFABP	Hígado	<b>Hígado, intestino, riñón, pulmón y páncreas</b> (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 et al., 2004; Storch et al., 2008; Piantadosi et al., 2005; Li et al., 1996).

### 2.3.2. Estructura génica y evolución molecular

La expresión de las FABP ha sido verificada sólo en especies del reino animal. Dentro de dicho reino, ha sido encontrada en especies pertenecientes a muchas clases de vertebrados (Santome et al., 1998) como en numerosos invertebrados pertenecientes a diferentes phyla (Hauerland et al., 1990; Carrizo et al., 2002; Alvite et al., 2001).

Para la mayoría de las FABP, los genes han sido identificados y caracterizados. Todos ellos presentan una estructura génica muy similar, consistente en cuatro exones interrumpidos por tres intrones que varían su longitud pero presentan una posición similar dentro de la secuencia génica (Glatz et al., 1996). El hecho de presentar una estructura génica tan similar sugiere la existencia de un gen ancestral para las FABP; esta secuencia original habría dado origen a la variedad de FABPs conocidas en la actualidad mediante el proceso de duplicación génica (Hauerland et al., 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 FABPs se habrían diversificado y especializado en su capacidad de unión de ligandos hidrofóbicos específicos, dando lugar a los distintos tipos de FABPs (Schaap et al., 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 II**) (Banaszak et al., 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 et al., 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 II. 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

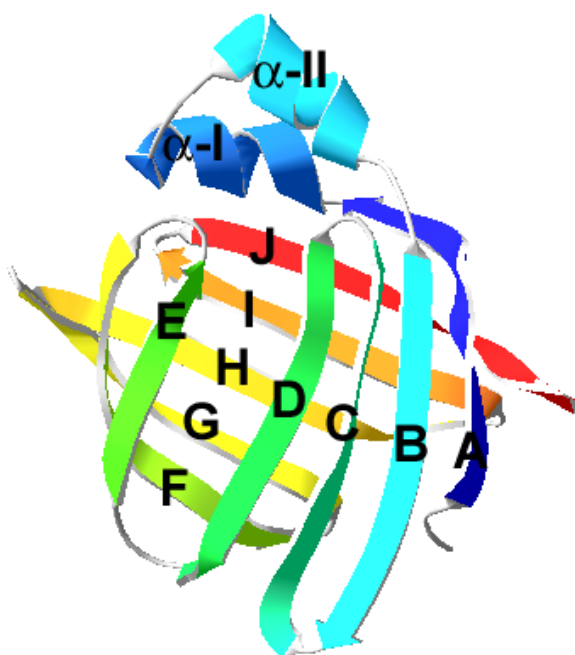
<sup>a</sup> Los porcentajes fueron calculados en base a una longitud promedio de 132 aminoácidos. Adaptado de Banaszak et al., 1994.

El análisis evolutivo de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos (Huelsenbeck et al., 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 et al., 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 et al., 2004). Se estima que la primera duplicación del gen ancestral se habría producido aproximadamente hace 930 millones de años (Santomé et al., 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 et al., 1985).

### 2.3.3. Estructura general de las proteínas pertenecientes a la familia de las FABPs

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 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**). Las 10 cadenas se agrupan en dos hojas  $\beta$  de 5 cadenas cada una, las cuales se enfrentan con una orientación casi perpendicular determinando una cavidad central. La unión entre las cadenas  $\beta A$  y  $\beta B$  es el motivo hélice-giro-hélice; el resto de las cadenas presentan giros entre sí. Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un solo dominio con un radio de giro de 14 Å (Banaszak et al., 1994).



**Fig 1. Estructura común de las FABP.** 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 de estas proteínas es muy inusual porque contiene un gran número de residuos hidrofílicos que se hallan involucrados en distintas redes de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Existe un pequeño núcleo hidrofóbico que se haya desplazado del centro de la proteína. Aunque las secuencias no se conservan, la naturaleza hidrofóbica de los residuos en esta área se mantiene. Esta cavidad es bastante inaccesible para el solvente, cuando se analizan las estructuras cristalográficas de algunas FABP, las mismas presentan aperturas por las cuales se podría establecer un intercambio de moléculas de agua; pero ninguno de estos poros parece lo suficientemente grande como para dejar pasar un ácido graso (Banaszak et al., 1994).

#### **2.3.4. La hipótesis del “portal”**

Las FABP pueden unir uno o dos ligandos en una sola cavidad, la cual es aparentemente inaccesible desde el entorno acuoso. De esta observación surge la explicación para la entrada de los ligandos mediante un cambio conformacional de la proteína. La naturaleza de este cambio conformacional, sin embargo, es hasta el momento desconocida. Una posible explicación estaría dada por la hipótesis del “portal” (Hodsdon et al., 1997).

La hipótesis del “portal” sugiere que la entrada del ácido graso en la cavidad de las FABP tiene lugar a través de un área dinámica, constituida por la hélice  $\alpha$ II y residuos de los giros entre las cadenas  $\beta$ C y  $\beta$ D, y las cadenas  $\beta$ E y  $\beta$ F (Sacchetti et al., 1989; Friedman et al., 2006). Estudios comparativos de cristalografía de las formas apo- y holo-IFABP dieron como resultado que, si bien los esqueletos carbonados de ambas formas eran casi superponibles, la forma apo- se encuentra en un estado un poco más abierto al solvente que la forma holo- en la región portal (Scapin et al., 1992; Sacchetti et al., 1992). Estudios posteriores de las estructuras en solución, utilizando la técnica de NMR, permitieron observar que la forma apo-IFABP posee una región discreta de desorden en comparación con la forma holo-, siendo esta más pronunciada en la región C-terminal de  $\alpha$  hélice II y el giro entre las cadenas C-D (Hodsdon et al., 1997). En base a estos resultados se postuló que apo-IFABP existe en

solución como una población heterogénea de formas localmente ordenadas y desordenadas en equilibrio (Hodsdon et al., 1997).

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 et al., 2005). Algo similar ocurre para la proteína que une ácidos grasos básica de hígado (LbFABP) pero a través de Dominio Portal (Tsfadia et al., 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 et al., 2006).

### **3. Digestión y absorción de lípidos en el intestino de mamíferos: Generalidades**

La función del tubo intestinal en conjunto con el hígado y el páncreas, es digerir el alimento, reducir los hidratos de carbono, lípidos y proteínas a moléculas que puedan ser absorbidas por la mucosa (Bloom et al., 1995). La grasa de la dieta, constituida principalmente por triglicéridos y en menor medida por ésteres de colesterol y fosfolípidos, es emulsionada en el duodeno gracias a la acción de las sales biliares y los movimientos peristálticos de las paredes del intestino, formando micelas. Los lípidos en las micelas quedan expuestos a la acción de las lipasas en el entorno acuoso del intestino; generándose como resultado diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Lehninger et al., 2005). Los ácidos grasos libres de cadena larga son incorporados a las células intestinales mediante difusión pasiva y transporte facilitado. Hasta la actualidad se han caracterizado la proteína que une ácidos grasos de membrana plasmática (PM-FABP), ácido graso translocasa (FAT) y proteína transportadora de ácidos grasos tipo 4 (FATP 4), las cuales facilitarían la entrada de componentes lipídicos. Más aún, trabajos realizados en líneas

celulares establecidas (IEC-6 y Caco-2) han demostrado una cinética saturable de incorporación de ácidos grasos al citoplasma para ácidos grasos de cadena larga así como para el sn-2-monoacilglicerol (sn-2-MG) (Murota et al., 2001, Murota et al., 2005, Trotter et al., 1996).

Los enterocitos pueden resintetizar triacilgliceridos utilizando dos rutas metabólicas alternativas; una de ellas es a través de la ruta del glicerol-3-fosfato, mientras que la otra consiste en la esterificación de un monoacilglicérido con ácido graso-CoA. La vía que involucra monoacilglicéridos procede por directa acilación del sn-2-monoacilglicérido con un ácido graso-CoA, dando como producto sn-1,2-diacilglicerol como intermediario. El complejo enzimático "triacilglicerido sintetasa" es el responsable de llevar a cabo la ruta antes mencionada y se encuentra en la superficie citosólica del retículo endoplasmático (Lehner et al., 1995). Cuando los niveles de ácidos grasos libres y el sn-2-MG son bajos, la ruta del glicerol-3-fosfato se convierte en la vía principal de síntesis en el enterocito (Ho et al., 2002). Esta ruta involucra la acilación del glicerol-3-fosfato con ácido graso-CoA para rendir ácido lisofosfatídico; que luego de acilarse y desfosforilarse se transforma en diacilglicerol. La conversión de diacilglicerol a triacilglicerol, catalizado por diacilglicerol aciltransferasa, representa el paso final para ambas rutas metabólicas. Los triacilglicéridos producidos por ambas rutas metabólicas son incorporados en los quilomicrones, estos pasan al sistema linfático para luego llegar al sistema sanguíneo haciendo entrega de su carga a los diferentes tejidos.

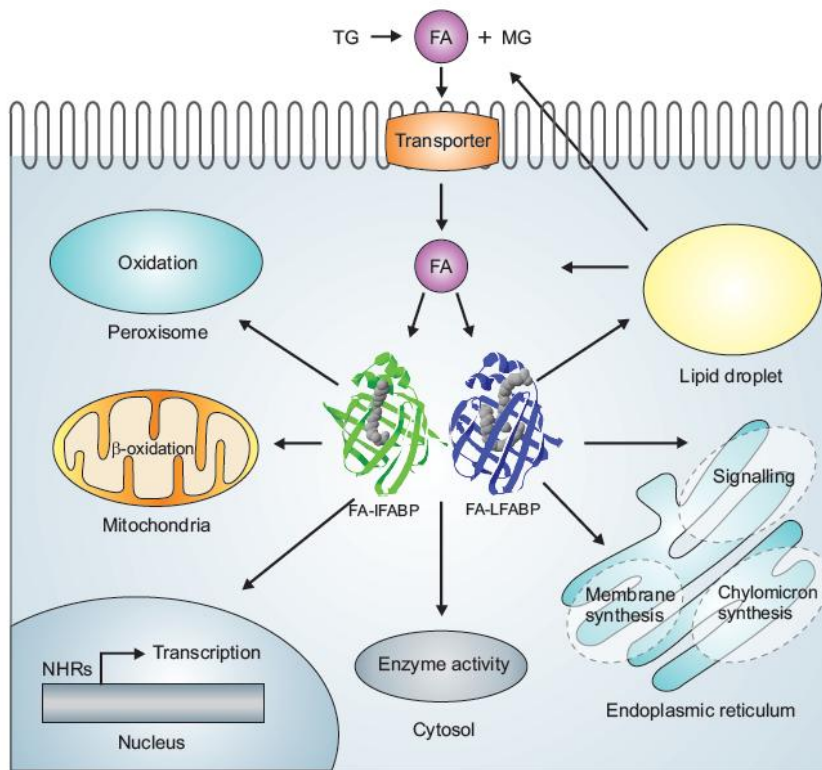
Estudios realizados en células en cultivo y en animales enteros han permitido observar que los enterocitos pueden absorber ácidos grasos desde la cara basolateral, además de hacerlo desde la luminal. (Ho et al., 2001; Gangl et al., 1975). Los ácidos grasos incorporados por vías diferentes son metabolizados de manera diferencial, mientras que los ácidos grasos incorporados por la cara luminal del intestino son principalmente incorporados en TG (Mansbach et al., 2007), los ácidos grasos incorporados a través de la cara basolateral son principalmente utilizados en la  $\beta$ -oxidación y en la producción de fosfolípidos de membrana (Ho et al., 2002, Gangl et al., 1975).

Esta es una condición única inherente al epitelio intestinal y ha sido poco estudiada (Niot et al., 2009).

#### 4. FABP del intestino delgado de mamíferos

El intestino delgado de mamíferos expresa tres proteínas de la familia de las FABP: IFABP, LFABP y IBABP. Si bien la distribución de las mismas se superpone a lo largo de la longitud del intestino delgado, cada una de ellas presenta su máxima expresión en regiones diferentes (Agellon et al., 2002; Storch et al., 2008). En ratones, se detectó ARNm de LFABP en los dos tercios proximales del intestino delgado; mientras que el ARNm correspondiente a IFABP es detectable en toda la longitud del órgano presentando un pico de expresión en la región media. El ARNm de IBABP está presente solamente en la región distal del intestino delgado, correspondiente al íleon (Agellon et al., 2002). De esta forma, gran parte de los enterocitos coexpresan, de manera abundante, LFABP e IFABP. Se cree que estas proteínas participan en el transporte y procesamiento intracelular de las elevadas cantidades de ácidos grasos absorbidas por el intestino. Pero, hasta la actualidad, se desconoce ***por qué un solo tipo de célula contiene dos tipos distintos de FABP.***

En la **Figura 2** se muestra de manera esquemática el posible rol desempeñado por las FABP de enterocito durante la absorción de los lípidos de la dieta.



**Fig 2. Esquema simplificado del metabolismo de FA en enterocitos.** Los FA que provienen de la hidrólisis de TG dietarios se incorporan en los enterocitos por difusión simple o mediado por proteínas de membrana. Luego son oxidados en la mitocondria o incorporados en PL y TG por distintas enzimas del metabolismo lipídico, previa activación a acil-CoA (ACA) por las Acil-CoA Sintetasa (ACS). Los niveles de FA citoplasmáticos también pueden tener un efecto sobre la expresión de genes mediante la unión a factores de transcripción.

#### 4.1. Diferencias entre I- y LFABP

Se han detectado una serie de diferencias entre I- y LFABP en cuanto a su estructura primaria, al número de sitios de unión, tipo de ligandos y afinidad por los mismos. Tomando como base estas diferencias estructurales y de unión, se ha propuesto que I- y LFABP tendrían funciones diferentes dentro del enterocito, tal vez contribuyendo al transporte diferencial y compartimentación de los lípidos.

*Distribución tisular.* LFABP se expresa tanto en hígado como en el intestino delgado, riñón, pulmón y páncreas; mientras que IFABP lo hace exclusivamente en el intestino delgado (Bass et al., 1988). (**Tabla I**)

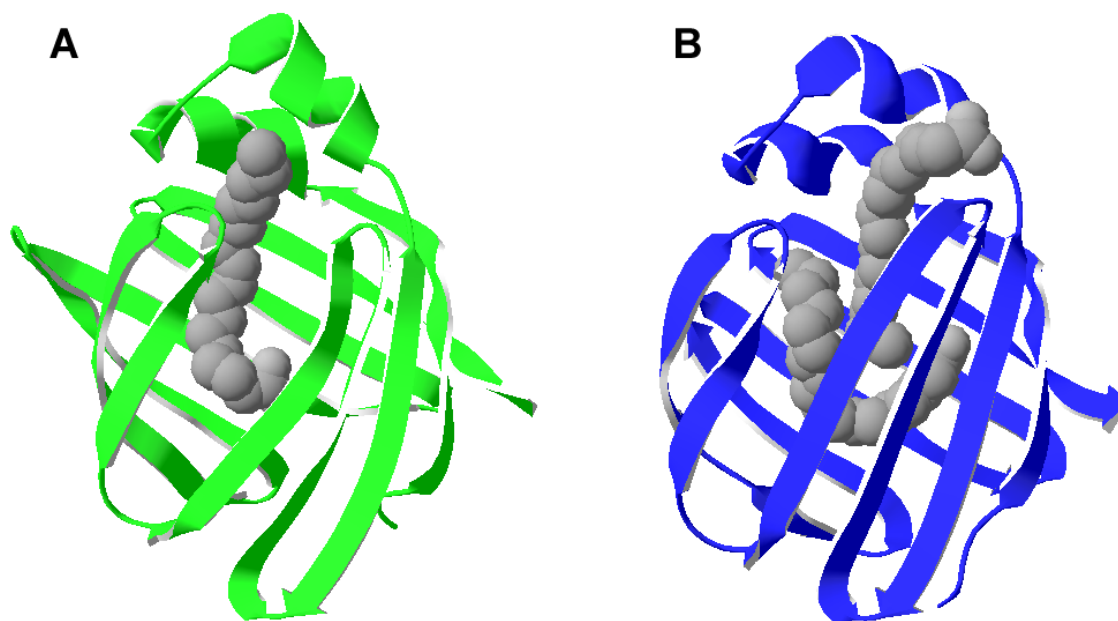
*Diferencias estructurales.* A pesar de que I- y LFABP presentan un bajo nivel de homología de secuencia, correspondiente con un 24% (Banaszak et al., 1994), los elementos de estructura secundaria son básicamente los mismos

con la excepción de la presencia en IFABP de una hélice anfipática en el segmento  $\alpha$ I. 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 et al., 1999).

*Cavidad hidrofóbica.* La cavidad de LFABP es la más grande de la familia y presenta un volumen aproximado de  $610 \text{ \AA}^3$ . La cavidad de IFABP, por otra parte, es mucho menor presentando un volumen aproximado de  $353 \text{ \AA}^3$ . Estas diferencias en el volumen de la cavidad pueden ser las responsables de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que unen I- y LFABP.

*Especificidad y afinidad por los distintos ligandos.* LFABP presenta el rango más amplio de ligandos de la familia de las FABP, puede ligar ácidos grasos con muy alta afinidad, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (Thompson et al., 1999). Por el contrario IFABP es capaz de unir solamente ácidos grasos. Considerando solamente los ácidos grasos, LFABP presenta una estequiometría que le es única en la familia ya que es capaz de unir dos ácidos grasos al mismo tiempo mientras que IFABP sólo puede unir un ácido graso por vez (**Figura 3**).





**Fig 3. Unión de FA a FABP intestinales.** Se muestra la orientación de un ácido oleico unido a 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 las distintas FABP por distintos ácidos grasos utilizando la sonda fluorescente ADIFAB demostraron que las constantes de disociación para toda la familia de FABP se encuentran en el rango de 2 hasta 1000 nM (Richieri et al., 1994). Más específicamente IFABP de rata mostró la mayor variación de los valores de  $K_d$  de acuerdo a los distintos ácidos grasos analizados, observándose valores de  $K_d = 6$  nM para el ácido esteárico hasta  $K_d = 480$  nM para el ácido linolénico. Esta disminución en la afinidad está de acuerdo con un aumento en las insaturaciones del ligando y por ende con su mayor solubilidad en agua. LFABP, por otra parte, mostró una gran afinidad tanto por los ácidos grasos saturados como por los insaturados, variando desde  $K_d = 9$  nM para el ácido esteárico hasta  $K_d = 69$  nM para el ácido linolénico. El segundo sitio de unión descrito para LFABP mostró también altas afinidades por los distintos ligandos probados, siendo equivalentes en el caso de los ácidos grasos saturados pero 10 veces más débiles que el primer sitio para el caso de los ácidos grasos insaturados (Richieri et al., 1994).

## 4.2. Funciones biológicas de I- y LFABP

A pesar de la abundante información sobre su estructura, distribución tisular y propiedades de unión, aún no está claro cuáles son las funciones que estas proteínas desempeñan *in vivo*. En los últimos años se han propuesto una serie de funciones para FABP (Glatz et al., 1996; Vogel Hertz et al., 2000, Haunerland et al., 2004), algunas de las mismas se enumeran a continuación:

- Unión, selección, solubilización y compartimentalización de ácidos grasos de cadena larga a través del citoplasma.
- Unión de grupos hemo, bilirrubina, prostaglandinas, hepatocarcinógenos, etc (LFABP).
- Cofactores en reacciones que utilizan ácidos grasos de cadena larga como sustrato o agentes reguladores.
- Modulación del proceso de mitosis, crecimiento celular y diferenciación celular.
- Transporte direccionado de ácidos grasos hacia rutas metabólicas específicas.
- Participación en mecanismos de transducción de señales, y en la regulación de la expresión génica mediada por ácidos grasos.
- Protección contra los efectos nocivos provocados por grandes concentraciones de ácidos grasos de cadena larga libres en el citoplasma celular y funcionando como un antioxidante.

En las siguientes secciones se analizarán una serie de estudios que han aportado evidencias sobre las posibles funciones específicas de I- y LFABP.

### 4.2.1. Estudios funcionales *in vitro*

*Ensayos de transferencia de energía de resonancia.* Mediante el empleo de un ensayo de transferencias de energía de resonancia Förster (FRET, del inglés Förster Resonance Energy Transfer) se monitorea directamente la

transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA, de *AnthroylOxy-Fatty Acids*) (análogos fluorescentes de los ligandos naturales) desde las FABP hacia membranas unilamelares pequeñas (SUV, de *Small Unilamellar Vesicles*), que contienen NBD-PC como aceptor FRET (Storch et al., 1990). Estos estudios han permitido caracterizar gran parte de los miembros de la familia de FABP en cuanto a sus propiedades de transferencia de ligandos, definiendo dos subgrupos dentro de la familia de las FABP. Por un lado se reconocen las proteínas “difusionales” como la LFABP, LbFABP o CRABP II, 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 et al., 1996; Thumser et al., 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 fosfolipídica, 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.

*Interacción de IFABP con membranas.* Utilizando una variante de IFABP que carece de región alfa-helicoidal (HL-IFABP) (Cistola et al., 1996), se ha demostrado la importancia crítica del dominio alfa-helicoidal en la interacción de IFABP con membranas y en su mecanismo de transferencia de ácidos

grasos (Wu et al., 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 et al., 2004; Franchini et al., 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 Fosfatidilcolina (PC) (Hsu et al., 1996; Thumser et al., 2000). Esto nos indujo a pensar que las cargas positivas en la superficie de la proteína serían relevantes para el mecanismo de transferencia colisional de IFABP. De hecho, 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 et al., 2005). La sustitución de los residuos de Lys de la región alfa-helicoidal de IFABP nos ha permitido demostrar la gran importancia que tienen las  $\alpha$ -hélice, principalmente la  $\alpha$ -II, en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre la proteína y membranas fosfolipídicas. La neutralización o reversión de carga del dominio  $\alpha$ -helicoidal por sustitución de sus residuos de Lys por Ile o Glu, respectivamente, ocasiona un gran decaimiento en la velocidad de transferencia de los AOFAs hacia membranas zwitteriónicas, efecto que se ve magnificado cuando se sustituye el residuo Lys27 de la hélice  $\alpha$ -II. Resultados que apoyan la hipótesis de que la región portal sufriría un cambio conformacional durante la interacción proteína-membrana, lo que conduciría a la liberación del ácido graso unido y que la hélice  $\alpha$ -II es de particular importancia en establecer interacciones electrostáticas entre la IFABP y la bicapa lipídica.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se han empleado una serie de ensayos que permiten analizar, aunque de una manera indirecta, la posible interacción de las FABPs con membranas. Estos estudios han demostrado que tanto IFABP como LFABP interactuarían con membranas fosfolipídicas, a pesar de tener mecanismos diferentes de transferencia de ligandos (Falomir Lockhart et al., 2011)

#### **4.2.2. Estudios a nivel celular**

Se han realizado estudios empleando distintas líneas celulares de mamífero, en las que se ha modificado el nivel de expresión de I- y LFABP.

La sobreexpresión de LFABP en fibroblastos de ratón (mediante transfección con el cDNA de LFABP) provocó un incremento del 50 % en la absorción de los ácidos grasos y su rápida incorporación en triacilglicéridos y fosfolípidos (Prows et al., 1995). La disminución de la expresión de LFABP en células Caco-2 (modelo de elección para estudiar el metabolismo a nivel intestinal debido a que se expresan muchos de los marcadores específicos de los enterocitos normales) ha permitido observar un descenso dramático en la asimilación de ácidos grasos. A su vez, se han detectado modificaciones en la distribución de ácidos grasos en distintas poblaciones de lípidos.

Los estudios realizados en células en cultivo vinculados con la función de IFABP no son concluyentes. La sobreexpresión de IFABP en fibroblastos de ratón no provocó ningún cambio en la absorción de los ácidos grasos del medio pero se observó un incremento en los niveles citoplasmáticos de triacilglicéridos y ésteres de colesterol (Prows et al., 1995, Prows et al., 1996). Sin embargo, la transfección de células embrionarias con IFABP resultó en un significativo incremento de la absorción de los ácidos grasos del medio (Atshaves et al., 1998).

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 et al., 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 normal arrojaron resultados poco definitorios no observándose diferencias en la esterificación de lípidos, síntesis de lipoproteínas, y ensamblaje de lipoproteínas (Montoudis et al., 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 et al., 2008).

#### **4.2.3. Estudios *in vivo***

La primera evidencia *in vivo* sobre un rol diferencial de las distintas FABP del intestino delgado surge de la directa observación de los diferentes patrones de expresión observados a lo largo del eje céfalo-caudal del intestino de mamíferos (Poirier et al., 1997) y del eje cripta-villosidad (Shields et al., 1986; Halldén et al., 1997); así como también la expresión de LFABP en el hígado en relación con la región de alta metabolización de ácidos grasos de dicho órgano (Bass et al., 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 et al., 1996). Específicamente, el incremento del contenido de grasa de la dieta resultó en un incremento marcado del contenido de FABP citoplasmática de hígado, intestino, corazón y riñón (Veerkamp et al., 1991).

En algunos individuos de la población aborigen Pima de los EEUU, se observó una alta tasa de oxidación de lípidos. Esta diferencia en el metabolismo lipídico fue directamente asociada a una sustitución de un solo aminoácido (Ala54→Thr54) en la secuencia de IFABP (Baier et al., 1995). Esta mutación provoca un aumento en la afinidad por los ácidos grasos dos veces

superior en relación a la proteína nativa. Este hallazgo sugiere que IFABP participaría en la absorción y metabolización de los ácidos grasos en el intestino.

La ablación de los genes que codifican para I- y LFABP ha dado lugar a la generación de ratones *knock-out* embriológicamente viables en ambos casos, 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>) (Newberry et al., 2009) 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, los niveles de colesterol hepático libre se vieron incrementados en la línea knock-out con respecto a la cepa salvaje, con una mayor tendencia a la formación de cálculos biliares (Newberry et al., 2009). En todos los casos se observaron tasas de oxidación de FA mucho más bajas que para la cepa salvaje en idénticas condiciones (Erol et al., 2004; Atshaves et al., 2010).

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 (Lagakos et al. 2009; Vassileva et al., 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 et al., 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 et al., 2008), también habrá que prestar atención a la posible conexión de IFABP y LFABP con este tipo de procesos en el enterocito.





# Objetivos

El objetivo general del proyecto desarrollado en nuestro laboratorio es el análisis de las diferencias estructurales entre I- y L-FABP responsables de las diferencias observadas a nivel funcional, que permitan determinar las funciones específicas de estas dos proteínas en el enterocito. En este trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1- Análisis de cinética de transferencia de diversos ligandos naturales desde LFABP hacia membranas. La enorme plasticidad de LFABP en su capacidad de unir diferentes ligandos hidrofóbicos, induce al análisis de diferencias específicas en las propiedades de binding y transferencia de dichos ligandos hacia membranas, en el marco de la *hipótesis* que indica que *LFABP podría direccionar distintos ligandos hacia diversos destinos intracelulares*. Empleando mutantes de Trp de LFABP sensibles a la unión de la proteína con ácidos grasos y acil-CoAs (Hagan 2005), se planea **analizar las velocidades y mecanismos de transferencias de varios ligandos naturales desde LFABP hacia vesículas artificiales.**

2- Análisis de la interacción de IFABP con membranas. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han permitido caracterizar dominios proteicos y residuos específicos responsables de la cinética de transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas. Estos estudios permiten plantear la *hipótesis* que indica que *IFABP sea una proteína capaz de interactuar físicamente con membranas*. Con la finalidad de analizar en forma directa el mecanismo de dicha interacción, se planean los siguientes objetivos:

- a. **Analizar la capacidad de I-FABP de interactuar con membranas** a través de un método que nos aporte información con respecto al posible mecanismo de la interacción.
- b. Investigar qué **factores modulan dicha interacción.**
- c. Determinar cuáles son los **dominios involucrados en la interacción.**



# Materiales y Métodos

**Biología molecular.** Los primers mutagénicos para la construcción de las proteínas mutantes fueron comprados a Sigma-Aldrich (Argentina). La polimerasa con corrección de prueba Pfx y los desoxido nucleótidos trifosfatados (dNTPs) fueron adquiridos en Invitrogen Life Technologies (USA). Las enzimas de restricción Nde I, Nco I, BamH I, Xba I; el vector de multicopia pGEM-T, el vector de expresión pET-11 d y la T4 DNA ligasa fueron obtenidos de Promega (USA). Los filtros para purificación del DNA fueron Millipore (USA). El kit de purificación de plásmidos fue obtenido de QIAGEN (USA).

**Purificación de Proteínas.** El isopropil  $\alpha$ -D-tiogalactósido (IPTG) para inducción de la expresión en bacterias fue comprado a Promega (USA), las cepas *E. coli* JM109 y BL21 (DE3) fueron adquiridas de Novagen (USA), las matrices para cromatografía Sephadex G-50 y SP Sepharose Fast Flow fueron adquiridas a GE (USA). La resina Lipidex-1000 fue comprada a Sigma-Aldrich (USA).

**Ensayos Bioquímicos y Biofísicos.** El antroiloxi derivado del ácido graso oleico (12-(9-antroiloxi) oléico (12AO)) fue adquirido a Molecular Probes (USA). Los ácidos grasos y sus acil-CoAs: ácido oleico, ácido palmítico, oleoil-CoA y palmitoil-CoA fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Argentina). Los fosfolípidos naturales, modificados y fluorescentes para fabricar las membranas artificiales: fosfatidil colina de huevo (EPC), fosfatidilserina de cerebro porcino (PS), cardiolipina de corazón bovino (CL), 1-Oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina (NBD-PC) y lípidos brominados (16:0-18:0 (6-7BR) PC, 16:0-18:0 (9-10BR) PC y 16:0-18:0 (11-12BR) PC) fueron adquiridos a Avanti Polar Lipids (USA).

# 1. Procedimientos generales

## 1.1. Técnicas de Biología Molecular

### 1.1.1. Minipreparación de Plásmidos.

La obtención de DNA plásmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó según el protocolo que figura en Sambrook et al, (2001). De esta manera se cosechó 1 a 5 ml de cultivo bacteriano fresco (crecido toda la noche a 37°C) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 12000 rpm durante 1-2' a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100 µl de una solución Tris-ClH 25 mM, EDTA 10 mM, pH= 8, agitando en vortex. Se adicionaron 200 µl de una solución NaOH 0,2 M, SDS 1 %, recientemente preparada. Se agitó suavemente por inversión, hasta la disolución del pellet, y se incubó a temperatura ambiente por no más de 5 minutos. Se adicionaron 150 µl de una solución acetato de potasio 5M, ácido acético 11,5% v/v, enfriada en hielo para detener la lisis. Se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionaron 450 µl de fenol-cloroformo (1:1), estabilizado con solución de Tris.HCl 100mM pH 8, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos eliminando así proteínas y restos de lípidos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionó 1 ml de etanol 96 % y se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y se invirtió cuidadosamente el tubo sobre un papel absorbente y se dejó secar a temperatura ambiente. Se disolvió el pellet en 20-50 µl de agua bidestilada estéril y se midió en una dilución apropiada la absorbancia a 280 y 260 nm para evaluar su grado de pureza. Se agregó RNAsa en una concentración aproximada de 20 µg/ml y se guardó a -20 °C. La presencia de plásmidos con los distintos insertos se evidenció mediante una digestión con las enzimas de restricción correspondientes y electroforesis en geles de agarosa.

### **1.1.2. Electroforesis en geles de agarosa.**

Esta técnica fue utilizada en el análisis y separación de fragmentos de DNA en base a su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico. Se preparó una solución de agarosa en un porcentaje adecuado como para resolver el/los fragmentos de interés. En el caso de los plásmidos linealizados se emplearon 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 agregó 1 µl de Bromuro de Etidio de una concentración 10 mg/ml para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador UV.

### **1.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

La técnica utilizada para la extracción de DNA a partir de geles de agarosa fue una adaptación del procedimiento descrito en el manual de DNA Gel Extraction Kit, Millipore. Se cortaron con bisturí las distintas bandas de interés del gel de agarosa bajo luz ultravioleta y se trituró sobre una superficie lisa. Los trocitos de gel fueron depositados en filtros de 0,22 µm, los cuales encastran en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó a 13000 rpm en una microcentrífuga refrigerada durante 10 minutos. Se repitió el procedimiento rehidratando el gel previamente con 200 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Con el volumen eluido se realizó una precipitación con etanol.

### **1.1.4. Precipitación con etanol.**

Para concentrar y/o purificar una muestra de DNA se realizó una precipitación con etanol (Sambrook et al., 2001). Se agregó dos veces el volumen de etanol 96 % y el equivalente al 10 % del volumen de la muestra de una solución acetato de sodio 3M. Se incubó 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos y se removió el etanol. Se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70 %. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos y se removió el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en agua bidestilada estéril y se guardó a -20 °C.

### **1.1.5. Digestión con enzimas de restricción.**

Las enzimas de restricción son elementos útiles debido a su especificidad y a que generan terminales ligables, lo que permite el corte y análisis del DNA. Todas las digestiones fueron realizadas según el siguiente protocolo: 1 a 5 µl de DNA (0.5-1.0 µg), 1 µl 10X Buffer provisto junto con las enzimas a utilizar, 0,1 µl BSA, 0,5 µl de cada enzima a utilizar y H<sub>2</sub>O bidestilada estéril necesaria para completar el volumen. En un volumen final de 10 µl. Se incubó 2 hrs a 37 °C.

### **1.1.6. Ligación.**

Mediante una reacción de ligación, catalizada por la enzima ligasa del fago T4, se favorece la formación de enlaces fosfodiéster, pudiendo unir fragmentos de DNA de distinto origen. Para la ligación, se utilizó una relación inserto/vector 3:1 (mol:mol), 1 µl 10X buffer ligasa provisto junto con la enzima, 1 µl enzima T4 DNA ligasa, H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 10 µl. Las reacciones fueron incubadas durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

### **1.1.7. Obtención de células competentes.**

Este protocolo permite generar y almacenar bacterias competentes. Las mismas han sido utilizadas en las sucesivas transformaciones. Se inocularon 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. Se incubó toda la noche a 37°C, con agitación fuerte. Se diluyeron los 3 ml de cultivo en 100 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte hasta  $DO_{600nm}=0,5$ . Se dejó enfriar depositando el cultivo sobre hielo durante aproximadamente 10-15 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 30 ml de buffer TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicerol 15 %, pH=5,8; esterilizado por filtro de 0,22µM). Se incubó sobre hielo durante 90 minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 4 ml de buffer TFB2

(10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, Glicerol 15 %, pH= 8,0; esterilizado en autoclave). Las bacterias fueron almacenadas a -70°C en alícuotas de 500 µl.

### **1.1.8. Transformación de Bacterias competentes.**

Mediante esta técnica se logra la incorporación de DNA plasmídico en el citoplasma bacteriano. En este trabajo de tesis se han transformado células pertenecientes a distintas cepas de *E. coli*. La cepa JM109, utilizada para obtener masa de plásmido; y la cepa BL21 (DE3), utilizada para obtener masa de proteína. Se tomaron 5 µl de una reacción de ligación y se depositaron en un Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 100 µl del stock de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se aplicó un shock térmico incubando en un baño termostatzado a 42°C durante 50 segundos, seguidos de dos minutos de incubación sobre hielo. Se agregaron 900 µl de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte durante 2 horas a 37°C. Se realizaron al menos dos diluciones del cultivo y se distribuyeron 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. Se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Se seleccionaron varias colonias y se constató la presencia del plásmido mediante una minipreparación de plásmidos. Las bacterias transformadas fueron almacenadas a -70°C con una concentración final de glicerol del 20 %.

## **1.2. Técnicas para análisis de proteínas**

### **1.2.1. Cuantificación de Proteínas.**

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el coeficiente de extinción molar. Se calculó la concentración de la misma aplicando la Ley de Lambert-Beer, midiendo la absorbancia a 280 nm:

$$\text{Abs} = l \times c \times \epsilon$$



Donde  $l$  es el recorrido de la luz,  $c$  es la concentración de la muestra y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la proteína (expresado en  $M^{-1}cm^{-1}$ ).

### 1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método glicina-SDS-PAGE de Laemmli (Laemmli et al., 1970). Se emplearon geles en una concentración de 15 % acrilamida 0,4% bisacrilamida, con un espesor de 0,7 ó 1 mm. Primero se forma el gel de 15% acrilamida donde se resuelven las proteínas y que tiene 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 se logra concentrar la muestra a una banda concentrada de unos pocos mm de espesor debido a los cambios de PH. Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (BioRad) y se corrieron a 140 Volt. La tinción se realizó con una solución 0,1 % Coomasie Blue R-250 en H<sub>2</sub>O:metanol:acético (5:5:2). La decoloración se efectuó con una solución 10 % ácido acético 30 % metanol. Las muestras fueron incubadas, en los correspondientes buffer muestra, durante 5 minutos a 100°C antes de la siembra.

### 1.3. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado como mínimo. En los casos en que no fue así, se lo ha indicado convenientemente. Los resultados se expresan como las medias con sus respectivos desvíos estándares. Las diferencias entre las mismas fueron analizadas estadísticamente con el test “ $t$ ” de Student. En los casos en que fueron necesarios, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Los límites de confianza utilizados se señalan para cada experimento.

## 2. Procedimientos específicos

### 2.1. Diseño y construcción de cDNAs de los mutantes puntuales de triptófano a partir de IFABP salvaje

La construcción de los cDNAs de los mutantes se realizó utilizando el plásmido recombinante pET11d-IFABP, gentilmente donado por los Dres. Alan Kleinfeld y Ron Ogata (Medical Biology Institute, La Jolla, CA, USA). Mediante mutaciones puntuales en la secuencia del gen de IFABP se introdujeron codones que codifican para el aminoácido triptófano en posiciones seleccionadas basándose en la estructura terciaria de la IFABP.

Debido a que la IFABP posee dos triptófanos naturales en su secuencia aminoacídica en las posiciones 6 y 82, sobre el cDNA salvaje se produjeron mutaciones puntuales de modo de sustituir dichos aminoácidos por fenilalaninas, generándose de este modo los cDNAs de tres mutantes, por un lado los cDNAs con un solo triptófano (W6F y W82F), por otro el cDNA en el cual ambos triptófanos fueron cambiados por fenilalaninas (W6,82F), este último se utilizó como molde para incorporar las mutaciones que originaron las proteínas mutantes de interés.

#### 2.1.1. Megaprimer-PCR.

Las mutaciones fueron introducidas utilizando la técnica de megaprimer-PCR descrita por Kammann et al. (1989). Para ello se diseñaron ocho primers: dos de ellos externos a la secuencia completa de los cDNAs y seis primers internos que portan la mutación.

Diseño de primers externos: Teniendo en cuenta que las secuencias que flanquean el cDNAs son las de vector hospedador pET 11-d; se formularon dos primers externos al gen de IFABP:

Externo 1:

Sentido **5' CGGATAACAATTCCCCTCTTA 3'**

Externo 4:

Antisentido **5' TTCCTTTCGGGCTTTGTTAG 3'**

Diseño de primers “mutagénicos” internos: Como criterio general para el diseño de los primers se incorporaron entre ocho y trece bases hacia el extremo 5' y 3' a partir de las mutaciones a introducir excepto en el primer utilizado para la mutación W6F que fue más extenso. Las mutaciones a introducir se muestran subrayadas.

W6F:

Sentido **5' TT ACC ATG GCA TTT GAT GGC ACT TTC AAA GTA GAC C 3'**

W82F:

Antisentido **5' CTC CAT GGT AAA GGT CCC AGT 3'**

F17W:

Antisentido **5' CC CAT TTT CTC CAT CCA CTT TTC ATA G 3'**

L30W:

Antisentido **5' C ATG AGC TCC CCA CTT CCT CTT CAC 3'**

F55W:

Antisentido **5' C ATC AAT GTT TCG CCA GTT GCT TGA TTC 3'**

I114W:

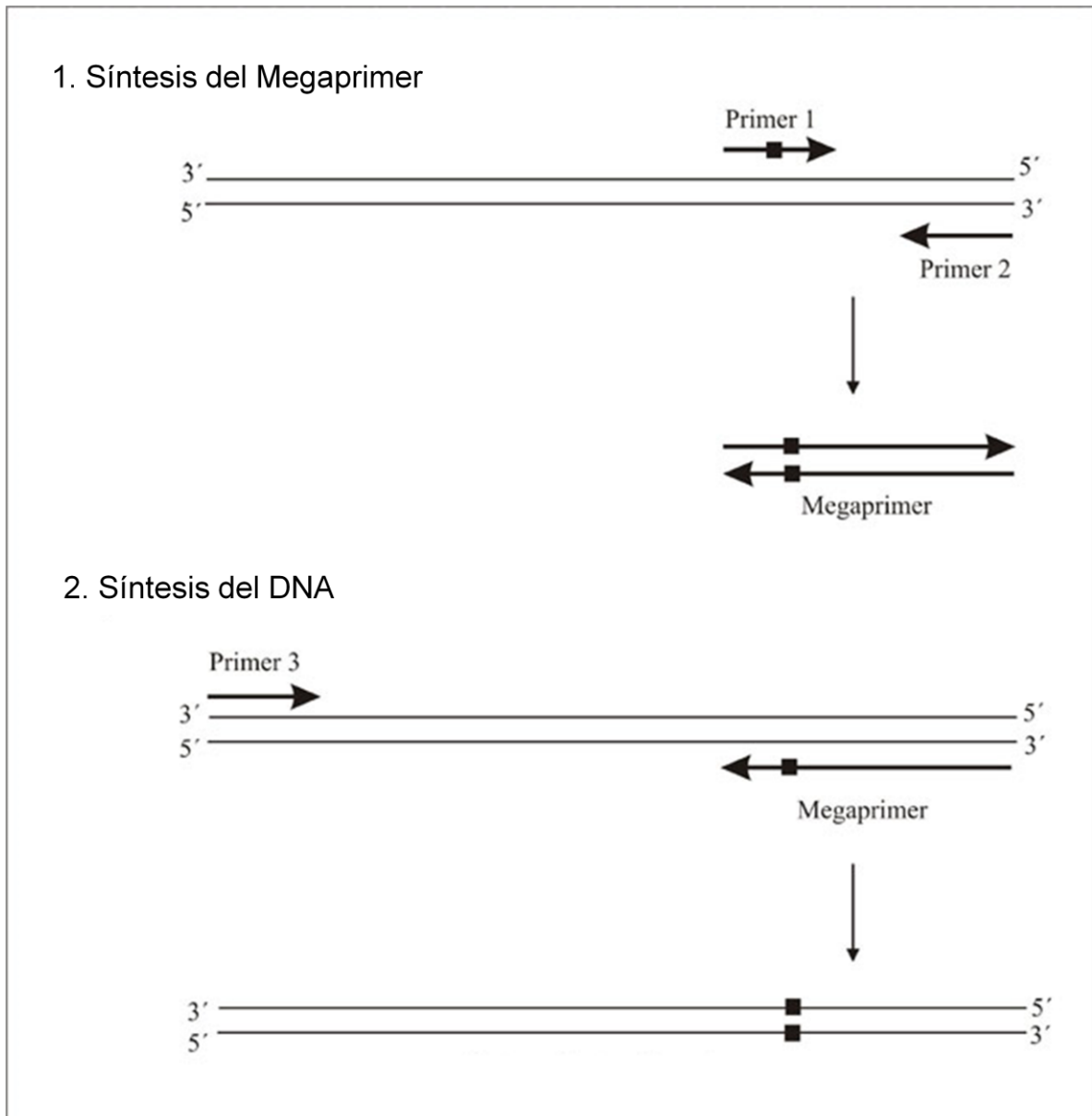
Sentido **5' GGT AAC GAA CTA TGG CAA ACC TAC AC 3'**

En la **Figura 4** se observa un esquema general mostrando de qué manera se introduce una mutación en un fragmento de DNA amplificado por

PCR mediante el método Megaprimer-PCR. El método requiere dos reacciones de PCR. Usando dos primers externos y uno interno que lleva la mutación a introducir. En la primera reacción de PCR, uno de los primers externos y el primer interno se usan para generar el megaprimer. El megaprimer es purificado en gel de agarosa y utilizado junto al otro primer externo en una segunda reacción de PCR para generar el cDNA completo con la mutación deseada.

Se utilizaron las condiciones estándar de PCR apropiadas para la amplificación deseada: 1X Pfx buffer de amplificación provisto con la polimerasa, dNTPs 0,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, 0,3 μM de primers, 0,5-1nM DNA molde, 1 unidad de Pfx DNA polimerasa, H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta un volumen final de 50 μl. El protocolo de tiempo y temperatura fue el siguiente: 2 minutos iniciales a 94°C, seguidos de 35 ciclos (30 seg desnaturalización a 94°C, 30 seg hibridización a una temperatura según el juego de primers a emplear, 90 seg polimerización a 68°C), y finalmente 5 minutos a 68°C.

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 desde 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.



**Fig 4. Técnica de mutagénesis sitio-dirigida.** Esquema del método megaprimer-PCR para la generación de mutantes puntuales. (Kammann et al., 1989).

## 2.2. Purificación de proteínas recombinantes

### 2.2.1. Purificación de las proteínas nativas y los mutantes puntuales.

La purificación de las proteínas se realizó según el método descrito por Hsu et al. (1996). De esta manera 20 ml de cultivo de *E coli* BL21 transformadas en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) fueron incubados toda la noche a 37°C. El cultivo fue diluido 1/100 en el mismo medio e incubado

hasta llegar a una  $DO_{600nm} = 0,6$ . La expresión de las proteínas fue inducida con IPTG 0,4mM (concentración final). Las bacterias se colectaron luego de 4 horas de inducción por centrifugación, y luego de resuspender el pellet en buffer de lisis TEK hipotónico (Tris 10 mM, EDTA 1 mM y KCl 40 mM) se sonicó. Los restos de pared celular fueron descartados centrifugando la muestra a 20000 rpm durante 45 minutos. El sobrenadante fue incubado a 4°C con una solución sobresaturada de  $SO_4NH_4$ , para una precipitación fraccionada de proteínas. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos, se tomó el sobrenadante y se agregaron unas 300.000 cpm de  $[1-^{14}C]$  Palmitato (que se une a la proteína y nos permite seguirla durante la corrida). Se sembró en una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex G-50, eluyéndose con buffer  $KCl.PO_4$  (10 mM fosfatos, 150 mM KCl, pH 7.4). Se colectaron fracciones de 10 ml. Se seleccionaron aquellas fracciones en las cuales se detectó la proteína de interés y se concentró en un dispositivo Millipore. Finalmente se deslipidizó la muestra utilizando una columna Lipidex-1000 (Glatz et al., 1983). La pureza de las proteínas fue constatada mediante SDS-PAGE al 15% y la concentración fue asignada en base a su  $DO_{280nm}$  utilizando su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{IFABP} = 16900$ ,  $\epsilon_{W6F} = \epsilon_{W82F} = \epsilon_{F17W} = \epsilon_{L30W} = \epsilon_{F55W} = \epsilon_{I114W} = 10810$  y  $\epsilon_{W6,82F} = 5120$ ,  $\epsilon_{LFABP} = 6000$ ,  $\epsilon_{L28W} = \epsilon_{M74W} = 9590$ ).

## 2.3. Control de la integridad estructural de las distintas variantes de FABP

### 2.3.1. Determinación del coeficiente de extinción molar.

Se determinó el coeficiente de extinción molar de acuerdo a la técnica descrita por Gill et al. (1989). Se calculó en forma teórica el coeficiente de extinción molar de las proteínas mutantes en una solución de guanidina-HCl 6M. El cálculo se realizó considerando que los únicos residuos que contribuyen significativamente al espectro de absorción en el rango 276-282 son tirosinas, triptofanos y cisteínas (Edelhoch et al., 1967). Se utilizó la fórmula:

$$\epsilon_{M, Gdn.HCl} = a\epsilon_{M, Tyr} + b\epsilon_{M, Trp} + c\epsilon_{M, Cys}$$

donde  $\epsilon_{\text{Tyr}}$ ,  $\epsilon_{\text{Trp}}$ , y  $\epsilon_{\text{Cis}}$  son los coeficientes de extinción molar de residuos tirosina, triptofano y cisteína a la longitud de onda deseada (Gill et al., 1989) y a, b, y c corresponden al número de residuos por molécula de proteína.

El coeficiente de extinción de las distintas proteínas se determinó midiendo el espectro de absorción de las mismas en su estado nativo y desnaturalizado. Dichas mediciones se realizaron en concentraciones idénticas. Los cálculos se efectuaron utilizando la ley de Lambert Beer, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{\text{M,nat}} = (\text{Abs}_{\text{nat}}) (\epsilon_{\text{M,des}}) / (\text{Abs}_{\text{des}})$$

### 2.3.2. 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 fases o, en este caso, de un ligando hidrofóbico por una proteína y una membrana fosfolipídica artificial. El  $K_p$  del ligando 12AO entre FABP y SUV se determinó empleando la técnica de Massey et al. (1997). El  $K_p$  se calculó midiendo la fluorescencia del 12AO luego del agregado de EPC-NBD SUVs a una solución conteniendo la proteína más el ligando fluorescente en una proporción 10:1 ( $\mu\text{M}$ ) en buffer TBS (Tris 40 mM, NaCl 100 mM, pH=7,4). Las medidas de fluorescencia se realizaron a una temperatura de 25°C, con una longitud de onda de excitación 383 nm y se tomaron espectros de emisión entre 400-500 nm.

El  $K_p$  se define como:

$$K_p = \frac{\frac{[\text{FABP} - \text{AOFA}]}{[\text{FABP}]}}{\frac{[\text{SUV} - \text{AOFA}]}{[\text{SUV}]}} \quad (1)$$

donde [FABP-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 determinará una disminución de la fluorescencia inicial de la proteína en presencia del ligando.

El decaimiento en la fluorescencia del 12AO luego de la titulación con EPC-NBD SUV fue ajustado por la siguiente ecuación:

$$F_{rel} = \frac{a \times Kp}{Kp + \frac{[SUV]}{[FABP]}} + b \times \frac{[SUV]}{[FABP]} \quad (2)$$

donde  $F_{rel}$  es la fluorescencia relativa del 12AO con la proteína,  $a$  y  $b$  son parámetros de ajustes. 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.

### 2.3.3. Cálculo de la constante de afinidad.

La constante de afinidad del ligando por la proteína ( $K_d$ ) se calculó mediante titulación fluorimétrica utilizando 12AO como ligando fluorescente según Xu et al. (1991). En esta técnica se monitorea el incremento de la fluorescencia de un ligando fluorescente como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de proteína, con el objetivo de determinar su afinidad por el mismo. Se determinó la concentración del ligando 12AO por absorbancia usando  $\epsilon_{383nm} = 6400 \text{ M}^{-1}$  en etanol absoluto. Se preparó una dilución  $0,5 \mu\text{M}$  del ligando en buffer TBS en una cubeta de cuarzo. Se agregaron cantidades crecientes de la proteína en un rango de 0 a  $10 \mu\text{M}$ , se incubó por 3 minutos y se midió la fluorescencia del 12AO. Las medidas de fluorescencia se realizaron a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , excitando a 383 nm y midiendo espectros de emisión entre 400-500 nm. Los datos fueron analizados según Scatchard para obtener los respectivos valores de  $K_d$ . Además se extendió el análisis por el método de ajuste no lineal empleando la ecuación cuadrática para un único sitio de unión (Miller et al., 1983):



$$PL = \frac{(P_0 + L_0 + Kd) - \sqrt{(P_0 + L_0 + Kd)^2 - 4xP_0xL_0}}{2} \quad (3)$$

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

$$Y = Y_p \times (P_0 - PL) + Y_{pl} \times PL + Y_l \times (L_0 - PL) \quad (4)$$

donde  $Y_p$  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 realizó empleando el módulo *Solver* del Excel MS Office, que minimiza el error cuadrático medio entre los datos y la curva del modelo.

#### 2.3.4. Espectros de dicroísmo circular (CD).

Se midieron espectros de CD en el UV lejano con el objetivo de evaluar los componentes de estructura secundaria de los diferentes mutantes. 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 (190-240 nm) midiendo en cubetas de 1 mm una suspensión de proteína 40  $\mu$ M. Se toman 5 espectros para cada proteína, incluyendo la proteína nativa, y se promedian. 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.

## 2.4. Preparación de membranas artificiales

### 2.4.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas de acuerdo a los trabajos de Huang et al. (1974) y Storch et al. (1986). Los lípidos en  $CHCl_3$

fueron mezclados, secados bajo  $N_2$  y resuspendidos en buffer TBS. Para las vesículas que contenían CL se utilizó buffer TBS 1 mM EDTA. La mezcla de fosfolípidos fue sonicada a  $4^\circ C$  bajo  $N_2$  hasta clarificar la suspensión (aproximadamente 45 minutos). Las vesículas son clasificadas por ultracentrifugación a 45.000 rpm durante 45 minutos y se guardan sólo las SUV del sobrenadante a  $4^\circ C$  en una atmósfera de  $N_2$ . La concentración de las SUV obtenidas se calcula en base al ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico.

Se prepararon vesículas estándar con una composición de 100 mol % fosfatidilcolina de huevo (EPC), 90 mol % EPC y 10 mol % NBD-PC (quencher de la fluorescencia de los antioiloxiderivados de ácidos grasos (AOFA)). Para incrementar la densidad de la carga negativa de las vesículas aceptoras, se incorporaron distintos porcentajes de fosfatidil serina (PS) o cardiolipina (CL) en las SUV.

#### **2.4.2. Vesículas unilamelares grandes (LUV).**

Se prepararon vesículas unilamelares grandes constituidas por bromolípidos por extrusión según la técnica descrita en Córscico et al. 2001. Los bromolípidos en  $CHCl_3$  fueron mezclados, secados bajo  $N_2$  y resuspendidos en buffer TBS, de la misma manera que se realizó para las SUV. Para las vesículas que contenían un 25% de CL se utilizó buffer TBS con 1 mM EDTA. A continuación, la suspensión con los distintos bromolípidos se extruyeron empleando un filtro de policarbonato  $0,1 \mu m$  utilizando un extrusor Liposofast (Avestin, Canada).

#### **2.4.3. Cuantificación de membranas artificiales.**

La concentración de los fosfolípidos fue determinada por un ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico según la técnica de Gomori et al. (1942). La curva estándar se preparó empleando  $NaH_2PO_4$  1mM. Las muestras y los estándares se prepararon por duplicado. Se agregaron  $30 \mu l$  de  $Mg(NO_3)$  al 10% y se carbonizó bajo llama. A continuación se agregaron  $400 \mu l$  de HCl 0,5 N agitando en vortex. Los tubos se incubaron por 30 minutos en baño de agua hirviendo. Terminada la incubación, se agregó a cada tubo  $930 \mu l$  de una solución 1:6 (vol/vol) de ácido ascórbico (10% peso/vol): ácido molíbdico. Las

muestras se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 820 nm. La concentración de las vesículas que contenían CL en su composición fue 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.

## **2.5. Transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) desde FABP hacia SUV**

Se realizaron ensayos de transferencia de energía de resonancia para estudiar la transferencia de AOFA desde distintas FABP hacia membranas artificiales aceptoras siguiendo la técnica descrita por Storch et al. (1990). El NBD contenido en las vesículas aceptoras es un quencher de la fluorescencia del grupo antroilo de los AOFA, provocando entonces, una disminución en la fluorescencia de este último cuando se transfiere desde las FABP hacia las SUV. Las distintas FABP fueron incubadas con los AOFA durante aproximadamente 10 minutos para permitir que la formación del complejo proteína-ligando llegue al equilibrio. El complejo FABP-AOFA fue mezclado con vesículas aceptoras utilizando un espectrofluorómetro con módulo de stopped flow (Applied Photophysics Limited, UK). La transferencia del ligando fluorescente desde las FABP hacia membranas fue seguido como el decaimiento en la fluorescencia del AOFA en el tiempo.

En los experimentos en general, 10-30  $\mu\text{M}$  FABP fueron incubados con 1-3  $\mu\text{M}$  AOFA a temperatura ambiente durante 10 minutos previos a iniciar las mediciones. El AOFA fue agregado de una solución stock concentrada en etanol, quedando una concentración final de etanol en el medio <1% (v/v). Se estimó que en una proporción de 10:1 FABP:AOFA, un 95 % del ligando se hallaba ligado a la proteína (Hsu et al., 1996). Las condiciones finales de los experimentos fueron: 5-15  $\mu\text{M}$  FABP más 0,5-1,5  $\mu\text{M}$  AOFA vs 150-1200  $\mu\text{M}$  SUV. El buffer utilizado en los experimentos fue TBS y la temperatura utilizada en todos los experimentos fue de 25 °C.

La variación de la fluorescencia en el tiempo fue analizada ajustando los datos obtenidos a una curva de tipo exponencial simple negativa:

$$F(t) = A x e^{-bxt} + C \quad (5)$$

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  $\text{seg}^{-1}$ .

### **2.5.1. Efecto de la concentración de las vesículas aceptoras.**

Para analizar el efecto de la concentración de las vesículas zwitteriónicas, 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. Las concentraciones empleadas de vesículas aceptoras van desde 300 a 900  $\mu\text{M}$ .

### **2.5.2. 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 fijó la concentración final de las SUV a 300  $\mu\text{M}$  y se emplean SUV de distinta composición. El ensayo se repite con SUV zwitteriónicas (carga nula), con SUV que poseen un 25% PS (una carga superficial negativa), y con SUV que poseen un 25% CL (dos cargas negativa por molécula de fosfolípido).

### **2.5.3. Efecto de la fuerza iónica del medio.**

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 et al., 1982; Constantinides et al., 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 entre la proteína y las vesículas no sería mayormente afectado (Kim et al., 1992).

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 300  $\mu$ M y se varía la fuerza iónica del buffer entre 0 y 2000 mM NaCl.

## **2.6. Ensayos empleando ligandos naturales**

### **2.6.1. Cálculo de la constante de afinidad de LFABP por ligandos naturales.**

Para determinar el  $K_d$  de LFABP por ligandos naturales (ácido oleico, ácido palmítico y sus respectivos acil-CoAs) se emplearon mutantes puntuales de triptófanos cedidos gentilmente por el Dr. David Wilton (mutantes L28W y M74W) cuya intensidad de emisión fluorescente es sensible a la unión de los ligandos (Hagan et al., 2005). Se preparó una dilución 2  $\mu$ M del mutante L28W en buffer TBS en una cubeta de cuarzo. Se agregaron cantidades crecientes de los ligandos en un rango de 0 a 5  $\mu$ M, se incubó por 3 minutos y se midió la fluorescencia excitando a 280nm y midiendo los espectros de emisión entre 300-400nm. Para el oleoil-CoA se empleó el mutante M74W que demostró ser más sensible a este ligando, preparándose un dilución 1  $\mu$ M de M74W y agregando concentraciones crecientes del ligando hasta 10  $\mu$ M. Las medidas de fluorescencia se realizaron a una temperatura de 25°C. Los datos se analizaron como se describió previamente.

### 2.6.2. Cálculo del coeficiente de partición (Kp) de ligandos naturales entre LFABP y SUVs.

El Kp se determinó siguiendo la fluorescencia del triptofano luego del agregado de EPC-SUVs a una solución conteniendo la proteína con el ligando. Las condiciones iniciales para cada ensayo fueron: 5  $\mu\text{M}$  L28W and 0.5  $\mu\text{M}$  ácido oleico o palmítico, 20  $\mu\text{M}$  L28W y 7  $\mu\text{M}$  palmitoil-CoA, y 20  $\mu\text{M}$  M74W con 7  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA.

El Kp fue calculado ajustando la siguiente ecuación a los datos experimentales:

$$F_{rel} = \frac{a \times Kp}{Kp + \frac{[SUV]}{[FABP]}} + b \times \frac{[SUV]}{[FABP]} \quad (6)$$

donde  $F_{rel}$ , [SUV], [Prot], Kp, a y b son fluorescencia relativa, concentración molar de SUV, concentración molar de proteína, constante de partición y parámetros de ajuste, respectivamente.

En el caso de la partición de oleoil-CoA entre M74W y SUVs, la ecuación fue la siguiente:

$$F_{rel} = \frac{a \times [SUV]}{Kp \times [FABP] + [SUV]} + b \times [SUV] \quad (7)$$

### 2.6.3. Transferencia de ligandos naturales desde FABP hacia SUV.

Las condiciones de los ensayos fueron establecidas empleando los valores de Kd y Kp, previamente obtenidos, de la siguiente manera: Kd fue usado para asegurar que más del 96% del ligando se encuentra unido a la proteína, y Kp para determinar que la relación proteína:SUV es suficiente para asegurar la unidireccionalidad de la transferencia desde la proteína hacia las SUVs.

La transferencia de ácido oleico, ácido palmítico y palmitoil-CoA desde la proteína hacia membrana es directamente monitoreada por el decaimiento en el tiempo de la fluorescencia del triptófano (mutante L28W), mientras que la

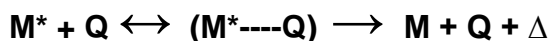
transferencia del oleoil-CoA es evidenciada por un incremento en la fluorescencia del triptófano (M74W). Diferentes concentraciones de proteína y ligando fueron utilizadas debido a las diferentes afinidades de cada uno de ellos por la proteína. Las condiciones finales fueron: 5  $\mu\text{M}$  L28W con 5  $\mu\text{M}$  de ácido oleico o palmítico, 12  $\mu\text{M}$  L28W con 4  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA o 15  $\mu\text{M}$  M74W con 4  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA, enfrentadas contra 150 a 900  $\mu\text{M}$  de vesículas aceptoras en TBS buffer.

Para analizar la dependencia de la velocidad de transferencia con la carga superficial de la membrana, SUVs con 25% de fosfolípidos cargados negativamente fueron empleados. También se analizó el efecto de la fuerza iónica sobre la cinética de transferencia variando la concentración de NaCl de 0 a 2 M.

Todas las curvas fueron ajustadas por una simple exponencial. Para cada condición experimental, se realizaron al menos cinco replicados. Valores promedios de tres o más experimentos individuales son reportados.

## 2.7. Ensayos de quenching por acrilamida de los mutantes puntuales de IFABP

La acrilamida es un “quencher” de triptófano ampliamente utilizado. Por ser soluble en medio acuoso, puede emplearse para determinar el grado de exposición al solvente de los residuos de triptófano analizados en la proteína. La reacción de quenching involucra un contacto físico entre el “quencher” y el anillo indol y puede representarse por el siguiente esquema:



(M\*----Q) es el complejo formado entre M\* y el Q, este complejo luego se disocia y disipa la energía del estado excitado como calor. El quenching de los triptófanos fue analizado utilizando la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{sv} \times [Q] \quad (8)$$

donde  $F_0$  y  $F$  es la intensidad en la fluorescencia en ausencia y presencia del quencher, respectivamente,  $K_{sv}$  es la constante de quenching y  $[Q]$  es la concentración del quencher.

El stock de acrilamida utilizado fue una solución acuosa de 5 M. Sobre una dilución 5  $\mu$ M de cada uno de los mutantes se agregó acrilamida creciente hasta 400 mM. Se excitó a 295nm y se midió la emisión entre 300-400nm. Se dejó incubar tres minutos luego de cada agregado de acrilamida.

## 2.8. Determinación de la profundidad de penetración en membranas lipídicas de los mutantes puntuales de IFABP empleando el método de parallax quenching

La ecuación de quenching de Perrin, utilizada para analizar quenching estáticos de un fluoróforo y un quencher distribuidos al azar, puede ser extendida para el análisis de quenching en membranas. Considerando al quencher y al fluoróforo en dos planos separados a una distancia  $Z$ , distribuidos al azar dentro de cada plano. El quenching de un fluoróforo en un plano (profundidad) dentro de una membrana con un quencher en otro plano paralelo estaría dado por:

$$\frac{F}{F_0} = e^{-\pi[\sqrt{Rc^2 - Z^2}]^2} = e^{-\pi Rc^2 C + \pi Z^2 C} \quad (9)$$

cuando  $Z < Rc$ , donde  $F$  es la fluorescencia de la muestra conteniendo el fluoróforo y el quencher,  $F_0$  es la fluorescencia de la muestra conteniendo el fluoróforo pero no el quencher,  $Z$  es la distancia entre los planos que contienen al fluoróforo y al quencher, y  $C$  es la concentración del quencher en moléculas de quencher por  $\text{Å}^2$  de membrana (calculada como: fracción molar de lípido quencher en total lípido/70  $\text{Å}^2$ , asumiendo la usual área superficial de 70  $\text{Å}^2$  por lípido) (Chattopadhyay & London et al., 1987). La expresión  $(Rc^2 - Z^2)^{1/2}$  de la



ecuación da el radio del área circular quencheada por cada quencher dentro del plano que contiene al fluoróforo.  $F/F_0=1$  cuando  $Z>R_c$ .

Si el quenching es medido en dos ensayos, uno con un quencher ubicado en una localización poco profunda en la membrana (quencher 1) y un segundo ensayo con un quencher más profundo (quencher 2), entonces la relación de la fluorescencia entre los dos ensayos estaría dada por:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{e^{-\pi R_c^2 C + \pi Z_{1f}^2 C}}{e^{-\pi R_c^2 C + \pi Z_{2f}^2 C}} \quad (10)$$

donde  $F_1$  es la fluorescencia en presencia del quencher mas superficial,  $F_2$  es la fluorescencia en presencia del quencher mas profundo,  $Z_{1f}$  es la distancia entre el plano del fluoróforo y el plano donde se encuentra el quencher mas superficial,  $Z_{2f}$  es la distancia entre el plano del quencher mas profundo y el fluoróforo. Si la localización de los quenchers es conocida, la ecuación puede ser reordenada a la siguiente expresión:

$$Z_{cf} = L_{c1} + \left[ \frac{-\ln\left(\frac{F_1}{F_2}\right)}{\pi C} - L_{12}^2 \right] / 2L_{12} \quad (11)$$

donde  $Z_{cf}$  es la distancia transversal desde el plano del centro de la bicapa al plano conteniendo el fluoróforo,  $L_{c1}$  es la distancia transversal desde el centro de la bicapa al quencher superficial, y  $L_{12}$  es la distancia transversal entre el quencher profundo y el quencher superficial.

Para los ensayos se preparó una dilución 5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los mutantes puntuales de triptófano de IFABP en TBS en cubetas de cuarzo en un volumen final de 1 ml. Se agregó concentración creciente desde 0 hasta 42  $\mu\text{M}$  de LUVs preparadas con lípidos brominados (100%). Los lípidos empleados fueron 1-palmitoyl-2-(6,7-dibromo)stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine [(6-7BR)PC], 1-palmitoyl-2-(9,10-dibromo)stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine [(9-10BR)PC] y 1-palmitoyl-2-(11,12-dibromo)stearoyl-*sn*-glycero-3-

phosphocholine [(11-12BR)PC]. Se dejó incubar tres minutos y se midió el espectro de emisión entre 310-400nm excitando a 295nm.

Para el cálculo de la profundidad de penetración del triptófano en la membrana se realizó un promedio de las profundidades calculadas con la ecuación 11 de los pares (6-7BR)PC y (9-10BR)PC, y los pares (6-7BR)PC y (11-12BR)PC. Para estudiar como la carga afecta la interacción de la proteína con la membrana, se construyeron vesículas 25%Cl-75%BrPC en TBS 1mM EDTA. Como control se usaron vesículas 25%EPC-75%BrPC.

Para analizar el efecto de la fuerza iónica sobre la interacción proteína-membrana, se enfrentó a los mutantes de triptófano versus 100% BrPC en diferentes concentraciones de ClNa (500, 750 y 1000 mM).



# Resultados y Discusión

## 1. Unión y transferencia de ligandos naturales desde la proteína que une ácidos grasos de hígado (LFABP) hacia membranas

La LFABP, como ya se ha mencionado anteriormente, posee características particulares dentro de la familia de las FABP. Posee dos sitios de unión para ácidos grasos (Thompson et al., 1997; He et al., 2007), es capaz de unir una gran variedad de ligandos hidrofóbicos además de LCFAs como, por ejemplo, acil-CoAs y sales biliares (Wilkinson et al., 1987; Burrier et al., 1987; Thumser et al., 1994) y muestra un mecanismo “difusional” de transferencia de ligandos desde la proteína hacia membranas (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008). Estas características convierten a la LFABP en un objeto de estudio particularmente interesante.

La sustitución de un residuo en la región portal de LFABP por un Triptófano ha generado variantes de la proteína cuya intensidad de emisión fluorescente es muy sensible a la unión de ligandos. Estos mutantes mantienen tanto su integridad estructural como su capacidad de unión a ligandos (Hagan et al., 2005). La unión de ácidos grasos y palmitoil-CoA al mutante L28W produce un aumento en la intensidad de fluorescencia del triptófano incorporado, y se ha propuesto que este aumento en la fluorescencia es causado por cambios conformacionales en el sitio 2 de LFABP que reducen el quenching que producen sobre el Trp grupos polares cercanos. Por otro lado, la reducción de la intensidad de fluorescencia del mutante M74W ocasionada por la unión del oleoil-CoA se ha relacionado al hecho de que el pirofosfato del grupo CoA se encuentra adyacente a la posición 74 proporcionando un entorno de quenching al Trp allí localizado. La sensibilidad mostrada por estas LFABP mutantes a la interacción con lípidos nos permitió monitorear directamente la transferencia de ligandos naturales desde la proteína hacia membrana. Los triptófanos introducidos reportan acerca del segundo sitio de unión al ligando,

localizado dentro de la región portal, en el cuál el ácido graso es unido con menor afinidad (Thompson et al., 1997; He et al., 2007).

Como ya se ha mencionado, la caracterización funcional *in vitro* del mecanismo de transferencia de análogos fluorescentes de ácidos grasos desde LFABP hacia membranas fosfolipídicas se realizó mediante ensayos de FRET (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008). Dichos estudios han demostrado que, en concentraciones de NaCl fisiológicas, la transferencia de análogos fluorescentes de ácidos grasos desde LFABP a membranas parece transcurrir a través de un mecanismo de difusión acuosa, mientras que la transferencia empleada por otros miembros de la familia de las FABP ocurre por medio de un mecanismo colisional en el cuál sería necesario un contacto físico entre la proteína y la membrana (Wootan et al., 1994; Herr et al., 1996; Hsu et al., 1996; Córscico et al., 1998; Thumser et al., 2001; Falomir-Lockhart et al., 2011).

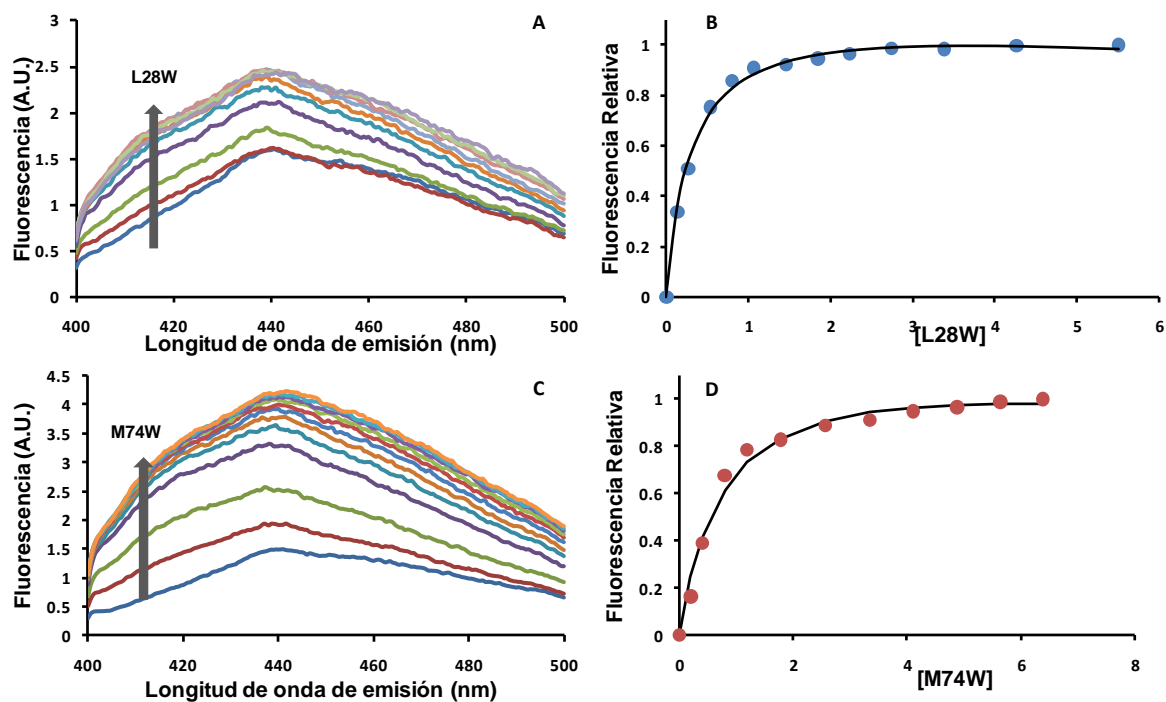
La posibilidad de contar con variantes de LFABP sensibles a la unión del ligando ha posibilitado, por primera vez, estudiar la capacidad de LFABP para transferir una gran variedad de ligandos fisiológicos hacia membranas haciendo uso de las variaciones en la intensidad de fluorescencia del Trp causadas por la liberación del ligando cuando la proteína es enfrentada con membranas modelo. De esta manera es posible determinar los parámetros cinéticos de transferencia de ligandos naturales desde LFABP hacia membranas.

### **1.1. Unión de antroiloxi-derivados de ácidos grasos**

Para confirmar que las mutaciones introducidas en la LFABP no produjeron cambios en la funcionalidad de los mutantes en relación a la proteína nativa, se determinó la constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo proteína-ligando empleando análogos fluorescentes de ácidos grasos (AOFA) y se comparó el valor de  $K_d$  obtenido para los mutantes con el obtenido para la LFABP salvaje (wtLFABP). El AOFA empleado fue el antroiloxi derivado del ácido oleico (12AO). La fluorescencia del grupo antroiloxi se incrementa marcadamente cuando se introduce en un entorno hidrofóbico como lo es el

dominio de unión de la LFABP. Este aumento en la fluorescencia es una medida directa de la unión del ligando a la proteína y permite el seguimiento de la formación del complejo LFABP-ligando y obtener, de este modo, el valor de  $K_d$ . A pesar de que LFABP posee dos sitios de unión para ácidos grasos, los resultados obtenidos para el 12AO muestran una estequiometría 1:1, posiblemente debido a impedimentos estéricos ocasionados por el voluminoso grupo antroiloxi que impediría la entrada de una segunda molécula. El valor de  $K_d$  obtenido para el equilibrio entre el 12AO y los mutantes L28W y M74W fueron de  $0.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$  y  $0.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ , respectivamente. Los valores de  $K_d$  obtenidos para los mutantes son similares a los hallados para wtLFABP ( $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), lo que demuestra que no existe un cambio significativo en la afinidad de los mutantes por el ligando estudiado. En la **Figura 5** se muestran los espectros de un ensayo representativo para L28W (panel **A**) y M74W (panel **C**), y el ajuste no lineal para un sitio de unión por molécula de proteína para L28W (panel **B**) y M74W (panel **D**).

Asimismo, la intensidad de máxima fluorescencia de emisión del 12AO unido a wtFABP y a los mutantes es a 442nm, lo que indicaría que no se produjo un cambio significativo en la polaridad de la cavidad de unión.

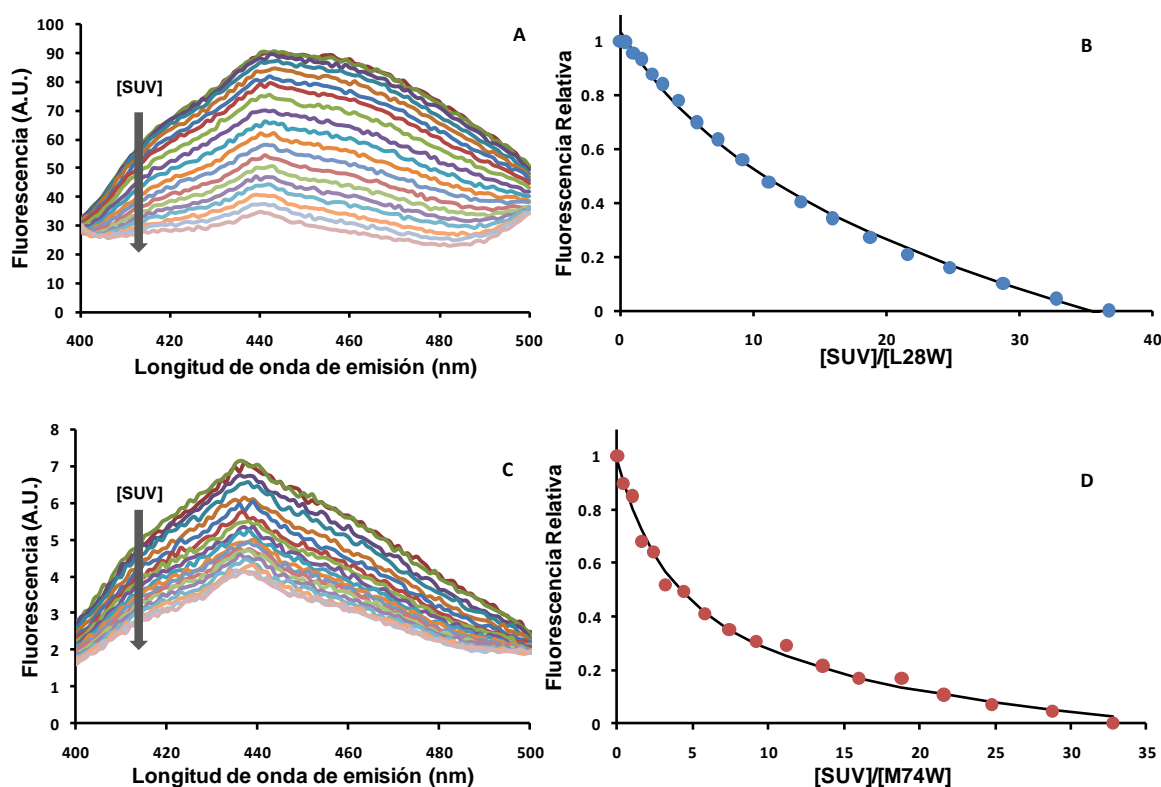


**Fig 5. Titulación fluorimétrica del 12 AO.** Aumento de la fluorescencia del 12AO con cada agregado de L28W (A) o M74W (C). La fluorescencia a 450nm se empleó para calcular el Kd. En las figuras B y D se observa el ajuste no lineal que describe la unión del ligando a un solo sitio de la proteína para L28W y M74 W, respectivamente.

## 1.2. Partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos

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 6** se muestra un ensayo representativo de la titulación del complejo L28W-12AO ó M74W-12AO preformado con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo el quencher NBD-PC (panel A y C), y el ajuste empleado para el cálculo del valor de Kp como se describe en materiales y métodos (panel B y D). Ambos mutantes mostraron valores de Kp similares al de la proteína nativa, evidenciando una preferencia del 12AO por la proteína respecto a las membranas fosfolipídicas, en concordancia a los valores publicados anteriormente ( $K_{pL28W} = 14.2 \pm 0.9 \mu\text{M SUV}/\mu\text{M Prot}$ ,  $K_{pM74W} = 7.4 \pm 0.7 \mu\text{M SUV}/\mu\text{M Prot}$ ,  $K_{p_{wt}LFABP} = 11 \pm 6 \mu\text{M SUV}/\mu\text{M Prot}$ ) (Franchini et

al. 2008). Estos resultados muestran que el sitio de unión no ha sufrido alteraciones conformacionales significativas y, además, que pueden emplearse las mismas proporciones de SUV:proteína para configurar los ensayos de transferencia de los ligandos que para la proteína nativa.



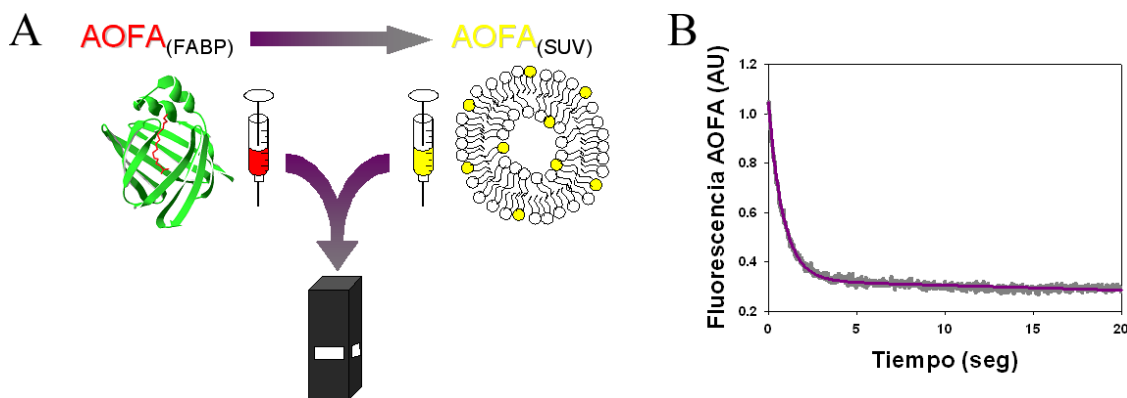
**Fig 6. Determinación de la constante de partición del 12 AO entre la proteína y EPC-SUV.** Titulación fluorométrica del complejo L28W/12AO (A) o M74W/12AO (C) con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo un 10 mol % de NBD-PC, que actúa como aceptor FRET del grupo antroiloxi. La fluorescencia a 450nm se empleó para calcular el Kp. En las figuras B y D se observa el ajuste de los datos experimentales mediante fórmulas descritas en materiales y métodos.

### 1.3. Transferencia de 12 AO desde los mutantes puntuales de LFABP

Se estudió el efecto de las mutaciones sobre las propiedades de transferencia de ligandos hacia membranas fosfolipídicas artificiales. Empleando un ensayo de FRET (Figura 7), se analizó la transferencia del



antioiloxi-derivado del ácido oleico (12AO) hacia vesículas fosfolipídicas, que contienen el aceptor FRET NBD-PC, a distintas concentraciones para determinar si las mutaciones introducidas afectaron el mecanismo de transferencia.

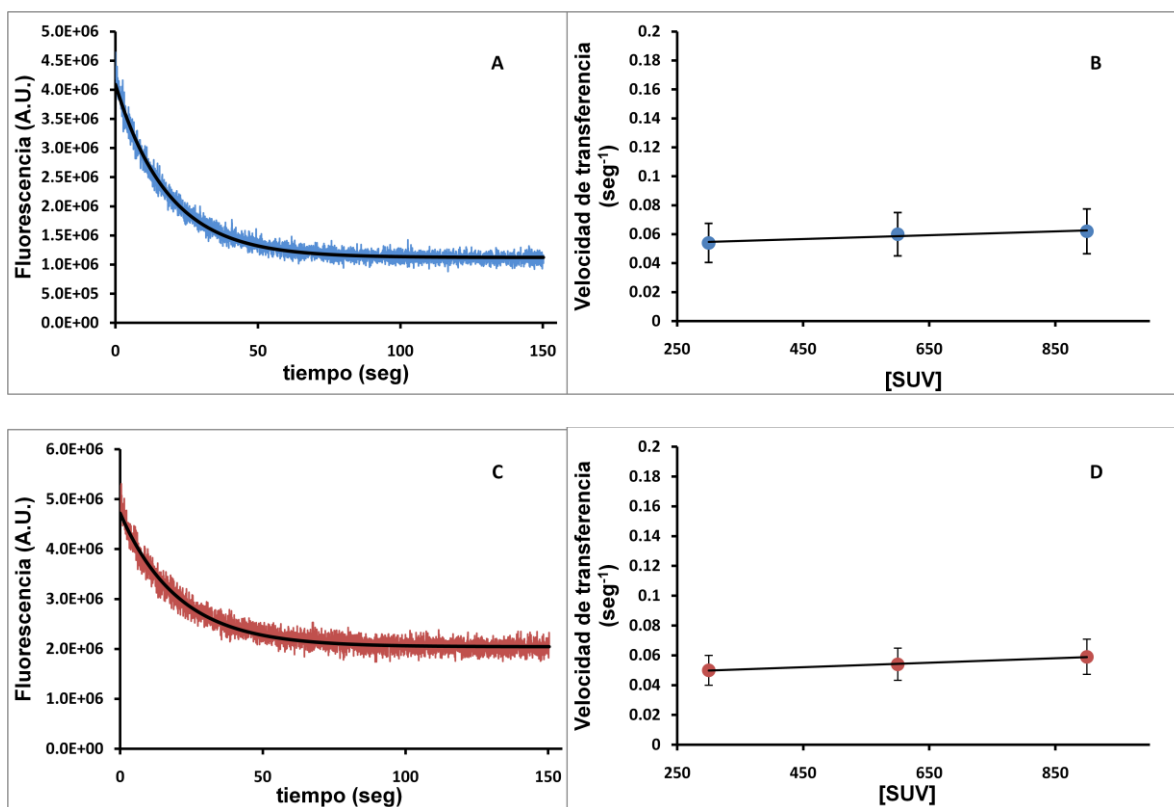


**Fig 7. Ensayo de transferencia de AOFA.** En el panel **A** se muestra un esquema del ensayo cinético de transferencia de energía de resonancia que permite analizar la transferencia de derivados fluorescentes de FA entre FABP y membranas modelo. El panel **B** muestra los datos de fluorescencia en 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

Un aumento proporcional en la velocidad de transferencia en función de la concentración de SUV es referido a un mecanismo “colisional” de transferencia donde la etapa limitante es la interacción efectiva entre la proteína y la membrana, y es diferente del mecanismo “difusional”, en el cual la etapa limitante de la velocidad es la disociación del complejo proteína-ligando y no se observa un incremento proporcional en la velocidad a mayor concentración de SUV (Córsico et al., 1998; Córsico et al., 2004; Córsico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al, 2006; Franchini et al., 2008). Para distinguir entre ambos mecanismos, se examinó la transferencia de AOFA desde las proteínas mutantes hacia membranas zwitteriónicas en función de la concentración creciente de SUV y se comparó con el comportamiento que muestra la proteína nativa de LFABP.

Los resultados obtenidos cuando a una concentración fija del complejo proteína-ligando se la enfrentó con concentraciones crecientes de EPC-SUV (**Figura 8**), no muestran un incremento significativo en la velocidad de transferencia (conforme al análisis de varianza de Fisher). Estos resultados

confirman que los mutantes de LFABP mantienen el mecanismo difusional de transferencia del 12AO hacia membrana y, a su vez, los valores (**Tabla III**) se encuentran en el mismo orden que los obtenidos para la transferencia del 12AO desde la wtLFABP que es de  $0.03 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  cuando se enfrentan a  $300\mu\text{M}$  de SUVs (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008).



**Fig 8. Efecto de la Concentración de SUV sobre la velocidad de transferencia de AOFA.** Curva representativa de la transferencia del 12 AO desde L28W (**A**) o M74W (**C**) hacia membranas NBD-EPC. La velocidad de transferencia no se ve afectada por la concentración de las vesículas aceptoras ( $300\text{-}900 \mu\text{M}$ ) como se ve en las figuras **B** y **D** (L28W y M74W, respectivamente).

**Tabla III.** Velocidades de transferencia de 12AO para los mutantes de LFABP

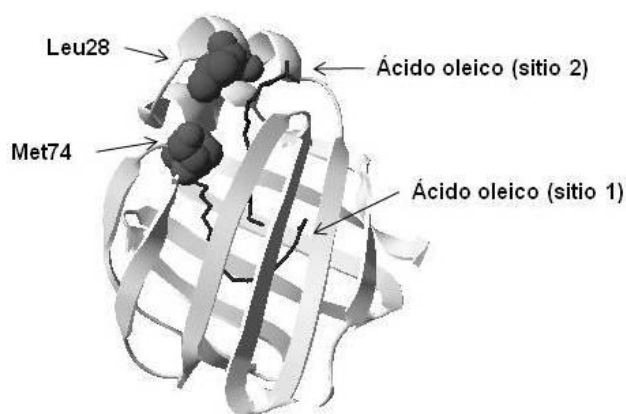
Mutante LFABP	Concentración de vesícula		
	300 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M}$	900 $\mu\text{M}$
<b>L28W</b>	$0.05 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.02$
<b>M74W</b>	$0.05 \pm 0.01$	$0.05 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.01$

Los datos son el promedio  $\pm$  desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos independientes

Los resultados obtenidos en 1.1, 1.2 y 1.3 muestran que la unión, partición y transferencias de AOFA están en el mismo orden que aquellos obtenidos para la proteína salvaje. Esto indica que la sustitución de Trp por Leu y Trp por Met en las posiciones 28 y 74, respectivamente, no han introducido cambios en las propiedades biofísicas analizadas. Estos resultados junto a los obtenidos de los experimentos de dicroísmo circular (Hagan et al., 2005) sugieren que las mutaciones introducidas en la región portal no han generado cambios significativos en la conformación de la proteína.

#### 1.4. Unión de ligandos naturales

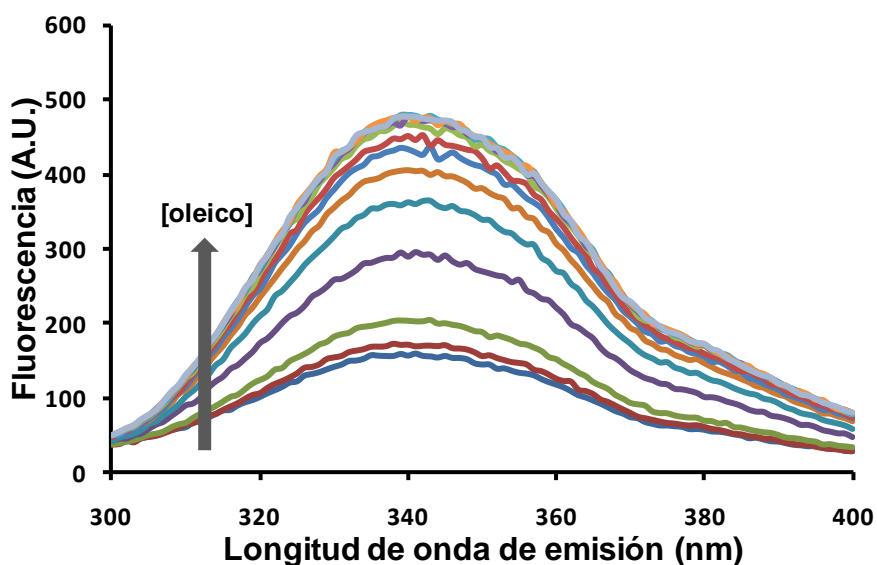
LFABP presenta dos sitios de unión para los ácidos grasos, un sitio de alta afinidad (sitio 1) ubicado en el core hidrofóbico del barril beta y un sitio de menor afinidad (sitio 2) ubicado en la región portal y en el cuál el grupo carboxílico del ácido graso unido queda expuesto al solvente (**Figura 9**).



**Fig 9. Esquema de LFABP con dos ligandos unidos** (Código 1LFO). Representación de LFABP donde se muestran las posiciones 28 y 74 y la ubicación de los ácidos oleicos unidos.

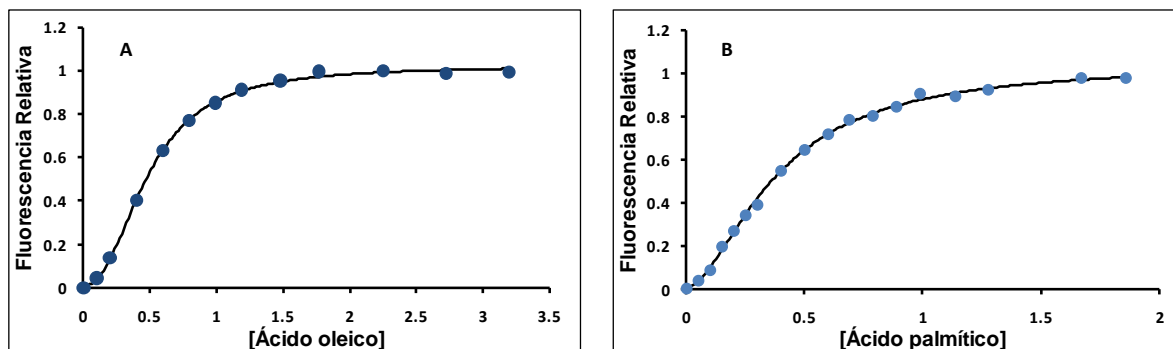
El mutante L28W exhibe una baja intensidad de emisión fluorescente cuando es excitado a 280nm (Hagan et al., 2005), lo que da indicios de que el triptófano estaría siendo quencheado por un grupo polar dentro de la apoproteína. Un análisis de la estructura de la proteína sugiere que los residuos en las proximidades de la Tyr-54 y el turn  $\beta C\beta D$  están colocados

adecuadamente para interactuar con el Trp-28 y provocar el quenching de su fluorescencia. La unión de ligandos al mutante produce un aumento en la intensidad de fluorescencia del triptófano (**Figura 10**) probablemente debido a que esta unión produce un cambio en la conformación del sitio 2 de la proteína lo que reduciría el quenching del triptófano por el alejamiento de los residuos con los cuales interacciona.



**Fig 10. Espectro de emisión del mutante L28W.** El agregado de ácido oleico produce un incremento en la intensidad de fluorescencia del triptófano 28.

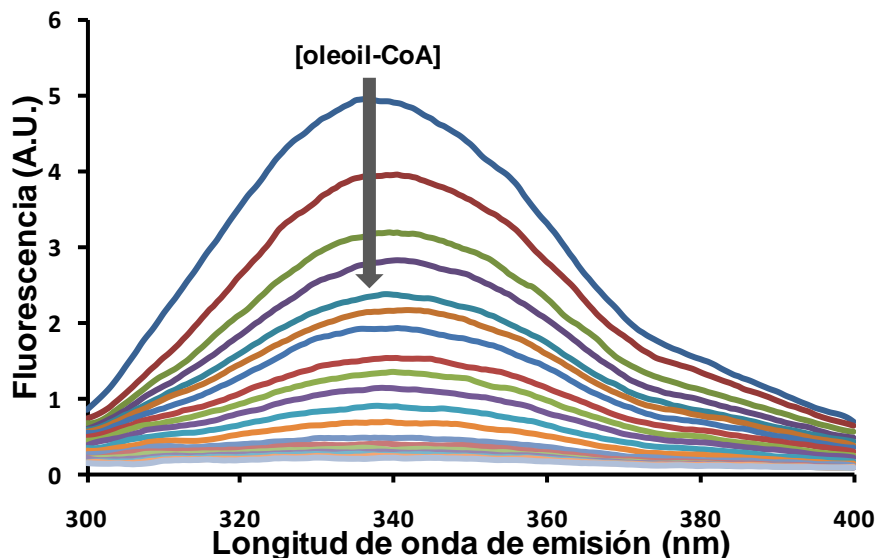
Haciendo uso de esta propiedad se analizó la interacción de distintos ligandos naturales a la proteína. En particular, se estudió la unión de los ácidos grasos oleico y palmítico y sus respectivos acil-CoAs, oleoil-CoA y palmitoil-CoA. La curva de unión de los ácidos oleico y palmítico al mutante L28W (**Figura 11**) muestra un comportamiento sigmoideo lo que sugiere que estos ligandos presentarían una unión cooperativa, o sea, que la presencia de ligando en el sitio 1 facilitaría la unión de ligando al sitio 2.



**Fig 11. Unión de ácidos grasos.** Aumento en la intensidad de fluorescencia del triptófano por la unión del ácido oleico (**A**) o el ácido palmítico (**B**) a una solución 2  $\mu$ M del mutante L28W ( $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 340\text{nm}$ ). Los datos fueron ajustados con la ecuación de Hill.

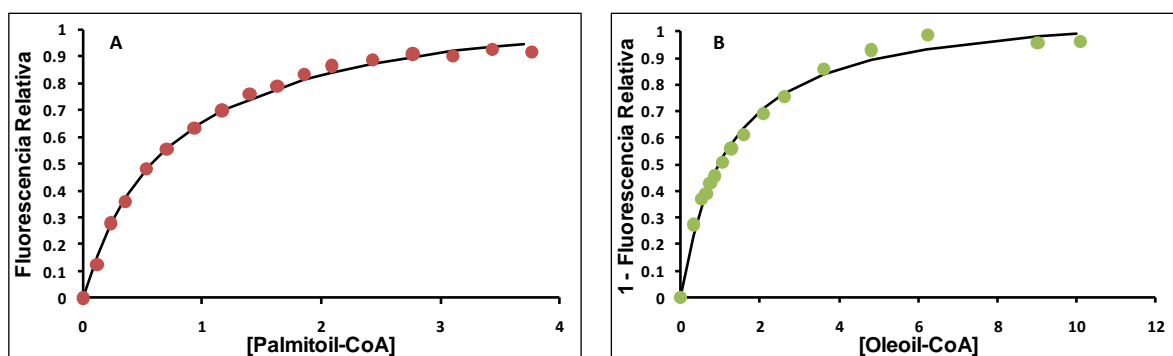
El ajuste de los datos experimentales se realizó empleando la ecuación de Hill. Para ambos ligandos, el parámetro  $n$  dio valores cercanos a 2, lo cual confirma que LFABP tendría dos sitios de unión a ligandos como se vio por estudios de cristalografía y RMN (Thompson et al., 1997; He et al., 2007). A su vez, la constante ( $K_{\text{hill}}$ ) obtenida para los dos ligandos difiere en, aproximadamente, un orden de magnitud (**Tabla IV**).

La unión de los ácidos grasos activados muestra marcadas diferencias con respecto a la unión de los ácidos grasos. Para estudiar la interacción del palmitoil-CoA se empleó el mutante L28W debido a que, al igual que los ácidos grasos, produce un aumento en la intensidad de fluorescencia de emisión del triptófano de este mutante. Sin embargo, para analizar la unión del oleoil-CoA se empleó el mutante M74W que demostró ser más sensible a este ligando (Hagan et al., 2005). La unión del oleoil-CoA al mutante M74W produce un decaimiento en la intensidad de fluorescencia (**Figura 12**) probablemente debido a que el grupo pirofosfato del CoA, el cual es adyacente a la posición 74, produciría un quenching del triptófano.



**Fig 12. Espectro de emisión del mutante M74W.** El agregado de oleoil-CoA produce un decaimiento en la intensidad de fluorescencia del triptófano 74.

El  $K_d$  obtenido para el oleoil-CoA (**Tabla IV**) fue similar a los valores determinados por estudios de desplazamiento (Hagan et al., 2002). A diferencia de los ácidos grasos, los acil-CoAs estudiados no muestran una curva sigmoidea y se ajustan con una ecuación de simple sitio (**Figura 13**).



**Fig 13. Unión de ácidos grasos activados.** Aumento en la intensidad de fluorescencia del mutante L28W (2  $\mu$ M) por la unión del palmitoil-CoA (**A**). Unión de oleoilCoA (**B**) al mutante M74W (2  $\mu$ M). Debido a que el oleoil-CoA produce un decaimiento en la fluorescencia, en el eje Y se representa (1 – fluorescencia relativa). ( $\lambda_{ex}$  = 280nm y  $\lambda_{em}$  = 340nm).

Dado que los dos acil-CoAs estudiados tienen similar afinidad por sus respectivos mutantes, probablemente LFABP no mostraría preferencia alguna entre palmitoil-CoA y oleoil-CoA.

En conjunto, estos resultados muestran que la unión de los ácidos grasos oleico y palmítico al mutante L28W presenta un efecto cooperativo entre los sitios 1 y 2 en concordancia con trabajos previos (Hagan et al., 2005). De hecho, la estructura cristalina de LFABP con dos oleatos unidos ya había indicado que el llenado del sitio 2 (baja afinidad) parece depender de la presencia de ácido oleico en el sitio 1 (alta afinidad) (Thompson et al., 1997). Una posible explicación para interpretar la unión cooperativa vista para los ácidos grasos podría ser que la unión del primer ligando a la LFABP desencadenaría la expansión de la cavidad de la proteína que pondría a disposición una superficie hidrofóbica compatible para la unión del segundo ligando. Por otra parte, el análisis del mapa de potencial electrostático de la estructura de RMN de la apo-LFABP, a fin de comprender como las moléculas de oleato entran a la cavidad de LFABP (He et al., 2007), indica que una vez que el grupo carboxilato del primer oleato establece interacciones favorables en el sitio de unión, una reorientación de la cadena lateral genera un segundo sitio de unión hidrofóbico que acomoda al segundo ligando. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que la afinidad por el ácido palmítico parece ser mayor que la afinidad por el ácido oleico como reflejan los valores de  $K'$  (ver **Tabla IV**). Es posible que esta diferencia obtenida en los valores de  $K'$  para los dos ácidos grasos analizados pueda ser consecuencia de la interacción con diferentes residuos en la cavidad de unión lo que a su vez induce diferentes cambios conformacionales para generar el segundo sitio de unión. También es importante señalar que la termodinámica de unión de los ácidos grasos a LFABP es diferente a la de otros miembros de la familia, incluyendo significativos factores entrópicos (Rolf et al., 1995), lo que sugiere que los efectos hidrofóbicos juegan un papel más importantes durante los procesos de unión comparado con los otros miembros de la familia. Es posible que este efecto hidrofóbico inusual surja de la interacción de los ligandos con residuos no polares de la proteína y entre sí. Por lo tanto, otro posible mecanismo para explicar la cooperatividad observada es que la unión del

primer ligando proporciona una superficie de unión para el segundo ligando a través de una interacción directa ligando-ligando, con la consecuente expulsión de moléculas de agua. Alternativamente, la cooperatividad podría resultar de fenómenos alostéricos, donde el ácido oleico unido induce cambios conformacionales en la proteína, como ha sido propuesto para la unión de sales biliares a la proteína que une ácidos biliares (Toke et al., 2007).

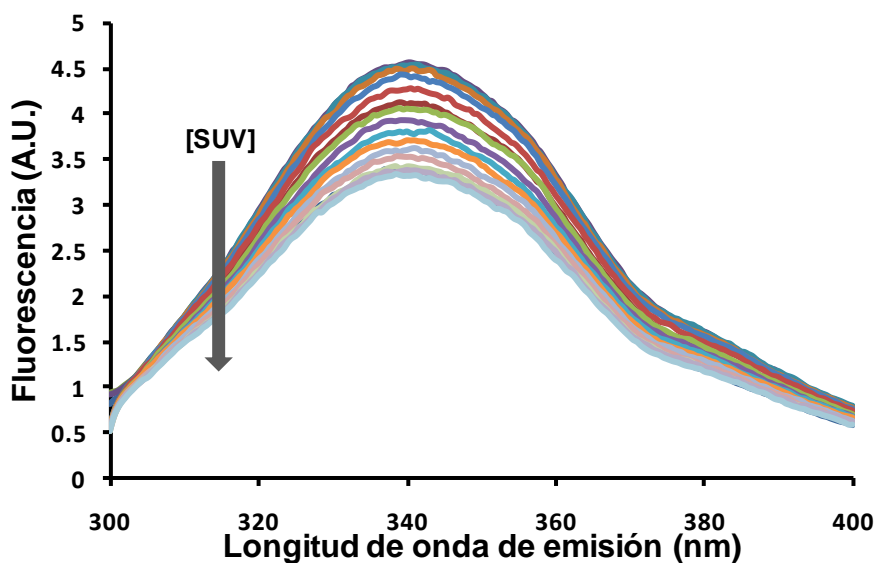
En contraste con las características de unión presentadas por los ácidos grasos, palmitoil-CoA y oleoil-CoA no presentan efectos cooperativos. Esto puede interpretarse como si LFABP tuviese un solo sitio de unión para los acil-CoAs, consistentes con predicciones basadas en el modelado molecular (Thompson et al., 1999). Otra explicación sería que, si bien la LFABP de rata mantiene la estequiometría 2:1 para los acil-CoAs (Rolf et al., 1995), la forma de la curva de titulación para ambos acil-CoAs implicaría que los sitios de unión serían independientes el uno del otro. Es muy interesante notar también que las afinidades obtenidas tanto para el palmitoil-CoA como para el oleoil-CoA por sus respectivos mutantes son muy similares, probablemente indicando que LFABP no muestra preferencia alguna entre estos dos ligandos. Estudios de desplazamiento confirman esta falta de sensibilidad (Di Prieto et al., 2000).

## **1.5. Equilibrio de partición de ligandos naturales entre LFABP y membrana**

Como ya se describió previamente, la constante de partición ( $K_p$ ) describe la afinidad relativa de un ligando entre la proteína y la membrana.

En la **Figura 14** se muestra un ensayo representativo de la titulación del complejo L28W-oleico preformado con cantidades crecientes de EPC-SUV.

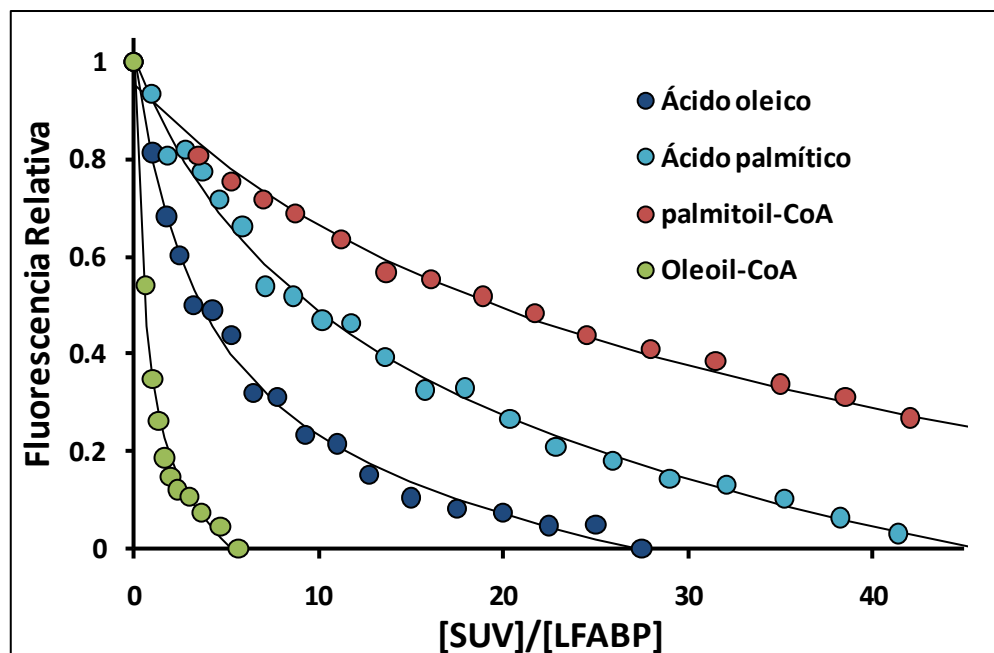




**Fig 14. Titulación fluorométrica del complejo L28W-oleico con cantidades crecientes de EPC-SUV.** Al aumentar la concentración de SUV el oleico es desplazado hacia membrana y la fluorescencia a 340nm del triptófano 28 disminuye.

El  $K_p$  se determinó añadiendo EPC-SUV a una solución del complejo preformado de L28W-oleico o L28W-palmitico. Con los sucesivos agregados de SUVs, se observa un decaimiento en la emisión fluorescente debido al desplazamiento del ácido graso hacia las vesículas. Para cuantificar los valores de  $K_p$  se ajustaron los datos experimentales con las ecuaciones detalladas en materiales y métodos. Los  $K_p$  obtenidos fueron  $4.0 \pm 0.6 \mu\text{M SUV} / \mu\text{M LFABP}$  y  $13 \pm 2 \mu\text{M SUV} / \mu\text{M LFABP}$  para el oleico y palmitico, respectivamente (**Figura 15** y **Tabla IV**). Estos resultados indican una partición preferencial de ambos ligandos hacia la proteína relativo a las membranas. A su vez, para el ácido palmitico es más marcado este comportamiento.

Los acil-CoAs muestran una gran diferencia en sus valores de  $K_p$ . El obtenido para el palmitoil-CoA fue aproximadamente veinte veces mayor que el hallado para el oleoil-CoA, lo que indica una muy alta partición preferencial del palmitoil-CoA al mutante L28W relativo a las SUV. A su vez, el oleoil-CoA no muestra preferencia alguna por la proteína o las membranas.



**Fig 15. Partición de equilibrio de los ácidos grasos y los acil-CoAs entre LFABP y membranas.** El  $K_p$  fue determinado a 25°C a partir de una solución 0.5  $\mu\text{M}$  oleico o palmítico y 5  $\mu\text{M}$  L28W, 7  $\mu\text{M}$  Palmitoil-CoA y 20  $\mu\text{M}$  L28W o 7  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA y 20  $\mu\text{M}$  M74W con concentraciones crecientes de EPC-SUVs en TBS. ( $\lambda_{\text{exc}}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=340\text{nm}$ ), los datos fueron ajustados como se detalla en materiales y métodos. Cinco experimentos independientes fueron realizados para calcular el valor de  $K_p$ .

**Tabla IV.** Constantes de disociación y equilibrio de partición\*.

Mutante LFABP	L28W		M74W	
	Ácido palmítico	Ácido oleico	Palmitoil-CoA	Oleoil-CoA
<b>Kd</b>			0.8 $\pm$ 0.4 $\mu\text{M}$	1.1 $\pm$ 0.8 $\mu\text{M}$
<b>Cooperatividad</b>	Sí	Sí	No	No
<b>K<sup>†</sup></b>	0.07 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.2		
<b>Kp (<math>\mu\text{M SUV}/\mu\text{M LFABP}</math>)</b>	13 $\pm$ 2	4.0 $\pm$ 0.6	21 $\pm$ 4	1.1 $\pm$ 0.2

\*Los datos son el promedio  $\pm$  desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos separados

† Constante de la ecuación de Hill.

El valor de  $K_p$  es utilizado al momento de configurar el sistema en el ensayo de transferencia para garantizar que se observará un fenómeno de

transferencia unidireccional y, de ese modo, simplificar el análisis de las curvas de cinética de transferencia.

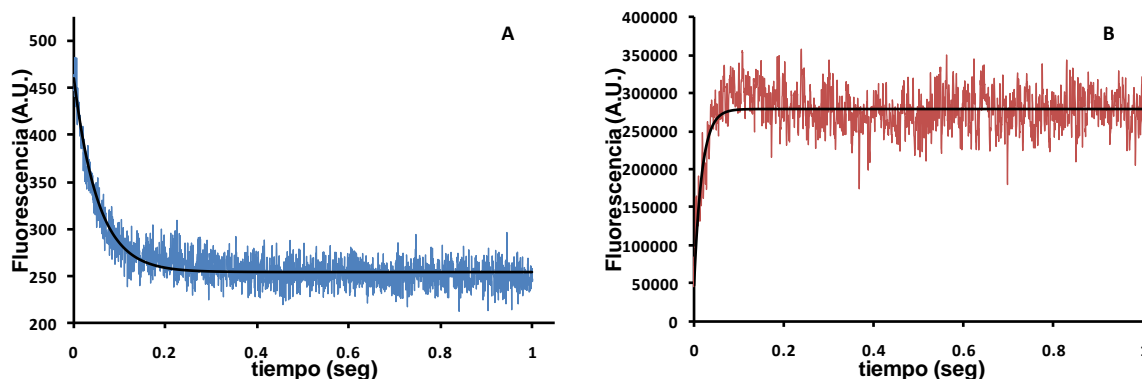
Los valores de  $K_p$  obtenido para el ácido palmítico y su forma activada indicarían que estos ligandos tienen una marcada preferencia por la proteína respecto a la membrana comparada al ácido oleico y su éster. A pesar de que la afinidad de la proteína por el oleoil-CoA y el palmitoil-CoA es similar, su partición de equilibrio hacia membranas muestra una marcada diferencia. El palmitoil-CoA presenta un valor de  $K_p$  aproximadamente veinte veces mayor que el mostrado por el oleoil-CoA, el cual no mostró preferencia por ninguna de las dos fases en particular. Es posible que la localización del oleoil-CoA y el palmitoil-CoA dentro de la cavidad de unión sea distinta, probablemente debido a las diferencias en la estructura de la cadena carbonada, permitiendo al oleoil-CoA distribuirse más fácilmente hacia la membrana. Otro factor que contribuye a esta diferencia podría deberse al diferente grado de exposición del grupo CoA al entorno. La interpretación de los valores obtenidos de  $K_p$  para los ácidos grasos podría ser aun más difícil teniendo en cuenta que en el equilibrio el ligando puede tener tiempo para el intercambio entre un sitio y el otro en la cavidad de unión, por lo que se podría estar censando indirectamente el ligando unido a ambos sitios. A su vez, la diferencia observada en el  $K_p$  del palmítico comparada con la del oleico podría ser una consecuencia de sus distintos  $K_d$ s.

## **1.6. Transferencia de ligandos naturales desde LFABP hacia membrana**

Para distinguir qué mecanismo de transferencia emplea LFABP para transferir ligandos naturales hacia membrana se realizó el ensayo: 1) modificando la concentración de las membranas zwitteriónicas aceptoras; 2) modificando la composición de las membranas aceptoras por incorporación de PL aniónicos, y 3) modificando la fuerza iónica del medio.

### 1.6.1. Efecto de la concentración de vesículas.

Se analizó la transferencia de ácido oleico, palmítico y palmitoil-CoA desde el mutante L28W y de oleoil-CoA desde M74W hacia membrana. Todas las transferencias con el mutante L28W se siguieron por una disminución en la fluorescencia del triptófano cuando el ligando es cedido a la membrana, mientras que para el mutante M74W se siguió por un aumento en la fluorescencia del triptófano cuando el oleoil-CoA es transferido (**Figura 16**).

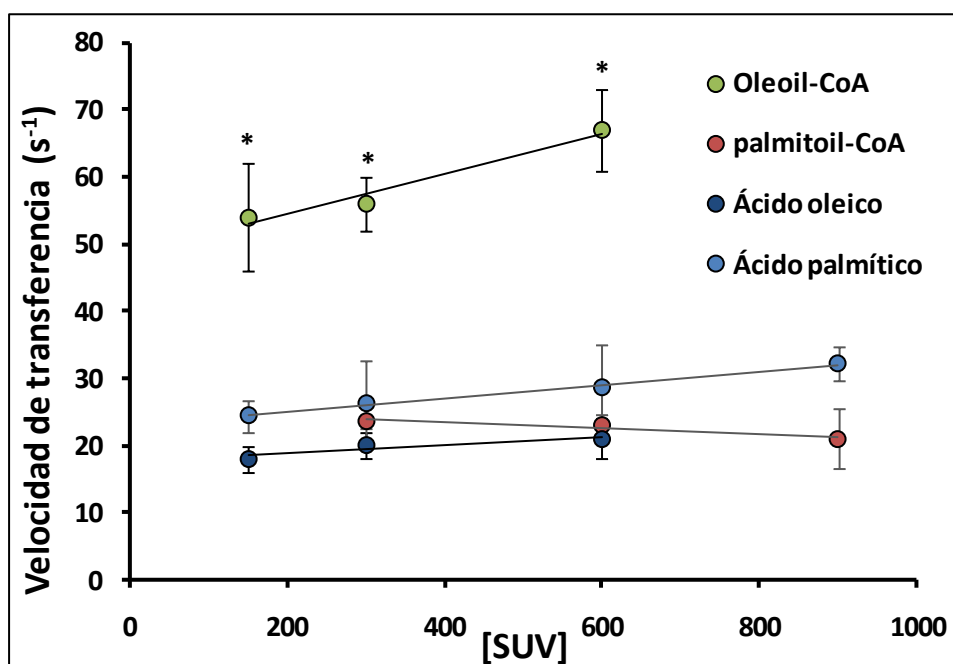


**Fig 16. Transferencia de ligandos naturales.** Curva representativa de la transferencia del ácido oleico desde L28W (A) y el oleoil-CoA desde el M74W (B) hacia membranas EPC-SUV. La fluorescencia del triptófano se siguió excitando a 280nm y la emisión a 340nm.

La velocidad de transferencia de los ácidos grasos desde la LFABP mutante hacia EPC-SUV obtenida fue doscientas veces más rápida que la velocidad mostrada para el análogo fluorescente 12AO. Los valores obtenidos para el ácido oleico fueron  $17\text{s}^{-1} \pm 2$ ,  $20\text{s}^{-1} \pm 2$  y  $23\text{s}^{-1} \pm 3$  y para el palmítico  $24\text{s}^{-1} \pm 2$ ,  $26\text{s}^{-1} \pm 6$  y  $29\text{s}^{-1} \pm 6$  cuando la concentración de SUVs fue 150, 300 y 600  $\mu\text{M}$ , respectivamente (**Figura 17**). Las velocidades obtenidas fueron insensibles al aumento en la concentración de vesículas, lo que indicaría que los ácidos grasos oleico y palmítico presentan el mecanismo “difusional” observado para los análogos fluorescentes.

Del mismo modo, la velocidad de transferencia del palmitoil-CoA desde el mutante L28W hacia concentraciones crecientes de EPC-SUV no se vio

afectada por los niveles del aceptor y las velocidades obtenidas fueron del mismo orden que para los ácidos grasos. Por otro lado, la velocidad de transferencia hallada para el oleoil-CoA es casi tres veces más rápida que la transferencia del oleico, palmítico y palmitoil-CoA y parece tener relativa sensibilidad a la concentración de vesículas (**Figura 17**). Esto podría indicar un diferente mecanismo de transferencia cuando el ligando cargado en la proteína es el oleoil-CoA.



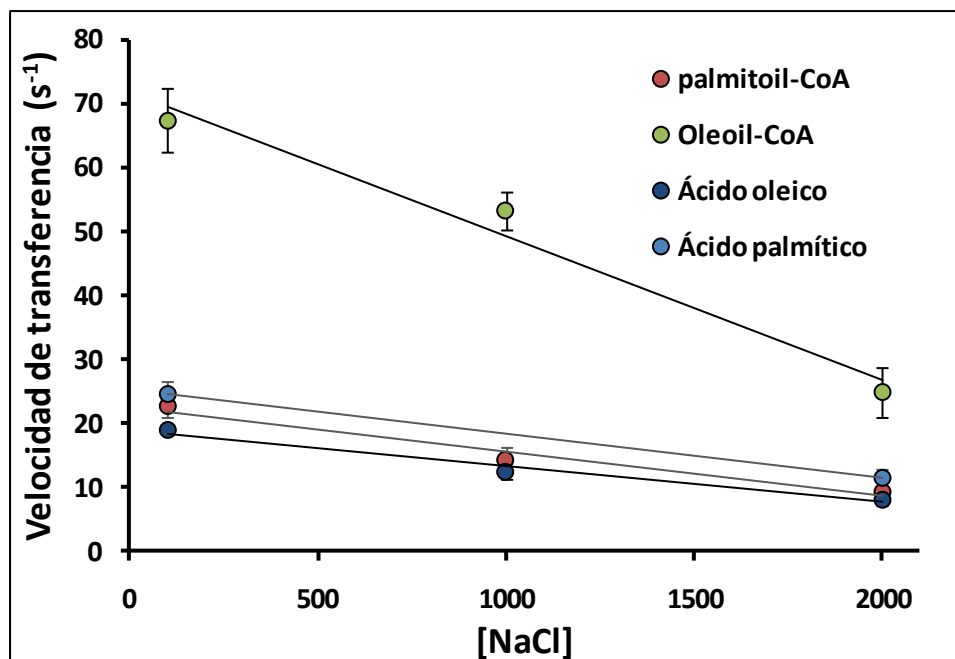
**Fig 17. Efecto de la concentración de vesículas sobre la velocidad de transferencia de ligandos naturales.** Al complejo preformado proteína-ligando se lo enfrentó a concentraciones crecientes de EPC-SUV. Las concentraciones finales fueron: 5  $\mu\text{M}$  AO o AP con 5  $\mu\text{M}$  L28W a 150-600  $\mu\text{M}$  SUV, ó 4  $\mu\text{M}$  palmitoil-CoA con 12  $\mu\text{M}$  L28W a 300-900  $\mu\text{M}$  SUV, ó 4  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA con 15  $\mu\text{M}$  M74W a 150-600  $\mu\text{M}$  SUV. La velocidad de transferencia (promedio  $\pm$  DS) de cinco o más experimentos es mostrada. El análisis de varianza de Fisher fue usado para comparar si los valores de los conjuntos de datos numéricos son significativamente diferentes.

### 1.6.2. 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 et al., 1996), un ejemplo sería 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 et al., 1982; Constantinides et al., 1985). En este sentido, la velocidad de transferencia del ligando se ve disminuída con el aumento de la fuerza iónica del medio. Al contrario, para una proteína del tipo “colisional”, como la IFABP, se espera que la velocidad de transferencia sea independiente de la fuerza iónica del medio a concentraciones de NaCl relativamente bajas.

La velocidad de transferencia del ácido oleico, palmítico, palmitoil-CoA y oleoil-CoA desde LFABP hacia membrana fue determinada como función de concentraciones crecientes de NaCl. Todos los ligandos mostraron un marcado descenso en su velocidad de transferencia cuando la concentración de NaCl fue variada desde 0 a 2 M (**Figura 18**).

Estos experimentos apoyan el mecanismo difusional propuesto para la transferencia de los ligandos naturales. El mismo comportamiento fue observado para los análogos fluorescentes empleados previamente (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 2004). Es más, este descenso en la velocidad de transferencia de ligandos ante un incremento en la fuerza iónica del medio fue observado para diferentes proteínas del tipo “difusional”.

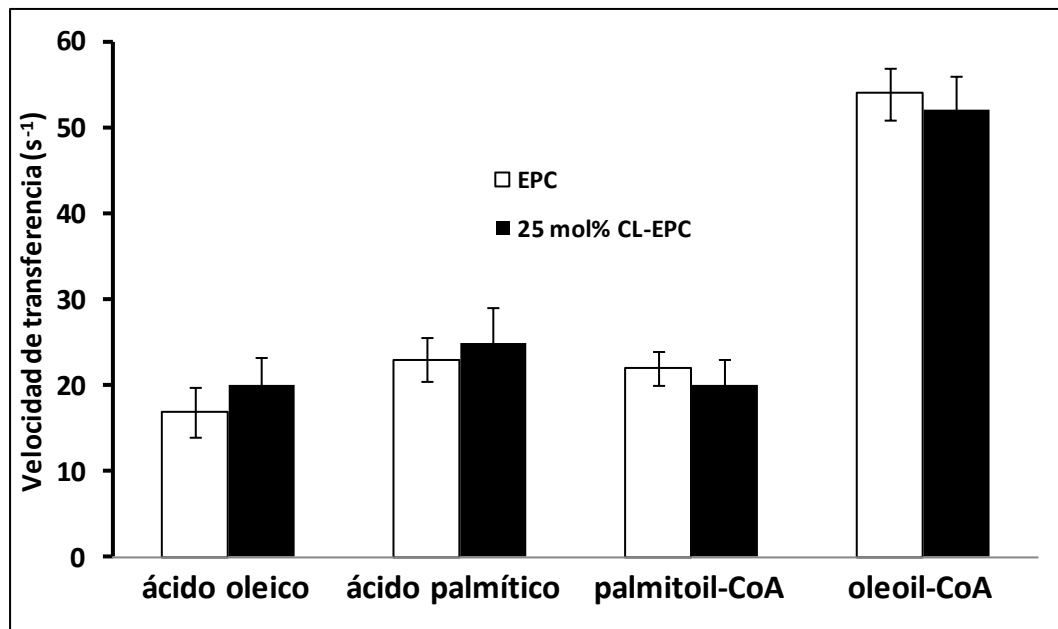


**Fig 18. Efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia de ligandos naturales.** Transferencia desde el complejo preformado Proteína-ligando preparado incubando 5  $\mu\text{M}$  AO ó AP con 5  $\mu\text{M}$  L28W, ó 4  $\mu\text{M}$  palmitoil-CoA con 12  $\mu\text{M}$  L28W, ó 4  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA con 15  $\mu\text{M}$  M74W. La concentración de vesículas aceptoras fue 300  $\mu\text{M}$ . La concentración de NaCl se incrementó desde 100 hasta 2000 mM. Velocidad de transferencia (promedio  $\pm$  DS) de cinco o más experimentos es mostrada.

### 1.6.3. Efecto de la carga superficial de las vesículas.

Cambios en la densidad de carga de la superficie de las vesículas aceptoras pueden afectar la velocidad de transferencia de los ligandos desde la proteína hacia vesículas lipídicas si hay involucradas interacciones electrostáticas entre la proteína dadora y las membranas aceptoras. Al contrario, en el caso de una difusión acuosa, es esperable que las características de las membranas aceptoras no afecten la velocidad de transferencia en las condiciones donador:aceptor empleadas en estos experimentos, porque el paso determinante de la velocidad es la disociación del ligando de la proteína en el medio acuoso (Córsico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al., 2006). Los resultados muestran que las velocidades de transferencia de los ligandos estudiados no son prácticamente afectadas por la presencia de fosfolípidos cargados negativamente (**Figura19**). Estos resultados son coincidentes con observaciones previas para la transferencias de análogos

fluorescentes desde LFABP y son los esperados para un mecanismo de transferencia “difusional”.



**Fig 19. Transferencia de ligandos naturales desde LFABP hacia SUV de diferente composición.** Transferencia desde el complejo preformado Proteína-ligando preparado incubando 5  $\mu\text{M}$  AO ó AP con 5  $\mu\text{M}$  L28W, ó 4  $\mu\text{M}$  palmitoil-CoA con 12  $\mu\text{M}$  L28W, ó 4  $\mu\text{M}$  oleoil-CoA con 15  $\mu\text{M}$  M74W. La concentración de vesículasceptoras fue 300  $\mu\text{M}$ . Para incrementar la carga negativa, 25 mol % de CL (barras negras) fue incorporado en la composición de EPC-SUV. Velocidad de transferencia (promedio  $\pm$  DS) de cinco o más experimentos es mostrada.

Analizando en conjunto estos resultados, se observa que la velocidad de transferencia observada para el ácido oleico fue más de doscientas veces más rápida que la de su correspondiente análogo fluorescente, 12 AO. Una vez más, la interpretación se relaciona con el hecho de que el ácido oleico que se está sensando es el que ocupa el sitio de menor afinidad (el más expuesto al solvente), mientras que el 12AO podría estar ocupando una posición más cercana al sitio de alta afinidad (el menos expuesto al solvente).

El análisis de la cinética de transferencia del ácido oleico desde LFABP hacia membranas fosfolipídicas muestra las características de un mecanismo “difusional” como el observado para los análogos fluorescentes (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008). Tanto el ácido palmítico



como el palmitoil-CoA muestran la misma velocidad y mecanismo de transferencia que la observada para el oleico.

Estudios empleando NMR de holo-LFABP sugieren que la proteína permite un fácil intercambio del segundo ligando con las moléculas de ácido graso libre en la solución sin el requerimiento de una activación colisional (He et al., 2007). Por otra parte, mediante estudios de simulación de dinámica molecular, se ha visto que la LFABP básica de pollo, que también presenta un mecanismo “difusional” de transferencia de ligando, podría establecer contacto con la membrana a través del barril por el lado opuesto a la región portal, y que esta unión produciría cambios conformacionales en la proteína los cuales, probablemente, permitirían la liberación del ligando al entorno acuoso (Villareal et al., 2008).

Por otro parte, el oleoil-CoA muestra un aumento de más de dos veces en la velocidad de transferencia. Además, el complejo de Oleoil-CoA unido a la proteína parece ser relativamente sensible a la presencia de concentraciones crecientes de vesículas zwitteriónicas, lo que podría indicar un mecanismo de transferencia distinto al de los otros ligandos estudiados en el presente trabajo de tesis. Los estudios de RMN han demostrado una dramática diferencia en la conformación entre la apo y holo-LFABP (He et al., 2007). Como se indicó anteriormente, el oleoil-CoA muestra el comportamiento más divergente comparado con el resto de los ligandos en términos de  $K_p$ , velocidad y mecanismo de transferencia. Es posible que el muy bajo valor de  $K_p$  y la rápida velocidad de transferencia puedan ser atribuidas a una conformación más expandida adoptada por LFABP cuando está unida a este ligando. Es probable que diferentes ligandos induzcan distintos cambios conformacionales, lo que afectaría de manera particular la velocidad de transferencia de dicho ligando a membranas u otras proteínas. Con referencia a esta posibilidad, otros autores han demostrado que la LFABP cargada con oleoil-CoA estimula la actividad de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) microsomal, mientras que el complejo LFABP-palmitoil-CoA inhibe la actividad de la GPAT (Jolly et al., 2000).

Nuestras observaciones en relación a la especificidad de la transferencia de ligando también podrían estar conectadas con la función propuesta para

LFABP en el núcleo. Se presume que LFABP es capaz de unir y co-transportar el ligando unido dentro del núcleo para la interacción directa con receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs). Ha sido demostrado que LFABP interacciona vía contacto físico con los PPAR $\alpha$  en el núcleo (Wolfrum et al., 2000; Hostetler et al., 2005). Además, el análisis de la distancia intermolecular demuestra que LFABP y PPAR $\alpha$  son suficientemente cercanas para la interacción directa y la transferencia del ligando unido a LFABP hacia PPAR $\alpha$  (Hostetler et al., 2005). El mecanismo de dicha transferencia no está claro todavía, pero de acuerdo a las constantes de afinidad de LFABP y PPAR $\alpha$  por los ácidos grasos, PPAR $\alpha$  preferentemente captaría el ácido graso unido al segundo sitio de LFABP (Wolfrum et al., 2000).

PPAR $\alpha$  une ácidos grasos y otros ligandos e induce la expresión de genes que codifican para LFABP y genes relacionados a enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos. Tanto los LCFA saturados como los insaturados pueden activar la expresión de genes mediados por los PPAR $\alpha$  (Hostetler et al., 2005), pero solo los LCFA insaturados se unen a PPAR $\alpha$  con alta afinidad (Lin et al., 1999); mientras que PPAR $\alpha$  presenta una alta afinidad por los LCFA-CoA saturados e insaturados. Por lo tanto, metabolitos de los LCFA, como los LCFA-CoA, pueden representar ligandos endógenos de alta afinidad para los PPARs. Además, se ha demostrado que LCFA-CoA puede competir con LCFAs por la unión a PPARs y antagonizar la activación transcripcional mediada por PPAR (Murakami et al., 2001; Elholm et al., 2001). Por ende, LCFA y LCFA-CoA pueden competir por la unión a LFABP. LFABP y PPAR $\alpha$  interactuarían de manera tal de permitir la transferencia de ligando entre ellas. Los resultados aquí presentados demuestran que la transferencia de ligandos desde LFABP a distintos aceptores presentaría parámetros cinéticos específicos. Se podría proponer que esta característica de LFABP podría contribuir a la regulación de la actividad de PPAR $\alpha$ .

En conclusión esta primera parte, empleando ligandos naturales, ha permitido comprobar que LFABP es diferente al resto de los miembros de la familia en sus características de unión y transferencia de ligandos. También se demostró que una única proteína podría emplear diferentes mecanismos cinéticos dependiendo del ligando que tenga unido. Esta observación podría

estar indicando un mecanismo específico para enviar los ligandos a distintas rutas metabólicas, probablemente debido a la gran plasticidad de LFABP, la cual podría adoptar distintas conformaciones cuando se une a distintos ligandos. Es probable que las características superficiales de las FABPs dicten las interacciones específicas con otras proteínas o membranas. Este punto ha sido ampliamente caracterizado por nuestro grupo empleando proteínas cuya carga superficial ha sido modificada (Córsico et al., 2004; Falomir-Lockhart et al., 2006) y comparando los potenciales eléctricos de superficie (Di Pietro et al., 2003). Es posible que la unión de diferentes ligandos pueda inducir cambios en las propiedades de superficie de la LFABP que a su vez pueden generar modificaciones en sus características de transferencias.

Es importante notar que los cambios observados en este sistema simplificado, podrían ser potenciados en un entorno celular, donde se espera que LFABP interactúe con otras proteínas y diferentes estructuras subcelulares para llevar a cabo su función específica.

## 2. Rol de la región portal de IFABP en la interacción con membranas fosfolipídicas

Como ya ha sido mencionado anteriormente, la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP juega un papel importante en la formación del complejo proteína-membrana determinante del mecanismo colisional de transferencia de ligandos (Corsico et al., 1998; Franchini et al., 2008). La formación de este complejo estaría gobernada por el establecimiento de interacciones de tipo iónicas constituídas por determinados residuos catiónicos superficiales de la proteína y las cargas superficiales negativas de la membrana fosfolipídica (Córstico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al., 2006). Este tipo de interacciones regularía la transferencia del ligando desde la IFABP hacia las membranas biológicas y podrían dictar los patrones de tráfico intracelular de los FA dentro de la célula.

Teniendo en cuenta la hipótesis de que la región portal de IFABP es el dominio de unión a membranas y con el objetivo de estudiar con mayor profundidad la interacción entre la región portal de IFABP y las membranas fosfolipídicas, se construyeron una serie de mutantes puntuales de triptófano ubicados estratégicamente en la región portal. Empleando dichos mutantes, y por medio de técnicas de fluorescencia, se pudo analizar la profundidad de inserción de los triptófanos en vesículas constituidas por fosfolípidos brominados en distintas posiciones de la cadena acilada.

### 2.1. Construcción de los mutantes puntuales de triptófano de IFABP

Los residuos seleccionados para la inserción de triptófanos forman parte de la región portal y fueron Phe<sup>17</sup>, Leu<sup>30</sup>, Phe<sup>55</sup> e Ile<sup>114</sup>. También se incluyeron, a modo de control, los mutantes puntuales Trp<sup>6</sup> y Trp<sup>82</sup> (que pertenece al barril- $\beta$ ). Las mutaciones se introdujeron cambiando una o dos bases en la secuencia de cDNA de la IFABP de rata empleando la técnica de megaprimer-PCR (ver materiales y métodos). Los oligonucleótidos empleados como primers internos se detallan en la **Tabla V**.

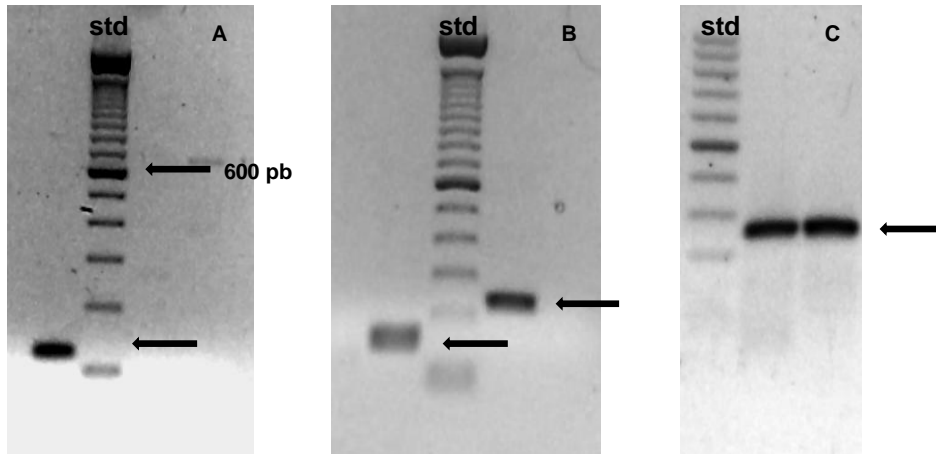
Los dos primers externos utilizados complementarios a las secuencias del vector que flanquean el sitio de clonado múltiple fueron Primer Externo-1 (*sentido*) o P<sub>1</sub>: **5'-CGGATAACAATTCCCCTCTA-3'**; y Primer Externo-4 (*antisentido*) o P<sub>4</sub>: **5'-TTCCTTTCGGGCTTTGTTAG-3'**.

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

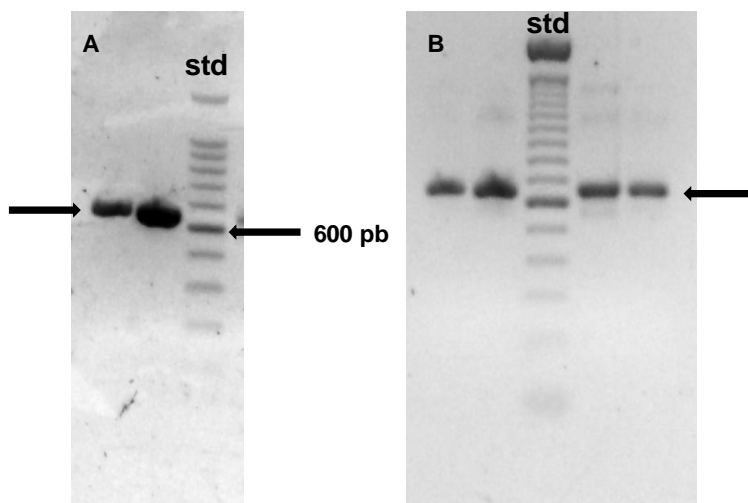
<b>Mutante IFABP</b>	<b>Primer interno (P<sub>3</sub>)</b>
<b>W6F-s</b>	5'- TTACCATGGCATTGATGGCACT <u>TTC</u> AAAGTAGACC-3'
<b>W82F-as</b>	5'- CTCCATGGT <u>AAA</u> GGTCCCAGT-3'
<b>F17W-as</b>	5'-CCCATTTTCTCCAT <u>CCA</u> CTTTTCATAG-3'
<b>L30W-as</b>	5'- CATGAGCTCC <u>CCA</u> CTTCTCTTCAC -3'
<b>F55W-as</b>	5'- CATCAATGTTTCG <u>CCA</u> GTTGCTTGA TTC-3'
<b>I114W-s</b>	5'- GGTAACGAACTA <u>TGG</u> CAAACCTACAC-3'

Primers internos (P<sub>3</sub>) empleados para construir los mutantes puntuales mediante megaprimer-PCR. Las mutaciones están resaltadas en el codón que está subrayado.

En la **Figura 20** se observan distintos productos de PCR intermediarios en la construcción de los mutantes puntuales como ejemplo 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 a partir de un gel de agarosa (**Figura 21**). Luego se ligaron en el vector pET11d, predigerido con las mismas enzimas de restricción que los productos de PCR, y purificado también a partir de un gel de agarosa. Los plásmidos así obtenidos fueron transformados inicialmente en *E.coli* JM109, se repicaron colonias aisladas y se chequeó la presencia del inserto adecuado 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.

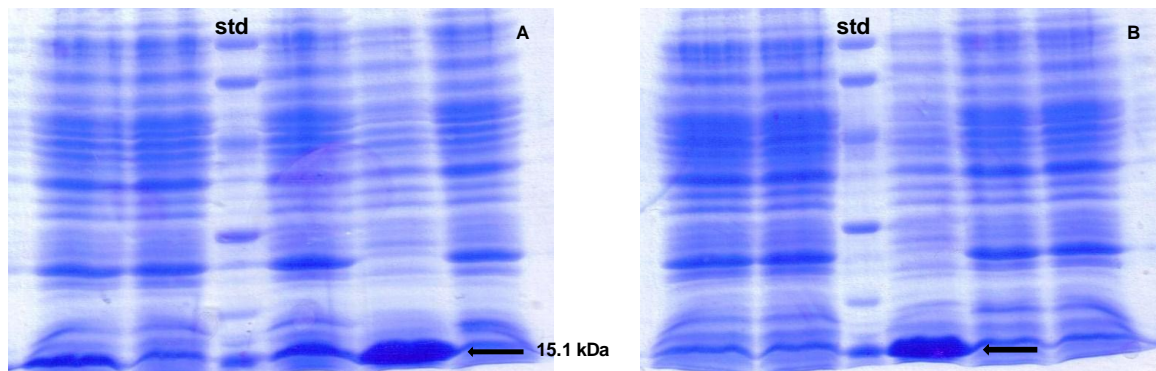


**Fig 20. Obtención de megaprimers.** Geles representativos de agarosa 1-1,2% en los que se muestran los productos de PCR intermedios (flechas) en la obtención de los mutantes puntual F17W **(A)**, L30W y F55W **(B)**, W82F **(C)** de IFABP.



**Fig 21. Obtención de los mutantes puntuales de IFABP a partir de megaprimers-PCR.** Geles de agarosa 1% en los que se muestran los productos de PCR finales (flechas) de los mutantes puntual W6F y W6,82F **(A)**, F17W, L30W, F55W y I114W **(B)** de IFABP.

De este modo se obtuvieron los mutantes puntuales de triptofano de la IFABP de rata. Posteriormente a su análisis por secuenciación, las construcciones mutantes recombinantes fueron sobreexpresadas en *E. coli* BL21 (DE3). Se seleccionaron las colonias que sobreexpresaron las proteínas **(Figura 22)**.



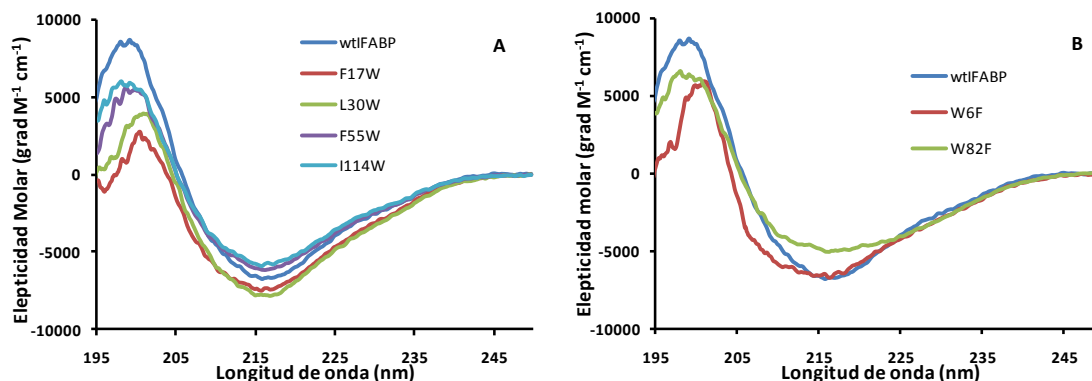
**Fig 22. Sobreexpresión de los cDNAs mutantes de IFABP.** Geles representativos de la sobreexpresión de distintas colonias de los mutantes W6F (A) y L30W (B) en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

## 2.2. Control de integridad estructural y funcional de los mutantes de triptófanos de IFABP

### 2.2.1. Espectros de dicroísmo circular

Con la finalidad de evaluar las posibles alteraciones generadas en la estructura de IFABP como resultado de las mutaciones introducidas, se realizaron mediciones de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las IFABP mutantes en comparación con la proteína nativa.

El espectro de dicroísmo circular de la proteína nativa coincidió en forma e intensidad con datos anteriormente publicados (Clérico et al., 2001; Córscico et al., 2004) 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 de triptófano (**Figura 23**). Las pequeñas diferencias en amplitud observadas para algunos de los mutantes pueden deberse a errores en la determinación de las concentraciones empleado para normalizar la señal de elipticidad, y no a significativas alteraciones conformacionales.

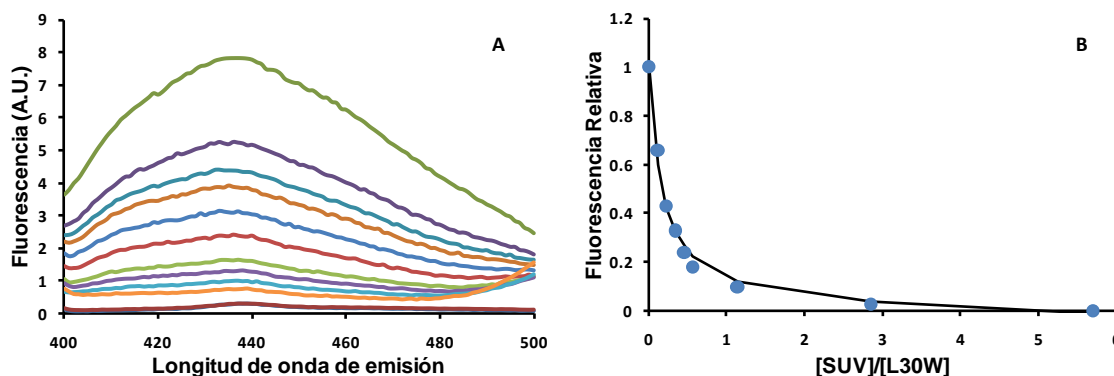


**Fig 23. Espectros de dicroísmo circular para los mutantes puntuales de IFABP.** Los paneles **A** y **B** muestran los espectros de CD en el UV lejano de suspensiones aproximadamente 40  $\mu\text{M}$  de los mutantes puntuales de IFABP en comparación con el espectro de la proteína nativa.

### 2.2.2. Partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos

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. El espectro de una titulación fluorimétrica y el ajuste de los datos obtenidos (según se detalla en materiales y métodos) para uno de los mutantes puntuales de Trp se muestran, a modo de ejemplo, en la **Figura 24**. 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 VI**), en concordancia a los valores publicados anteriormente (Dipietro et al., 2003). Estos resultados muestran que el sitio de unión no ha sufrido alteraciones conformacionales significativas y, por lo tanto, son un indicio de que las mutaciones introducidas no alteraron la estructura tridimensional.





**Fig 24. Determinación de la constante de partición del 12AO entre la proteína y EPC-SUV.** Titulación fluorométrica del complejo L28W/12AO (A) con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo un 10 mol % de NBD-PC, que actúa como aceptor FRET del grupo antróiloxi. La fluorescencia a 450nm se empleó para calcular el Kp como se describió en materiales y métodos (B).

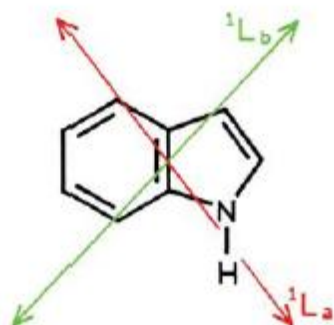
**Tabla VI.** Constantes de disociación y equilibrio de partición\*.

	Kp ( $\mu\text{M SUV}/\mu\text{M LFABP}$ )
<b>W6F</b>	$0.06 \pm 0.03$
<b>W82F</b>	$0.08 \pm 0.03$
<b>F17W</b>	$0.17 \pm 0.09$
<b>L30W</b>	$0.16 \pm 0.04$
<b>F55W</b>	$0.21 \pm 0.05$
<b>I114W</b>	$0.16 \pm 0.07$
<b>wtIFABP</b>	$0.13 \pm 0.04$

\*Los datos son el promedio  $\pm$  desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos separados

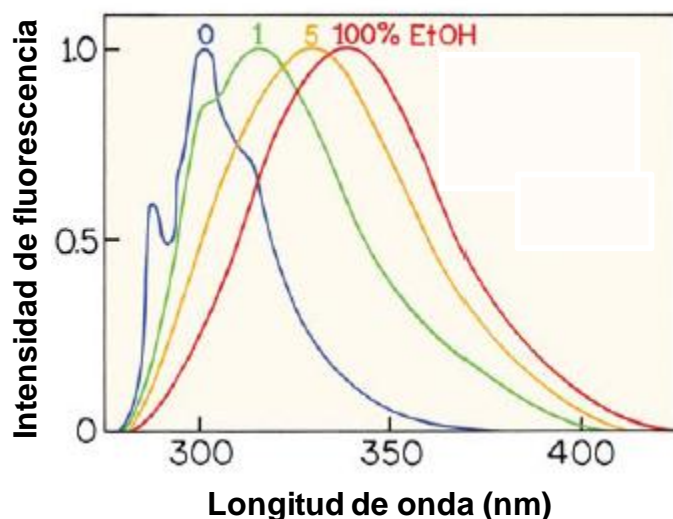
### 2.2.3. Espectros de emisión de fluorescencia de los mutantes puntuales de triptófano de IFABP

El máximo de emisión fluorescente del triptófano es altamente sensible al entorno local que lo rodea, específicamente a la polaridad. Este particular comportamiento es debido a que el triptófano posee dos transiciones isoenergéticas cercanas (llamadas  $^1L_a$  y  $^1L_b$ ) (Figura 25).



**Fig 25. Estados de transición electrónica del triptófano.** (Lakowicz et al., 2006)

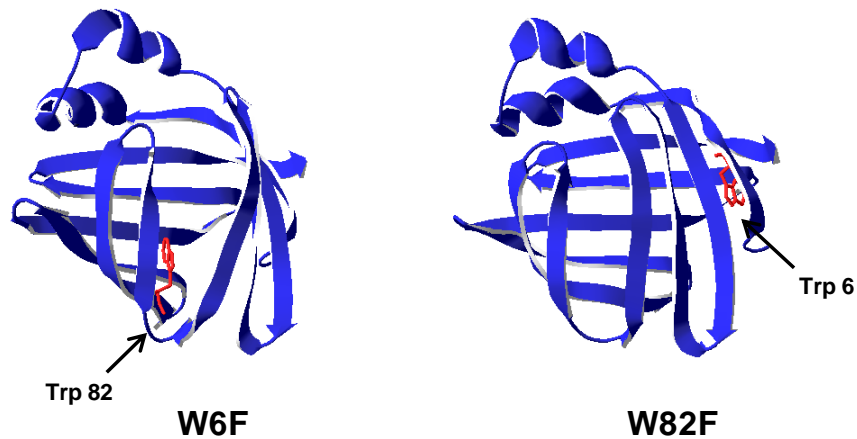
Dependiendo del solvente, la emisión puede ocurrir desde el estado  $^1L_a$  o  $^1L_b$ . Los solventes polares estabilizan el estado  $^1L_a$  por la formación de un puente de hidrógeno con el grupo imino y el máximo de emisión se observa a una longitud de onda cercana a 340nm. En cambio, en un entorno no polar, el estado  $^1L_b$  adopta menor energía y el máximo se desplaza a longitudes de onda menores (**Figura 26**).



**Fig 26. Espectros de emisión del triptófano en ciclohexano y etanol.** (Lakowicz et al., 2006)

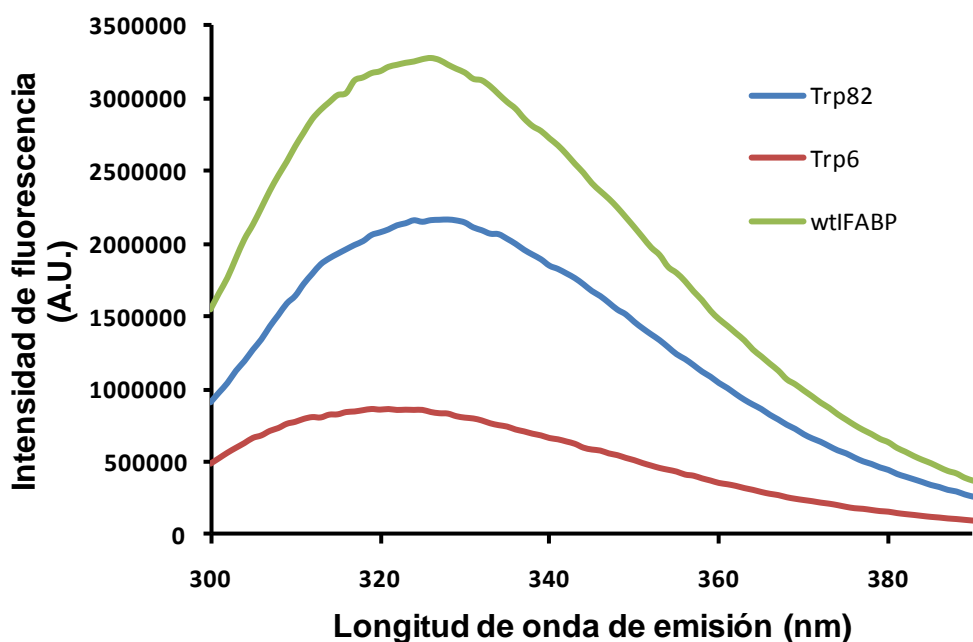
La proteína IFABP salvaje posee dos triptófanos ubicados en las posiciones 6 y 82 (Trp6 y Trp82) (**Figura 27**). Los espectros de emisión mostrados por estos triptófanos nos brindan una valiosa información sobre el entorno particular en el que se halla cada uno. Las estructuras obtenidas por RMN y rayos X (Scapin et al., 1992; Hodson et al., 1997) muestran los distintos ambientes en los que se ubican dichos triptófanos. El Trp82 está ubicado

profundamente en el barril- $\beta$ , rodeado de una matriz altamente hidrofóbica formado por una serie de anillos bencilo y cadenas laterales alifáticas. Su nitrógeno indólico apunta hacia la cavidad y es parcialmente accesible al solvente desde adentro. El resto del anillo se encuentra protegido de la cavidad por la Arg106, cuyo grupo guanidinio se ubica paralelo al anillo e interactúa con su nube de electrones pi.



**Fig 27. Modelos moleculares obtenidos para los mutantes W6F y W82F.** Las figuras fueron obtenidas por modelado por homología a partir de la estructura cristalográfica de la proteína nativa (código pdb 1IFC) empleando el programa Swiss-PdbViewer. El esqueleto peptídico se muestra en el formato de cintas (azul) y los residuos de Trp analizados están resaltados en rojo.

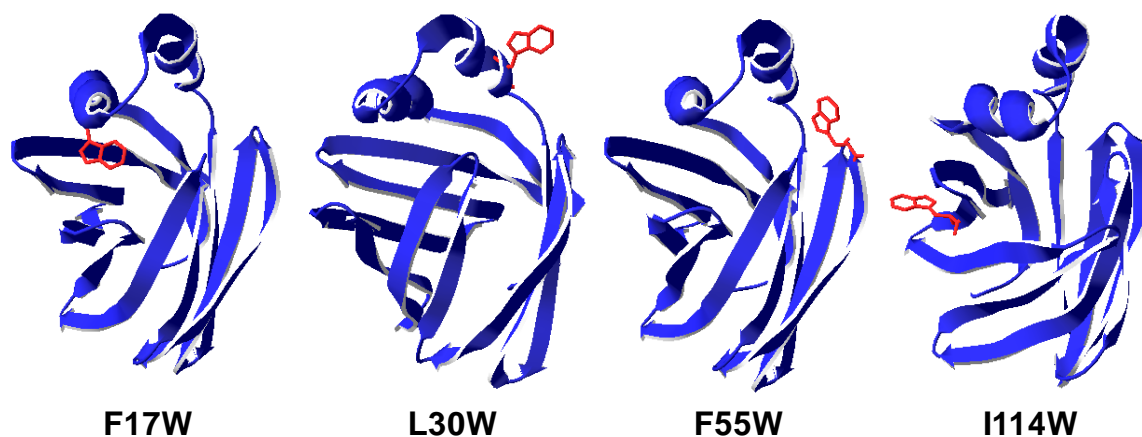
Por otra parte, el Trp6, si bien es más cercano a la superficie externa de la proteína, no es accesible al solvente ya que se encuentra rodeado también por grupos bencilos y alifáticos. El nitrógeno indol se encuentra cercano al oxígeno de la Phe2, con el cual podría establecer puente de hidrógeno, y del amonio de la Lys130, con el cual podría establecer interacciones del tipo de Van der Waals.



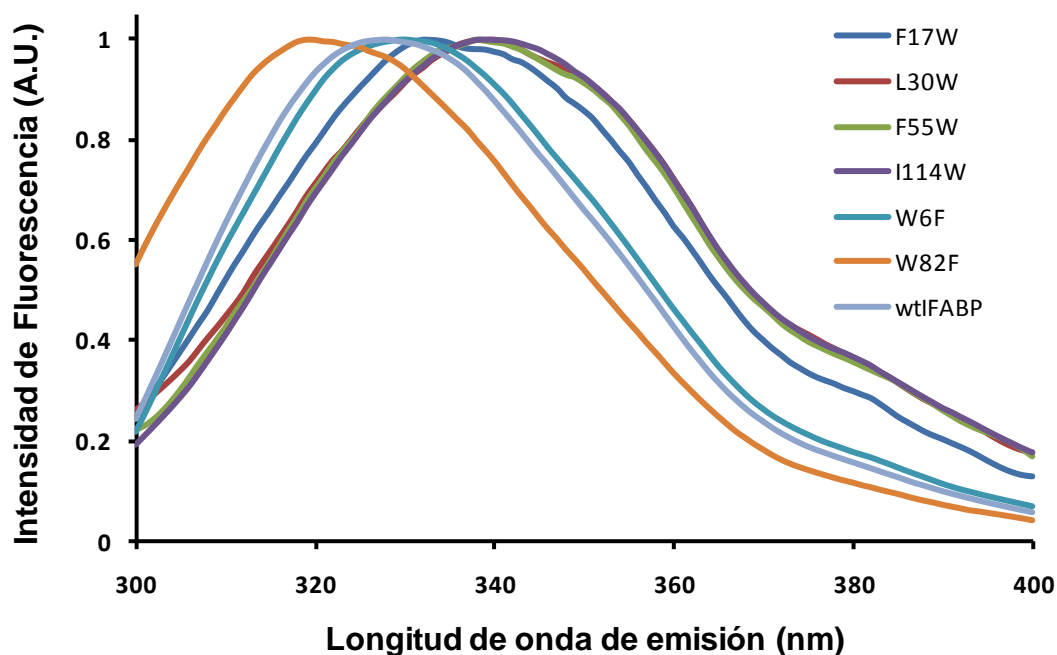
**Fig 28. Espectros de emisión de los triptófanos naturales de IFABP.** Espectro de emisión de una solución 5 $\mu$ M de los mutantes W6F (Trp82) y W82F (Trp6). Se excitó a 295nm.

Ambos triptófanos mostraron máximos de intensidad de emisión fluorescente a longitudes de onda esperables para triptófanos ubicados en ambientes no polares. El Trp6 mostró un mayor desplazamiento hacia el azul ( $\lambda_{\text{max}} = 320\text{nm}$ ) que el Trp82 ( $\lambda_{\text{max}} = 328\text{nm}$ ), probablemente debido a la interacción con la porción alifática de la lys130, la cual le provee un entorno hidrofóbico y lo hace prácticamente inaccesible al solvente (**Figura 28**). Esta interacción, a su vez, puede ser responsable de la intensidad de emisión más débil observada para el Trp6 (Clérico et al., 2001).

Los mutantes puntuales F17W, L30W, F55W y I114W (**Figura 29**), cuyos Triptófanos se localizan en la región portal, dieron espectros típicos del Trp en un ambiente acuoso polar con un máximo de emisión cercano a 340nm. Resultado esperable debido a que, como ya se sabe, la región portal es totalmente accesible al solvente circundante.



**Fig 29. Modelos moleculares obtenidos para los mutantes F17W, L30W, F55W e I114W.** Las figuras fueron obtenidas por minimización de energía empleando el programa Swiss-PdbViewer a partir de la estructura cristalográfica de la proteína nativa. El esqueleto peptídico se muestra en el formato de cintas (azul) y los residuos de Trp analizados están resaltados en rojo.



**Fig 30. Espectros de emisión normalizados de los mutantes de IFABP.** Espectro de emisión de una solución 5 $\mu$ M de cada mutante. ( $\lambda_{exc} = 295nm$ ).

El Trp17, sin embargo, muestra un máximo de emisión (334nm) ligeramente desplazado con respecto al observado para el resto de los Trp ubicados en la región portal, lo cual indica que vería un entorno ligeramente

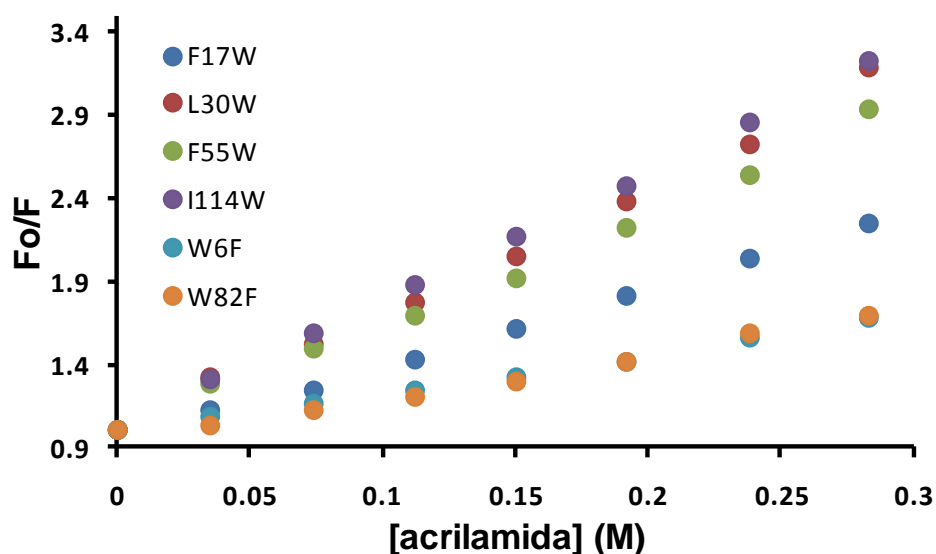
más hidrofóbico (**Figura 30**). Esto concuerda con las estructuras obtenidas por modelado de minimización de energía (**Figura 29**) la que muestran que este Triptofano podría estar apuntando hacia adentro de la región portal.

### 2.3. Quenching de los mutantes de IFABP con acrilamida

El quenching de residuos de triptófanos con acrilamida es un ensayo muy utilizado para analizar el grado de exposición de estos residuos al solvente en la proteína (Van Rooijen et al., 2009). Dado que la acrilamida es soluble en un medio acuoso, la efectividad del quenching es muy sensible al grado de exposición del triptófano al solvente. Por ende, aquellos triptófanos ubicados en matrices hidrofóbicas serán menos accesibles a las moléculas de acrilamida y, por consiguiente, quencheados con una menor eficiencia que aquellos triptófanos expuestos al medio acuoso. Los resultados se analizaron mediante el método de Stern-Volmer en el cual la relación de la fluorescencia del Trp en ausencia y presencia de acrilamida ( $F_0/F$ ) se grafica en función de la concentración de acrilamida creciente (**Figura 31**). De la pendiente se obtiene la constante de quenching ( $K_{sv}$ ). A mayor  $K_{sv}$  observada, más expuesto al solvente, y por ende a la acrilamida, está el triptófano analizado. Los mutantes de IFABP mostraron las siguientes  $K_{sv}$  (**Tabla VII**):

**Tabla VII.** Constantes de Stern-Volmer para el quenching de los mutantes con acrilamida.

	<b>W6F</b>	<b>W82F</b>	<b>F17W</b>	<b>L30W</b>	<b>F55W</b>	<b>I114W</b>	<b>wtIFABP</b>
<b><math>K_{sv}</math></b>	2.4	2.7	4.8	8.1	7.0	8.0	2.7



**Fig 31. Quenching de los mutantes de IFABP con acrilamida.** A una solución 1  $\mu\text{M}$  de cada uno de los mutantes se le agregó concentración creciente de acrilamida (0 – 0.3 M).  $F_o/F$  es la relación entre la intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia ( $F_o$ ) y presencia de acrilamida ( $F$ ). Los datos fueron ajustados con la ecuación de Stern-Volmer para obtener la constante de quenching ( $K_{sv}$ ).

Los resultados obtenidos dan cuenta de que los residuos de triptófanos estudiados se encontrarían en entornos diferentes. Por un lado, los triptófanos naturales de IFABP se encuentran poco accesibles al entorno, como se refleja en sus  $K_{sv}$  bajos (**Tabla VII**). El Trp82 (mutante W6F), al estar localizado profundamente en el barril- $\beta$ , es el que más difícilmente es quencheado por la acrilamida, confirmando la alta hidrofobicidad presente en la cavidad. En el caso del Trp6, su interacción con la fracción alifática de la Lys130 lo aislaría del entorno. Este resultado es coincidente con los espectros de fluorescencia obtenidos, los cuales se corresponden con triptófanos ubicados en entornos hidrofóbicos.

Por otro lado, los Trp ubicados en la región portal son los más expuestos al solvente. En especial, los Trp en posiciones 30, 55 y 114 se encontrarían dispuestos más superficialmente en la proteína según puede verse de sus  $K_{sv}$ . El Trp17 presenta una menor accesibilidad a la acrilamida, lo que puede corresponderse, como ya fue mencionado anteriormente, a que este residuo se orienta hacia el interior de la proteína y no tan superficialmente como el resto. Estos resultados también se ven reflejados en los espectros de emisión fluorescentes discutidos en el ítem anterior.

## **2.4. Determinación de la profundidad de penetración en membranas lipídicas de los mutantes puntuales de IFABP empleando lípidos brominados**

El uso de quenching de fluorescencia por moléculas quenchers situadas a profundidades discretas dentro de una membrana lipídica es una técnica bien conocida y utilizada para determinar la profundidad de inserción de triptófanos proteicos situados en dominios de unión a membranas (Abrams and London et al., 1992). Uno de los quenchers mas empleados en este tipo de determinaciones es el bromo, el cual puede unirse a distintas posiciones en la cadena acilada de las fosfatidilcolinas (McIntosh and Holloway et al., 1986). El bromo es un quencher colisional de triptófano que interactúa a cortas distancias, lo que permite obtener una localización precisa a la que se ubicaría el triptófano estudiado en la vesícula lipídica. Otra de las ventajas del empleo de bromo como quencher es su pequeño volumen molecular, prácticamente igual al de un grupo metilo, que es bien tolerado en las membranas (Markello et al., 1985; Everett et al., 1986). El análisis de difracción de rayos X de las bromofosfatidilcolinas (BrPCs), con bromos ubicados en distintas posiciones de la cadena alifática, ha demostrado que el bromo no perturba drásticamente el espesor de la bicapa lipídica (McIntosh and Holloway et al., 1986). A su vez, este tipo de análisis permitió determinar la distancia de los átomos de bromo al centro de la bicapa, datos empleados posteriormente para determinar la profundidad de inserción de los triptófanos mediante el análisis de paralaje (**Tabla VIII**).

La generación de mutantes puntuales de Triptófano de IFABP nos permite determinar de manera directa y precisa la profundidad de inserción de la proteína en la bicapa lipídica mediante el análisis de quenching de los residuos de Triptófano por vesículas constituidas por lípidos brominados en distintas posiciones de la cadena (6,7-BrPC; 9,10-BrPC y 11,12BrPC) (Abrams and London et al., 1992).



**Tabla VIII.** Dimensiones de la bicapa y distancia del bromo al centro de la bicapa (McIntosh y Holloway, 1986).

Lípido	Espesor de la bicapa (Å)	Distancia del bromo al centro de la bicapa (Å)
POPC	49	
6,7-BrPC	49	10.8
9,10-BrPC	49	8.3
11,12-BrPC	49	6.3

POPC, 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina; BrPC, 1-palmitoil-2 dibromoestearoil-fosfatidilcolina; 6,7-, 9,10- y 11,12-BrPC, BrPC con los átomos de bromo en la posición designada.

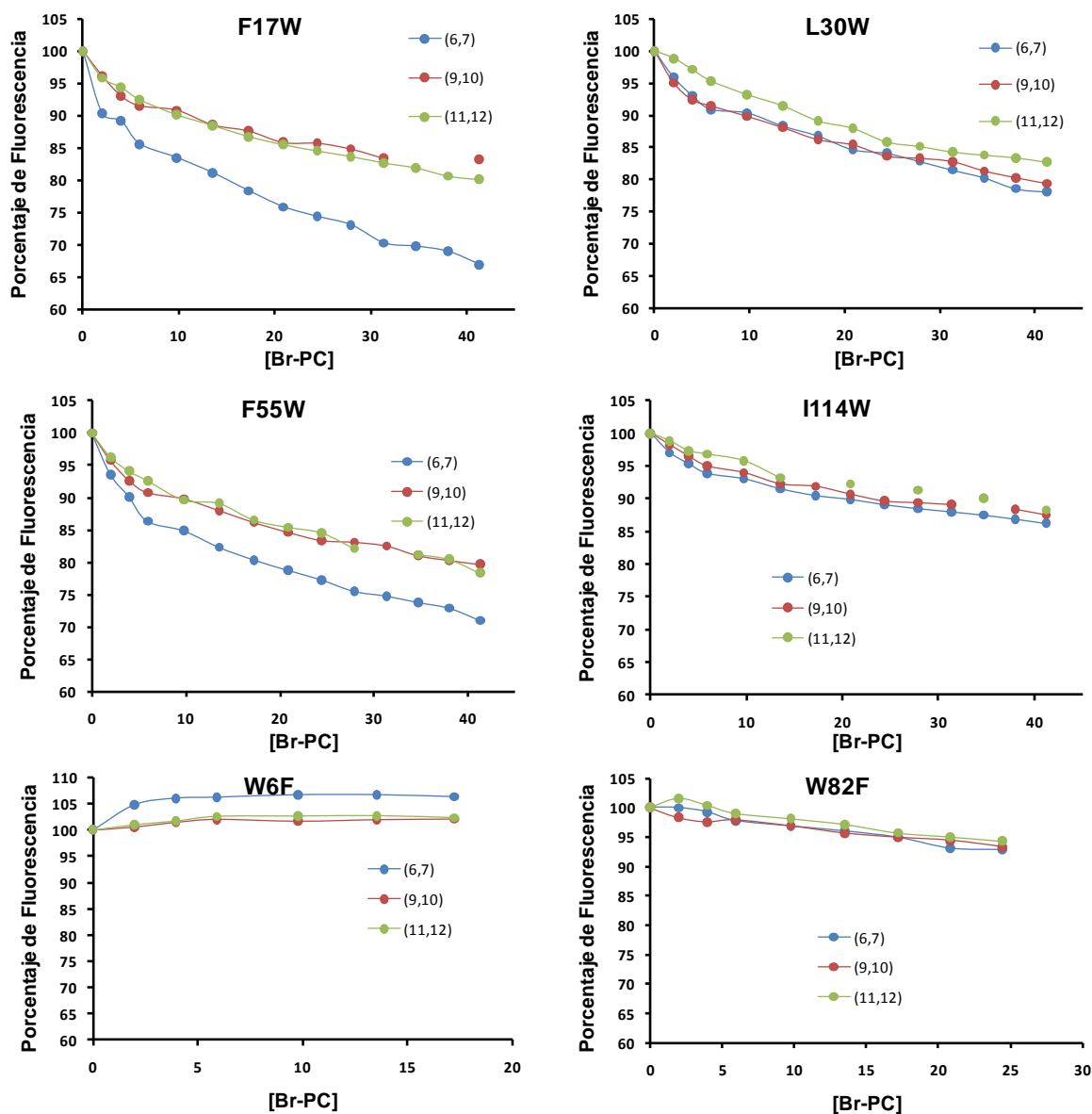
**Análisis de paralaje para un fluoróforo y un quencher distribuidos en dos profundidades diferentes:** Como ya fue mencionado en Materiales y Métodos, la ubicación de un fluoróforo dentro de la bicapa lipídica puede ser estudiada empleando un quencher ubicado a distintas profundidades y por medio de la siguiente ecuación:

$$Z_{cf} = L_{c1} + \left[ \frac{-\ln\left(\frac{F_1}{F_2}\right)}{\pi C} - L_{12}^2 \right] / 2L_{12} \quad (11)$$

donde  $Z_{cf}$  es la distancia transversal desde el plano del centro de la bicapa al plano conteniendo el fluoróforo,  $F_1$  es la fluorescencia en presencia del quencher mas superficial,  $F_2$  es la fluorescencia en presencia del quencher mas profundo,  $C$  es la concentración del quencher en moléculas de quencher por Å<sup>2</sup> de membrana (calculada como fracción molar de lípido quencher en total lípido/70, asumiendo el área superficial de 70 Å<sup>2</sup> por lípido),  $L_{c1}$  es la distancia transversal desde el centro de la bicapa al quencher superficial, y  $L_{12}$  es la distancia transversal entre el quencher profundo y el quencher superficial.

### 2.4.1. Mutantes puntuales de triptófano de IFABP versus lípidos brominados

Los resultados de quenching de los mutantes de IFABP, en su forma apo, con concentraciones crecientes de vesículas brominadas en distintas posiciones de la cadena se observan en la **Figura 32**.



**Fig 32. Curvas representativas del agregado de vesículas de Br-PC a los mutantes de IFABP.** Vesículas preparadas con 6,7-BrPC (celeste) o 9,10-BrPC (rojo) o 11,12-BrPC (verde) fueron agregadas en concentración creciente a una solución 5  $\mu$ M de cada uno de los mutantes.

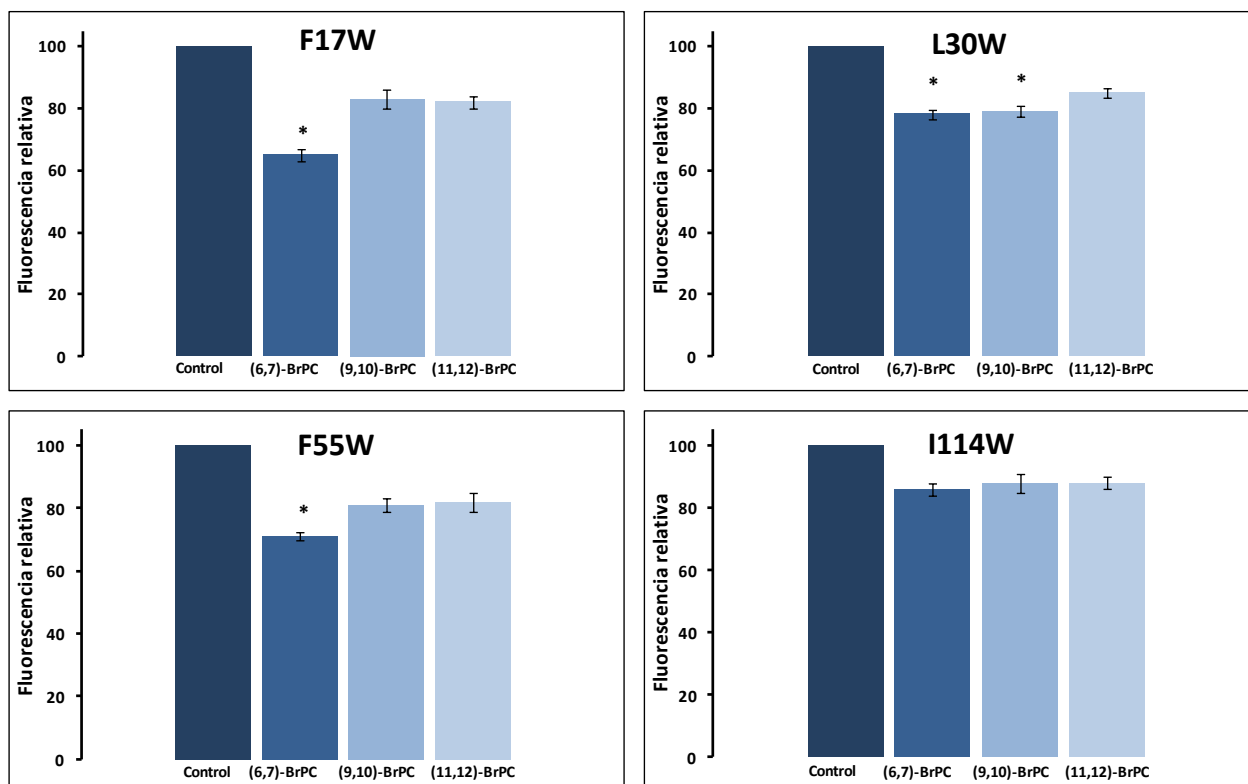
Los datos de quenching de enfrentar una solución 5  $\mu\text{M}$  de cada mutante con 40  $\mu\text{M}$  de las vesículas bromolípídicas se muestran en la **Tabla IX** y en la **Figura 33** están representados en un gráfico de barras los datos para los mutantes de la región portal.

**Tabla IX.** Intensidad de fluorescencia de los mutantes en vesículas de bromilípidos.

	<b>F17W</b>	<b>L30W</b>	<b>F55W</b>	<b>I114W</b>	<b>W6F</b>	<b>W82F</b>
	100	100	100	100	100	100
<b>6,7-BrPC</b>	65 $\pm$ 3	78 $\pm$ 2	71 $\pm$ 2	86 $\pm$ 3	106 $\pm$ 5	93 $\pm$ 4
<b>9,10-BrPC</b>	83 $\pm$ 6	79 $\pm$ 3	81 $\pm$ 3	88 $\pm$ 6	102 $\pm$ 7	92 $\pm$ 3
<b>11,12-BrPC</b>	82 $\pm$ 4	85 $\pm$ 3	82 $\pm$ 4	88 $\pm$ 4	102 $\pm$ 3	94 $\pm$ 8

<sup>a</sup>Los valores representan la intensidad de fluorescencia de una solución 5 $\mu\text{M}$  de cada mutante con 40 $\mu\text{M}$  de vesículas bromolípídicas calculada como porcentaje de la fluorescencia de la proteína sola.

<sup>b</sup>Los datos son el promedio  $\pm$  desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos separados.



**Fig 33. Quenching de los mutantes de IFABP por vesículas bromolípídicas.** Vesículas preparadas con 6,7-BrPC o 9,10-BrPC o 11,12-BrPC fueron agregadas en concentración creciente 40  $\mu\text{M}$  a una solución 5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los mutantes. El análisis de varianza de Fisher fue usado para comparar si los valores de los conjuntos de datos numéricos obtenidos para los distintos bromolípídicos son significativamente diferentes.

La distancia de los triptófanos de cada uno de los mutantes puntuales al centro de la bicapa lipídica ( $Z_{cf}$ ) fue calculada con la ecuación 11, obteniéndose los siguientes valores (**Tabla X**):

**Tabla X.** Distancia de los triptófanos al centro de la bicapa.

<b>Mutante IFABP</b>	<b>Distancia al centro de la bicapa (Å)</b>
<b>F17W</b>	9.33 ± 0.03
<b>L30W</b>	9.08 ± 0.02
<b>F55W</b>	9.29 ± 0.04

<sup>a</sup>Los datos son el promedio ± desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos separados.

En primera instancia, los resultados de la interacción de los mutantes de triptófano con vesículas brominadas muestran claramente una interacción de la proteína con membranas fosfolipídicas, y que dicha interacción estaría mediada por la región  $\alpha$ -helicoidal de la proteína. Además parecen indicar que dicha interacción no se daría simplemente a nivel superficial sino que la proteína penetraría parcialmente en la membrana.

Los resultados mostrados en las **Figuras 32 y 33** y en la **Tabla IX** aportan valiosa información acerca de la interacción de cada residuo estudiado con las membranas bromolipídicas. Por un lado, se observa que los triptófanos insertados en las posiciones 17 (perteneciente a la hélice  $\alpha$ -I) y 55 (del  $\beta$ -turn) son fuertemente quencheados por el 6,7-BrPC en comparación con los otros bromolípidos. Este quenching selectivo significa que los mencionados residuos se ubican dentro de la bicapa en las inmediaciones del bromo unido en las posiciones 6-7 de la fosfatidilcolina, a profundidades equiparables. Por otro lado, el triptófano de la posición 30 (perteneciente a la hélice  $\alpha$ -II) es quencheado en igual medida por el 6,7-BrPC y por el 9,10-BrPC, y en menor magnitud por el 11,12-BrPC. Este resultado indicaría que el triptófano de este mutante estaría localizado dentro de la bicapa en una profundidad intermedia entre los bromos más superficiales (6,7-BrPC) y los centrales (9,10-BrPC). La intensidad de quenching observada para el mutante L30W es menor comparada a la que sufren los mutantes F17W y F55W, este hecho

posiblemente sea debido a la distancia a la que estarían los triptófanos de cada mutante al bromo quencher, ya que la efectividad del quenching es muy sensible a la distancia y depende fuertemente de esta. Por ende, los triptófanos 17 y 55 estarían localizados muy próximos a los bromos de 6,7-BrPC mientras que el triptófano 30, al mostrar igual quencheo por 6,7-BrPC y 9,10-BrPC, se encontraría ubicado entre estos en una posición equidistante de ambos.

Los resultados obtenidos para los triptófanos naturales de IFABP, posiciones 6 y 82, y el triptófano insertado en la posición 114 no muestran un quenching significativo por ninguno de los bromolípidos en particular, lo que llevaría a pensar que estos residuos no interactuarían con la fase lipídica en el complejo proteína-membrana. Este resultado es esperable debido a que el triptófano 82 (mutante W6F) se encuentra orientado hacia el interior de la cavidad beta y no formaría parte del dominio de unión a membrana. En el mismo sentido, el triptófano 6 (mutante W82F) también se halla relativamente lejos de la región  $\alpha$ -helicoidal, manteniéndose en la fase acuosa durante la interacción de la proteína con la membrana.

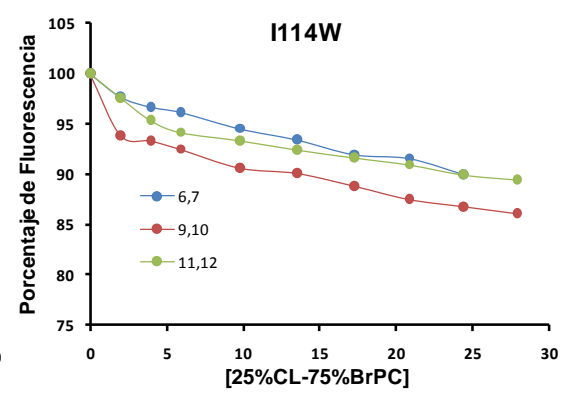
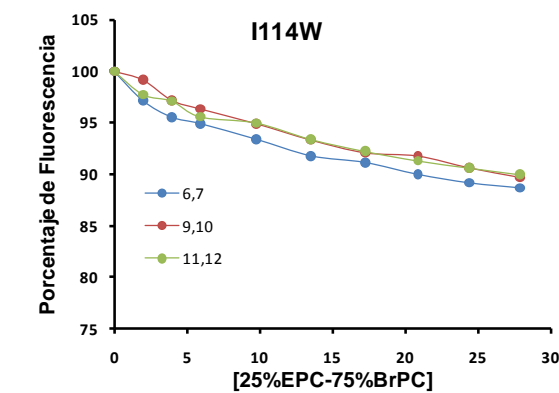
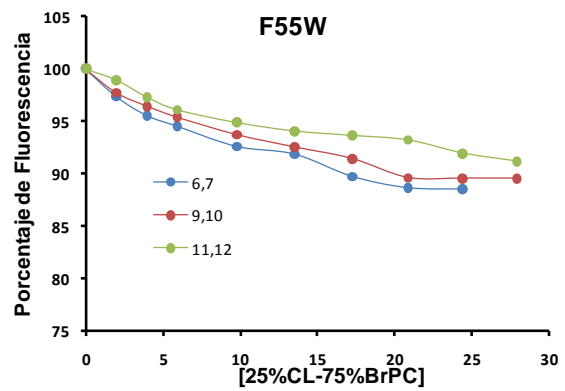
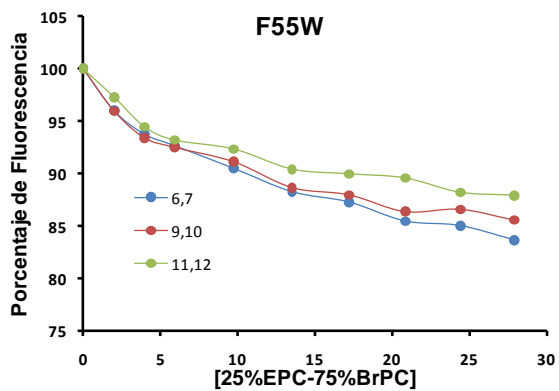
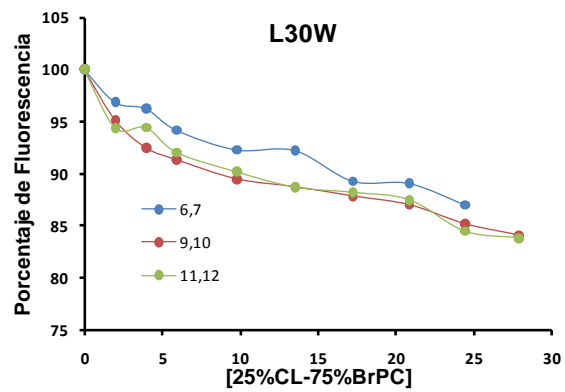
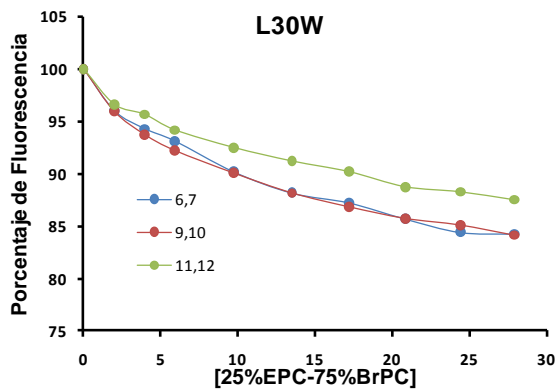
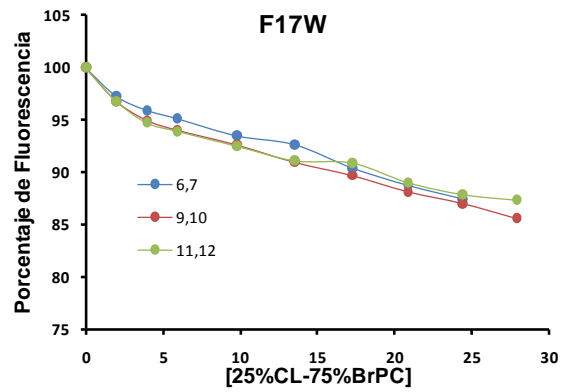
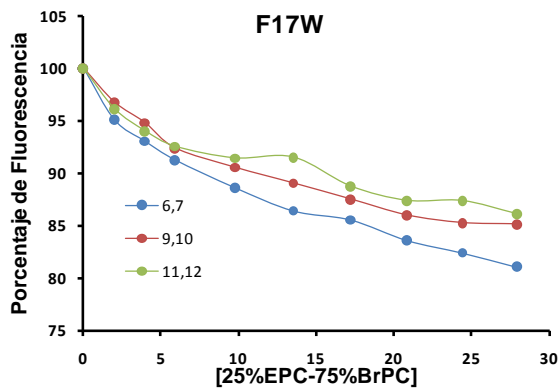
La distancia al centro de la bicapa calculada para los residuos de triptófano que interactúan con los bromolípidos (**Tabla X**) brinda información acerca de la relativa profundidad a la cual estaría localizado cada uno de ellos dentro de la vesícula fosfolipídica. Estos cálculos muestran que, efectivamente, el Trp30 es el que se acomodaría a mayor profundidad en la membrana, mientras que los Trp17 y Trp55 se ubicarían más superficialmente, ambos a profundidades equiparables. Estudios realizados con mutantes puntuales de triptófano de la proteína integral de membrana Citocromo  $b_5$  (Ladokhin et al., 1991) y bromolípidos, han mostrado distancias al centro de la bicapa de 2.5 Å y 4.5 Å, dependiendo de la posición analizada. La mayor profundidad observada para esta proteína con respecto a IFABP se debería a que el citocromo está inmerso en la membrana mientras que IFABP interactuaría más superficialmente con la misma.

Los resultados presentes confirman que la proteína interactúa con membranas fosfolipídicas a través de la región portal y muestran, por primera vez, que esta interacción no es simplemente un contacto superficial, sino que

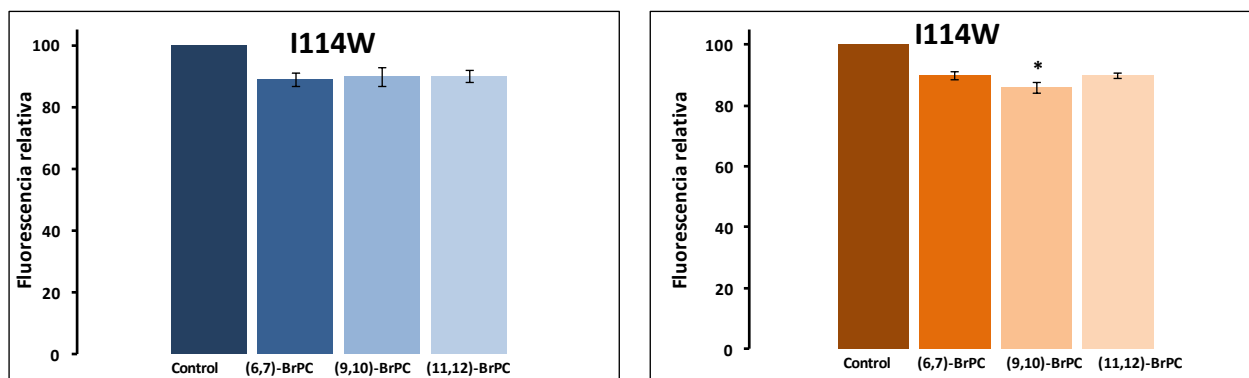
existe una penetración de la IFABP en la fase lipídica. Asimismo, se ha demostrado la importancia de la hélice  $\alpha$ -II en esta interacción.

#### **2.4.2. Efecto de la carga superficial de las membranas**

Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que las interacciones electrostáticas entre una proteína y la superficie de una membrana lipídica se ven afectadas por la carga superficial de la vesícula y por la fuerza iónica del medio circundante. Para determinar si estos factores afectan la interacción proteína-membrana se realizaron los mismos ensayos modificando la carga negativa superficial de las vesículas y la concentración salina del medio. Para incrementar la carga neta negativa de las vesículas fosfolipídicas se agregó un 25% de cardiolipina en su composición. La cardiolipina es un fosfolípido singular con una estructura dimérica, ya que su composición consta de cuatro cadenas aciladas y dos cargas negativas. En células eucariotas está localizada exclusivamente en mitocondrias, con aproximadamente un cuarto de su totalidad ubicado en la membrana mitocondrial externa, donde interactuaría con proteínas citoplasmáticas (Hovious et al., 1990). Los mutantes de triptófano se enfrentaron con las vesículas de CL y se empleó como control de membranas zwitteriónicas vesículas constituídas por 25%EPC-75%BrPC, de modo de mantener constante la relación entre lípidos brominados y no brominados con respecto a las vesículas con CL (**Figura 34**) (Cheruku et al., 2006).



**Fig 34. Efecto de la carga superficial de la vesícula en la interacción con los diferentes mutantes de IFABP.** Vesículas preparadas con 25%EPC ó 25%CL y 75% BrPC con el bromo en la posición 6,7 (celeste), 9,10 (rojo) ó 11,12 (verde). Las vesículas fueron agregadas en concentración creciente a una solución 5  $\mu$ M de cada uno de los mutantes.



**Fig 35. Efecto de la carga superficial de la vesícula sobre la fluorescencia del mutante I114W.** Quenching de la fluorescencia del mutante I114W por vesículas bromolípicas zwitteriónicas (barras azules) o cargadas (barras naranjas). El análisis de varianza de Fisher fue usado para comparar si los valores de los conjuntos de datos numéricos obtenidos al enfrentar el mutante con vesículas bromolípicas, son significativamente diferentes entre sí.

Los valores hallados para la distancia de los Triptófanos de cada mutante de IFABP al centro de la bicapa de las vesículas neutras o cargadas fueron los siguientes (**Tabla XI**):

**Tabla XI.** Distancia de los triptófanos al centro de la bicapa.

Mutante IFABP	Distancia al centro de la bicapa (Å)	
	25%EPC-75%BrPC	25%CL-75%BrPC
<b>F17W</b>	9.11 $\pm$ 0.03	9.01 $\pm$ 0.03
<b>L30W</b>	9.03 $\pm$ 0.02	8.92 $\pm$ 0.03
<b>F55W</b>	9.06 $\pm$ 0.04	9.13 $\pm$ 0.03
<b>I114W</b>	9.16 $\pm$ 0.02	8.92 $\pm$ 0.01

<sup>a</sup>Los datos son el promedio  $\pm$  desvío estándar de valores obtenidos en tres experimentos separados.

Por un lado, se ve que el agregado de un 25% EPC en las vesículas zwitteriónicas modifica la penetración de los residuos de triptófano estudiados comparados con vesículas constituídas por 100%BrPC, como puede verse de las **tablas X y XI**. En general, se vé una mayor inserción de estos en la bicapa.



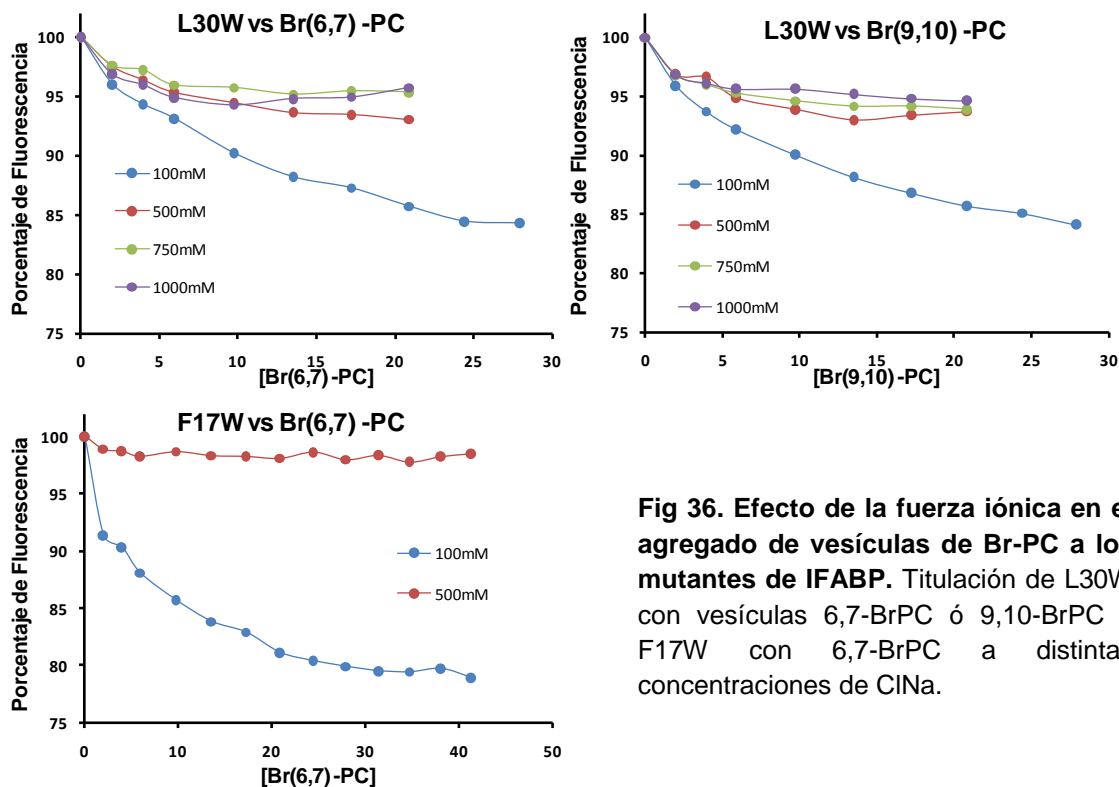
Este fenómeno es mayormente observado para el mutante I114W (**Figura 35**), el cual pareciera no interactuar con vesículas 100%BrPC pero, al emplear vesículas 25%EPC-75%BrPC, se pudo ver una mayor interacción con el 6,7-BrPC respecto al resto y calcular una distancia al centro de la bicapa. Este comportamiento podría estar relacionado a un cambio en la fluidez de la membrana producto de la variación en la composición, lo que afectaría la interacción proteína-vesícula.

El aumento en la carga superficial negativa de la membrana afecta la penetración de cada triptófano en la bicapa. Por un lado, se ve una mayor inserción de los residuos 17, 30 y 114 en las vesículas ácidas con respecto a las observadas para las zwitteriónicas (25%EPC-75%BrPC), lo cual estaría de acuerdo a la importancia que desempeñarían las fuerzas electrostáticas en la interacción proteína-membrana. Llamativamente, el residuo 55 presenta un comportamiento totalmente inverso, alejándose del centro de la bicapa con el aumento de la carga negativa superficial. El particular comportamiento de los distintos residuos de triptófano podría deberse a que, el aumento en la carga superficial negativa de la bicapa lipídica, podría conllevar a un cambio en la orientación con que la proteína interactuaría dentro de la membrana por el incremento del número de interacciones electrostáticas. También, el incremento en la carga superficial de la vesícula podría ocasionar cambios en la conformación que la proteína adoptaría dentro de la región hidrofóbica de la bicapa lipídica. Esto puede deberse a que la proteína sufriría un cambio conformacional al interactuar con membranas fosfolípidicas y que, dicho cambio, se vería afectado por el aumento de la carga superficial de la vesícula.

#### **2.4.3. Efecto de la fuerza iónica**

El incremento en la fuerza iónica del medio debilita drásticamente las interacciones de tipo electrostáticas debido a que los iones apantallan las cargas superficiales positivas de la proteína y las negativas de la membrana. Para analizar como influye la fuerza iónica del medio en la interacción proteína-

membrana, se realizó el ensayo a distintas concentraciones de cloruro de sodio (100, 500, 750 y 1000 mM) (**Figura 36**).



**Fig 36. Efecto de la fuerza iónica en el agregado de vesículas de Br-PC a los mutantes de IFABP.** Titulación de L30W con vesículas 6,7-BrPC ó 9,10-BrPC y F17W con 6,7-BrPC a distintas concentraciones de ClNa.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el aumento en la concentración salina afecta notablemente la interacción de la proteína con las vesículas. Por lo tanto, se evidencia que las fuerzas electrostáticas estarían desempeñando un rol fundamental en la interacción de la IFABP con membranas fosfolipídicas.

Analizando en conjunto los resultados obtenidos indican que la región portal, en particular la hélice  $\alpha$ -II, es el dominio de unión a membranas fosfolipídicas. Estos resultados son consistentes con trabajos previos realizados en nuestro laboratorio empleando otros métodos en los cuales se ha postulado la hipótesis de la región  $\alpha$ -helcoidal como dominio de unión a membrana. En los primeros estudios, se empleó una variante estructural de IFABP carente de la región  $\alpha$ -helcoidal, HL-IFABP, la cual permitió estudiar el rol crítico del dominio helicoidal en el mecanismo de transferencia del ligando y

su interacción con membranas (Córsico et al., 1998). Se demostró que este mutante, a pesar de perder las  $\alpha$ -hélices, presenta una estructura secundaria de hoja  $\beta$  plegada estable y mantiene la capacidad de unir ácidos grasos. Se vió que la ausencia del dominio  $\alpha$ -helicoidal altera drásticamente el mecanismo de transferencia de AOFA desde IFABP hacia vesículas de diferente composición (Córsico et al., 1998). Por otra parte, empleando un ensayo de competencia con citocromo c, se observó una disminución del 80% por parte de HL-IFABP en la prevención de la unión del citocromo c a membranas en comparación con IFABP (Córsico et al., 1998). Experimentos de fotocrosslinking seguido de proteólisis han demostrado una mayor interacción del péptido conteniendo la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP (Falomir-Lockhart et al., 2011). Estos estudios constituyen la base sobre la cual se desarrollo la hipótesis acerca de la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en la formación del complejo proteína-membrana y postular un mecanismo de interacción de IFABP con membranas desarrollado en distintas etapas. La interacción inicial entre la proteína y membrana estaría seguida de una transición conformacional de la proteína desde un estado cerrado a un equilibrio de estados abiertos, en tercera instancia el ácido graso se disociaría de la proteína para finalmente incorporarse en la membrana (Hodson et al., 1997; Córsico et al., 1998; Falomir et al., 2006).

Para profundizar aún más en la función que tendría la región  $\alpha$ -helicoidal en las características colisionales de IFABP, en nuestro laboratorio se construyeron un par de proteínas quiméricas por intercambio del dominio  $\alpha$ -helicoidal completo entre I- y LFABP ( $\alpha$ L $\beta$ IFABP y  $\alpha$ I $\beta$ LFABP). El mecanismo de transferencia mostrados por cada una de las proteínas quiméricas mostró una marcada dependencia con respecto a sus respectivas regiones helicoidales, demostrando que la región  $\alpha$ -helicoidal es responsable de los distintos mecanismos de transferencia mostrados por cada FABP (Córsico et al., 2004).

Por otra parte, los resultados aquí presentados han permitido demostrar la importancia de las interacciones electrostáticas en la formación del complejo proteína-membrana al observarse una mayor penetración de los residuos de la hélice- $\alpha$ II de IFABP en vesículas conteniendo CL. Esto puede

ser atribuido a la mayor proporción de cargas negativas, y por ende un incremento en las interacciones electrostáticas con los residuos positivos en la superficie de la proteína. Como ha sido ampliamente discutido, los residuos catiónicos de superficie de IFABP juegan un rol fundamental en la formación de interacciones iónicas con membranas fosfolipídicas; el mismo efecto es observado en aquellos miembros de la familia que también presentan un mecanismo de transferencia de tipo colisional. Las FABP “colisionales” presentan una topología de potenciales electrostáticos de superficie muy similar entre sí; en las mismas se observa un potencial neto positivo en la región  $\alpha$ -helicoidal, lo cual fortalece la hipótesis de la importancia de dicho dominio en la interacción con membranas (LiCata et al., 1998). En nuestro laboratorio se analizó la importancia de los residuos con carga positiva (Lys<sup>16</sup>, Lys<sup>20</sup>, Lys<sup>27</sup>, Arg<sup>28</sup> y Lys<sup>29</sup>) de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP en la interacción iónica con la membrana (Falomir-Lockhart et al., 2006). Estos resultados resaltaron la importancia de las interacciones electrostáticas entre la  $\alpha$ -II y las membranas fosfolipídicas, y sugieren que la cara cargada de la hélice  $\alpha$ -II es crítica para la interacción con las vesículas. 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 et al., 1997 (a)). En concordancia con dicha hipótesis, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis parecen indicar que la IFABP sufriría un cambio conformacional al interactuar con membranas y que, dicho cambio, sería dependiente de la carga superficial de la membrana. En estos cambios conformacionales estarían involucradas tanto interacciones iónicas como hidrofóbicas (Córsico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al., 2006). El primer contacto de la proteína con la superficie de la bicapa estaría gobernado por interacciones de naturaleza electrostática, como han demostrado los experimentos a alta fuerza iónica, seguido por una inserción de la proteína en la fase lipídica dirigida por interacciones hidrofóbicas, como han demostrado los experimentos empleando lípidos zwitteriónicos.

Con el objetivo de estudiar la importancia de las interacciones hidrofóbicas, en nuestro laboratorio se estudió el efecto de la neutralización de los residuos de Lys de IFABP mediante una acetilación completa de los

mismos (Córsico et al., 2005). Estos estudios muestran que las interacciones electrostáticas juegan un rol importante en la velocidad de transferencia del ácido graso desde IFABP hacia membranas aceptoras y que las interacciones hidrofóbicas también participan en dicho proceso. En ausencia completa de los residuos superficiales de lisina cargados positivamente, las interacciones hidrofóbicas son suficientes para formar el complejo colisional proteína-membrana con fosfolípidos neutros.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las interacciones de carácter iónico serían cruciales en el primer contacto de la proteína a la bicapa, seguida luego por interacciones hidrofóbicas mediante las cuales la hélice se introduciría en la fase lipídica.



# Conclusiones

Empleando ligandos naturales hemos confirmado que LFABP presenta un comportamiento diferente en sus propiedades de unión y transferencia, en comparación con el resto de los miembros de la familia. También hemos demostrado que una misma proteína podría emplear distintos mecanismos cinéticos dependiendo del ligando que tiene unido. Esto podría indicar que LFABP adquiere diferentes conformaciones cuando se une a distintos ligandos y que, estas variaciones conformacionales, inducirían cambios en las propiedades superficiales de la proteína modificando las características de transferencia. Esta propiedad podría indicar que LFABP tiene mecanismos específicos para orientar ligandos a distintos destinos metabólicos. El empleo de este tipo de metodología al análisis de las propiedades de unión y transferencia de ligandos naturales desde IFABP podría aportar en el futuro información que resulte de gran utilidad para profundizar el análisis de las propiedades específicas de IFABP, así como de las posibles diferencias entre I- y LFABP en sus funciones en el enterocito.

Por otra parte, hemos demostrado la importancia de la región portal en la interacción física de IFABP con membranas fosfolipídicas. Previamente, mediante ensayos con variantes estructurales (mutantes puntuales, quimeras y variantes truncadas como la HL-IFABP), se han reconocido los determinantes estructurales responsables de sus características funcionales. El presente trabajo aporta nuevas evidencias que indican que la región portal, y sobre todo la región  $\alpha$ -helicoidal, serían determinantes en el establecimiento del complejo entre la proteína y la membrana. Tanto la carga superficial de la vesícula como la fuerza iónica del medio afectarían la interacción de IFABP con membranas, lo que sugiere que las fuerzas electrostáticas serían fundamentales en el primer acercamiento de la proteína a la superficie de las vesículas. Más aún, el presente trabajo ha permitido analizar en forma directa el grado de penetración en la membrana de diferentes regiones de la proteína. En un futuro, estudios equivalentes con LFABP permitirán profundizar el análisis de las características

estructurales subyacentes a las diferencias funcionales que presentan estas proteínas entre sí.

Es probable que tanto LFABP como IFABP cumplan un rol de direccionamiento de los FA a distintos destinos metabólicos específicos o estructuras membranosas subcelulares, como por ejemplo peroxisomas y mitocondrias. Desde el punto de vista de nuestros aportes a la resolución de esta incógnita, es importante tener en cuenta las limitaciones de los estudios *in vitro* realizados, y 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 compartimento subcelular.





# Referencias Bibliográficas

- ~ Abrams FS, London E. Calibration of the Parallax Fluorescence Quenching Method for Determination of Membrane Penetration Depth: Refinement and Comparison of Quenching by Spin-Labeled and Brominated Lipids. *Biochemistry*. 1992. 31:5312-22.
- ~ Abumrad NA, Perkins RC, Park JH, Park CR. Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem*. 1981. 256(17):9183-91.
- ~ Agellon LB, Li L, Luong L, Uwiera RR. Adaptations to the loss of intestinal fatty acid binding protein in mice. *Mol Cell Biochem*. 2006. 284(1-2):159-66.
- ~ Agellon LB, Toth MJ, Thomson AB. Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem*. 2002. 239(1-2):79-82. Review.
- ~ Alvite G, Di Pietro SM, Santomé JA, Ehrlich R, Esteves A. Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta*. 2001. 1533(3):293-302.
- ~ Anantharamaiah GM, *The Amphipathic Helix*. 1993. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ~ 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. 274(3 Pt 1):C633-44.
- ~ Atshaves BP, McIntosh AL, Storey SM, Landrock KK, Kier AB, Schroeder F. High dietary fat exacerbates weight gain and obesity in female liver fatty acid binding protein gene-ablated mice. *Lipids*. 2010. 45(2):97-110.
- ~ 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. 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. 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.
- ~ 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. 8:98(1-2):167-76. Review.
- ~ Bass NM. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol*. 1988. 111:143-84. Review.
- ~ 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. 16(3):1162-73.
- ~ Bloom W.; and D. W. Fawcett. Bloom-Fawcett Tratado de Histología, duodécima edición. Editorial Interamericana-Mc Graw-Hill. 1995.
- ~ Bu SY, Mashek MT, Mashek DG. Suppression of long chain acyl-CoA synthetase 3 decreases hepatic de novo fatty acid synthesis through decreased transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2009. 284(44):30474-83.
- ~ Burrier RE, Manson CR, Brecher P. Binding of acyl-CoA to liver fatty acid binding protein: effect on acyl-CoA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. 919:221-30.

- ~ 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. 134(6):933-44.
- ~ Carrizo C. M., Crovetto C., Barrientos E. B., Córdoba O. L. and J. A. Santomé. Presence of a fatty acid-binding protein in the digestive gland of mollusca (*Platinigera magellanica*). Comunicación oral en XXXVIII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, Noviembre 5-9 de 2002.
- ~ 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. 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. 21(17):4023-30.
- ~ Chattopadhyay A, London E. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*. 1987. 26:39-45.
- ~ Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 2001. 294(5548):1866-70.
- ~ Cheruku SR, Xu Z, Dutia R, Lobel P, Storch J. Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. *J Biol Chem*. 2006. 281(42):31594-604.
- ~ Cistola DP, Kim K, Rogl H, Frieden C. Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochemistry*. 1996. 35(23):7559-65.
- ~ Clérico E.M.; and M. R. Ermacora. (2001). Tryptophan mutants of intestinal fatty acid-binding protein: ultraviolet absorption and circular dichroism studies. *Arch Biochem Biophys*. 395:215-224.
- ~ Constantinides PP, Steim JM. Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape. *J. Biol. Chem*. 1985. 260:7573-80.
- ~ 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. 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. 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. 43(12):3600-7.
- ~ 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. 43(15):4473-81.
- ~ 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. 41(1):84-92.
- ~ Di Pietro SM, Córscico B, Perduca M, Monaco HL, Santomé JA. Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry*. 2003. 42(27):8192-203.
- ~ Di Pietro SM, Córscico B, Perduca M, Monaco HL, Santomé JA. Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry*. 2003. 42(27):8192-203.

- ~ Di Pietro SM, Santomé JA. Isolation, characterization and binding properties of two rat liver fatty acid-binding protein isoforms. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. 1478:186–200.
- ~ Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem*. 2000. 275(40):30749-52.
- ~ Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*. 1967. 6(7):1948-54.
- ~ Edqvist J, Blomqvist K. Fusion and fission, the evolution of sterol carrier protein-2. *J Mol Evol*. 2006. 62(3):292-306.
- ~ Elholm M, Dam I, Jorgensen C, Krogsdam AM, Holst D, Kratchmarova I, Gottlicher M, Gustafsson JA, Berge R, Flatmark T, Knudsen J, Mandrup S, Kristiansen K. Acyl-CoA esters antagonize the effects of ligands on peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformation, DNA binding, and interaction with co-factors. *J. Biol. Chem*. 2001. 276:21410–6.
- ~ 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. 18(2):347-9.
- ~ Everett J, Dam Zlotnickg A, Tennyson J, Holloway P. Fluorescence quenching of Cytochrome b5 in Vesicles with an Asymmetric Transbilayer Distribution of Brominated Phosphatidylcholine. *The journal of biological chemistry*. 1986. Vol 261 No. 15.
- ~ 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. 281(20):13979-89.
- ~ Falomir-Lockhart LJ, Franchini GR, Guerbi MX, Storch J, Córscico B. Interaction of Enterocyte FABPs with Phospholipid Membranes: Clues for Specific Physiological Roles. (In press).
- ~ 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. 1781(4):192-9.
- ~ Frieden C, Jiang N, Cistola DP. Intestinal fatty acid binding protein: folding of fluorescein-modified proteins. *Biochemistry*. 1995. 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. 90(5):1535-45.
- ~ Friedman R, Nachliel E, Gutman M. Molecular dynamics simulations of the adipocyte lipid binding protein reveals a novel entry site for the ligand. *Biochemistry*. 2005. 44(11):4275-83.
- ~ Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001. 294(5548):1871-5.
- ~ Gangl A, Ockner RK. Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J Clin Invest*. 1975. 55(4):803-13.
- ~ Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. 1989. 182(2):319-26.
- ~ 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. 278(18):16039-44.
- ~ Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*. 1996. 35(3):243-82.

- ~ Glatz JF, Veerkamp JH. Removal of fatty acids from serum albumin by Lipidex 1000 chromatography. *J Biochem Biophys Methods*. 1983. 8(1):57-61.
- ~ 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. 8:39.
- ~ Gomori GA. modification of colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J Lab Clin Med*. 1942. 27:955-960.
- ~ Hagan RM, Davies JK, Wilton DC. The effect of charge reversal mutations in the alpha-helical region of liver fatty acid binding protein on the binding of fatty-acylCoAs, lysophospholipids and bile acids. *Mol. Cell. Biochem*. 2002. 239:55-60.
- ~ Hagan RM, Worner-Gibbs J, Wilton DC. Tryptophan insertion mutagenesis of liver fatty acid-binding protein: L28W mutant provides important insights into ligand binding and physiological function. *J. Biol. Chem*. 2005. 280:1782-9.
- ~ 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. 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. 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. 277(29):25847-50.
- ~ Haunerland NH, Chisholm JM. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochim Biophys Acta*. 1990. 1047(3):233-8.
- ~ Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*. 2004. 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. 46(44):12543-56.
- ~ 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. 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. 274(14):9556-63.
- ~ Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids--receptor revelations. *Science*. 2001. 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. 277(3):1816-23.
- ~ Ho SY, Storch J. Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001. 281(4):C1106-17.
- ~ 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. 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. 36(8):2278-90. (a)
- ~ 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. 36(8):2278-90. (a)

- ~ Hostetler HA, Petrescu AD, Kier AB, Schroeder F. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J. Biol. Chem.* 2005. 280:18667–82.
- ~ 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. 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. 271(23):13317-23.
- ~ Huang C, Thompson TE. Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Methods Enzymol.* 1974. 32(Part B):485-9.
- ~ Huelsenbeck JP, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science.* 1997. 276(5310):227-32.
- ~ Jolly CA, Wilton DC, Schroeder F. Microsomal fatty acyl-CoA transacylation and hydrolysis: fatty acyl-CoA species dependent modulation by liver fatty acyl-CoA binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. 1483:185–97.
- ~ Kader JC. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1996. 47:627-654.
- ~ Kammann M, Laufs J, Schell J, Gronenborn B. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Research.* 1989. Vol 17 Number 13.
- ~ 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. 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. 267(28):20051-6. (b)
- ~ Kragelund BB, Knudsen J, Poulsen FM. Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim Biophys Acta.* 1999. 1441(2-3):150-61. Review.
- ~ Ladokhin AS, Wang SL, Steggles AW, Holloway PW. Fluorescence Study of a Mutant Cytochrome b5 with a Single Tryptophan in the Membrane-Binding Domain. *Biochemistry.* 1991. 30:10200-10206.
- ~ Lagakos, W., Storch, J., Zhou, Y. X., Russnak, T., and Agellon, L. FASEB J. 23, 521. 2009.
- ~ Le Beyec J, Delers F, Jourdant 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. 236(1):311-20.
- ~ Lehner R.; and A. Kuksis. (1995). Triacylglycerol synthesis by purified triacylglycerol synthetase of rat intestinal mucosa. Role of acyl-CoA acyltransferase. *J Biol Chem.* 270:13630-13636.
- ~ Lehninger A.; Nelson D.; and M. Cox. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth Edition. Freeman Press.
- ~ 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. 33(4):577-89.
- ~ Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N, Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry.* 1999. 38:185–90.
- ~ Liou HL, Storch J. Role of surface lysine residues of adipocyte fatty acid-binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles. *Biochemistry.* 2001. 40(21):6475-85.

- ~ Mansbach CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol.* 2007. 293:G645–G650.
- ~ Markello T, Zlotnick A, Everett J, Tennyson J, Holloway PW. Determination of the Topography of Cytochrome b5 in Lipid Vesicles by Fluorescence Quenching. *Biochemistry.* 1985. 24:2895-2901.
- ~ 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. 278(24):21429-38.
- ~ McIntosh TJ, Holloway PW. Determination of the Depth of Bromine Atoms in Bilayers Formed from Bromolipid Probes. *Biochemistry.* 1987. 26: 1783-8.
- ~ McIntosh TJ, Holloway PW. Determination of the Depth of Bromine Atoms in Bilayers Formed from Bromolipid Probes. *Biochemistry.* 1987. 26:1783-1788.
- ~ Merrill AH Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem.* 2002. 277(29):25843-6.
- ~ 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. 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. 283(26):17797-804.
- ~ Murakami K, Ide T, Nakazawa T, Okazaki T, Mochizuki T, Kadowaki T. Fattyacyl-CoA thioesters inhibit recruitment of steroid receptor co-activator 1 to alpha and gamma isoforms of peroxisome-proliferator-activated receptors by competing with agonists. *Biochem. J.* 2001. 353:231–8.
- ~ Murota K, Matsui N, Kawada T, Takahashi N, Fushuki T. Inhibitory effect of monoacylglycerol on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001. 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. 135(7):1626-30.
- ~ 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. 278(51):51664-72.
- ~ Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Davidson NO. Diet-induced alterations in intestinal and extrahepatic lipid metabolism in liver fatty acid binding protein knockout mice. *Mol Cell Biochem.* 2009. 326(1-2):79-86.
- ~ Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog Lipid Res.* 2009. 48(2):101-15.
- ~ 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. 177(43):56-8.
- ~ 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. 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. 273(2 Pt 1):G289-95.

- ~ Prows DR, Murphy EJ, Moncecchi D, Schroeder F. Intestinal fatty acid-binding protein expression stimulates fibroblast fatty acid esterification. *Chem Phys Lipids*. 1996. 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. 30(10):907-10.
- ~ 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. 269(39):23918-30.
- ~ Rolf B, Oudenampsen-Krüger E, Borchers T, Faergeman NJ, Knudsen J, Lezius A, Spener F. Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine livertype fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. 1259:245-53.
- ~ Roseman MA, Lentz BR, Sears B, Gibbs D, Thompson TE. *Chem. Phys. Lipids*. 1978. 21:205-22.
- ~ 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. 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. 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. 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. *Hepatol Res*. 2005. 33(4):306-312.
- ~ 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. 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. 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. 239(1-2):69-77.
- ~ Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 1994. 79(3):427-36.
- ~ Shaughnessy S.; Smith E. R.; Kodukula S.; Storch J.; and S.K. Fried. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2<sup>-/-</sup>) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte fatty acid binding protein. *Diabetes*. 2000. 49: 904-911.
- ~ 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. 27(5):549-57.
- ~ 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. 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. 12(6):266-73.
- ~ Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 2008. 28:73-95.
- ~ Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1486(1):28-44.
- ~ 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. 98(1-2):141-7.
- ~ Storch J, Thumser AE. Tissue-specific functions in the FABP (Fatty Acid-Binding Protein) family. *J Biol Chem.* 2010. 285(43):32679-83.
- ~ Storch J, Kleinfeld AM. Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry.* 1986. 25(7):1717-26.
- ~ 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. 75(3):1068-76.
- ~ 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. 192(1-2):9-16.
- ~ Thompson J, Winters N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem.* 1997. 272:7140-7150.
- ~ Thompson JA, Reese-Wagoner A, Banaszak L. Liver fatty acid binding protein: species variation and the accommodation of different ligands. *Biochim Biophys Acta* 1999. 1441:117-30.
- ~ Thumser AE, Storch J. Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J Lipid Res.* 2000. 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. 16(2-3):143-50
- ~ Thumser AE, Voysey JE, Wilton DC. The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J.* 1994. 301:801-6.
- ~ Toke O, Monsey JD, Cistola DP. Kinetic mechanism of ligand binding in human ileal bile acid binding protein as determined by stopped-flow fluorescence analysis. *Biochemistry.* 2007. 46:5427-36.
- ~ Tricerri 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. 1391(1):67-78.
- ~ Trotter PJ, Ho SY, Storch J. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res.* 1996. 37(2):336-46.
- ~ 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. 581(6):1243-7.
- ~ Vallim T, Salter AM. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. *Prostaglandins leukot essent fatty acids.* 2010. 82(4-6):221-8.
- ~ Van Rooijen BD, Van Leijenhorst-Groener KA, Claessens MM, Subramaniam V. Tryptophan Fluorescence Reveals Structural Features of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers. *J Mol Biol.* 2009. 394, 826-833.

- ~ 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. 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. 1081(1):1-24. Review.
- ~ Villarreal MA, Perduca M, Monaco HL, Montich GG. Binding and interactions of L-BABP to lipid membranes studied by molecular dynamic simulations. *Biochim Biophys Acta.* 2008. 1778:1390-1397.
- ~ Vogel Hertz A and Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. Trends. *Endocrinol. Metab.* 2000. 11:175-80.
- ~ 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. 41(17):5453-61.
- ~ Wilkinson TC, Wilton DC. Studies on fatty acid-binding proteins. The binding properties of rat liver fatty acid-binding protein. *Biochem J.* 1987. 247:485-8.
- ~ Wolfrum C, Borchers T, Sacchettini JC, Spener F. Binding of fatty acid and peroxisome proliferators to orthologous fatty acid binding proteins from human, murine, and bovine liver. *Biochemistry.* 2000. 39:14363.
- ~ Wootan MG, Bernlohr DA, Storch J. Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry.* 1993. 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. 269(14):10517-23.
- ~ 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. 40(7):1976-83.
- ~ 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. 3:6.