





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

**“Análisis de la Interacción Funcional  
entre las Dos Proteínas que Unen Lípidos  
Coexpresadas en Epitelio Intestinal”**

**Sofía Apodaca**

**Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos**

**La Plata**

**Marzo de 2018**

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata  
(INIBIOLP)*

*Facultad de Ciencias Médicas*

*Universidad Nacional de La Plata*

**“Análisis de la Interacción Funcional  
entre las Dos Proteínas que Unen Lípidos  
Coexpresadas en Epitelio Intestinal”**

**Sofía Apodaca**

**Director: Dr. Lisandro J. Falomir Lockhart**

# Sofía Apodaca

Análisis de la Interacción Funcional entre las Dos  
Proteínas que Unen Lípidos Coexpresadas en  
Epitelio Intestinal



Trabajo Final

Laboratorio de Procesos

Biotecnológicos

Facultad de Ciencias Exactas-UNLP

Director: Dr. Lisandro J. Falomir

Lockhart

# Índice:

---

1. Introducción	7
1.1 Digestión y absorción de lípidos en mamíferos.....	7
1.2 Proteínas que unen ácidos grasos (FABP).....	8
1.2.1 Estructura de las FABP .....	8
1.3 Rol de las FABP en el intestino delgado de mamíferos .....	10
1.3.1 Diferencias entre IFABP y LFABP .....	11
1.3.2 Funciones biológicas de IFABP y LFABP .....	11
1.3.3 Estudios funcionales de FABP <i>in vitro</i> .....	12
1.3.4 Estudios funcionales de FABP a nivel celular .....	13
1.3.5 Estudios funcionales de FABP <i>in vivo</i> .....	14
2. Hipótesis y Objetivos .....	15
2.1 Objetivo general de la línea de trabajo .....	15
2.2 Hipótesis de trabajo .....	15
2.3 Objetivos específicos .....	15
3. Materiales y métodos .....	17
3.1 Transformación de plásmidos recombinantes .....	17
3.2 Screening de Expresión .....	17
3.3 Expresión y purificación de las FABPs .....	17
3.3.1 Crecimiento e inducción de las Cepas de E. Coli .....	18
3.3.2 Lisis celular .....	19
3.3.3 <i>Salting out</i> .....	19
3.3.4 Cromatografía de exclusión molecular .....	19
3.3.5 Cromatografía de Intercambio iónico.....	21
3.3.6 Cromatografía de interacción hidrofóbica .....	21

3.3.7 Cálculo de la concentración de proteína purificada .....	22
3.4 Control estructural .....	22
3.4.1 Espectros de fluorescencia de las proteínas .....	22
3.4.2 Afinidad por ligandos hidrofóbicos .....	22
3.5 Ensayos de Interacción entre FABPs de intestino .....	24
3.5.1 Marcación fluorescente de proteínas FABPs y análisis por FRET .....	24
3.5.2 Transferencia de ligandos .....	26
3.5.3. Análisis de Cinéticas de Transferencia .....	27
4. Resultados y Discusión .....	31
4.1 <i>Screening</i> de expresión .....	31
4.2 Expresión y purificación de las FABP .....	32
4.2.1 Expresión recombinante de FABP .....	32
4.2.2 Purificación de FABP recombinantes .....	32
4.2.3 Cálculo de la concentración de proteínas purificadas .....	35
4.3 Control Estructural .....	36
4.3.1 Espectros de fluorescencia de las proteínas .....	37
4.3.2 Afinidad por ligandos hidrofóbicos .....	37
4.4 Ensayos de interacción entre FABPs .....	39
4.4.1 Marcación fluorescente de proteínas FABPs y análisis por FRET .....	39
4.4.2 Transferencia de ligandos entre FABPs e intestinos .....	42
5. Conclusiones .....	47
6. Referencias Bibliográficas .....	49



# 1.Introducción

---

## **1.1 Digestión y absorción de lípidos en el intestino de mamíferos:**

El tubo intestinal, en conjunto con el hígado y el páncreas, tienen la función de 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 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).

## 1.2. Proteínas que Unen Ácidos Grasos (FABP):

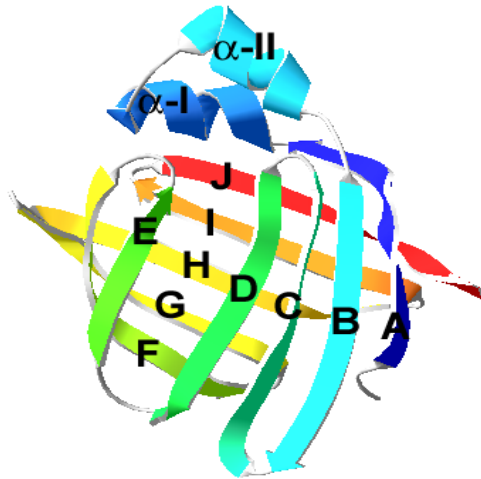
Las FABPs (siglas provenientes su nombre en inglés: *Fatty Acid-Binding Proteins*) son una familia de proteínas que posee una estructura tridimensional prácticamente superponible que recuerda a un barril con tapa y la capacidad de unir lípidos con alta afinidad. Las distintas isoformas presentan distinto nivel de expresión según el tejido que se analice. Son proteínas de relativamente bajo peso molecular, aproximadamente 15 kDa, que reconocen principalmente ácidos grasos de cadena larga, pero también algunas isoformas unen retinoides, derivados de ácidos grasos y otros lípidos con distinta afinidad. Dentro de esta familia se hallan por lo menos 10 isoformas que fueron nombradas a partir del tejido en que se hallaron por primera vez. Así, por ejemplo IFABP y LFABP corresponden a las FABPs identificadas en intestino (*-Intestine*) e hígado (*Liver*), respectivamente. Esta familia de proteínas se caracteriza por tener una estructura tridimensional muy conservada; incluso entre aquellos miembros que comparten apenas un 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos. Sin embargo, a partir de sus estructuras cristalográficas y de NMR se han podido identificar algunas diferencias en sus estructuras terciarias que serían, en principio, responsables de sus diferencias funcionales.

Se han descrito una variedad de funciones para esta familia de proteínas que la hace interesante para su estudio, como por ejemplo su participación en la regulación de la expresión de genes y de vías metabólicas, así como del accionar de drogas hipolipemiantes utilizadas para el tratamiento de enfermedades como la diabetes o la aterosclerosis. En este sentido, se ha descrito su capacidad de interactuar con otras proteínas, principalmente enzimas y factores de transcripción. Por otro lado, trabajos relativamente recientes han demostrado que las FABPs tienen un gran potencial como biomarcadores tempranos de injuria tisular para el diagnóstico y monitoreo de diversas patologías debido a su pronta liberación bajo condiciones de estrés, por ejemplo durante infartos de miocardio, en la enfermedad celíaca (Bottasso Arias et al., 2015) o en afecciones que llevan a disfunciones crónicas renales (Pelsers , Hermens , Glatz, 2005)

### 1.2.1. Estructura de las FABP

Los miembros de la familia FABP poseen una estructura tridimensional muy bien conservada: 10 cadenas  $\beta$  antiparalelas (nombradas desde  $\beta A$  hasta  $\beta J$  desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal) y dos  $\alpha$ -hélices cortas que se ubican entre  $\beta A$  y  $\beta B$  (denominadas  $\alpha$ -I y  $\alpha$ -II) (**Figura 1.1**). Las 10 cadenas se agrupan en dos hojas  $\beta$  de 5 cadenas cada una, las cuales se enfrentan con

una orientación casi perpendicular, formando un barril ligeramente elíptico y determinando una cavidad central que determina el sitio de unión de ligandos. La unión entre las cadenas  $\beta A$  y  $\beta B$  es el motivo hélice-giro-hélice; mientras que el resto de las cadenas presentan giros- $\beta$  entre sí. Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un único dominio con un radio de giro de 14 Å (Banaszak et al., 1994).

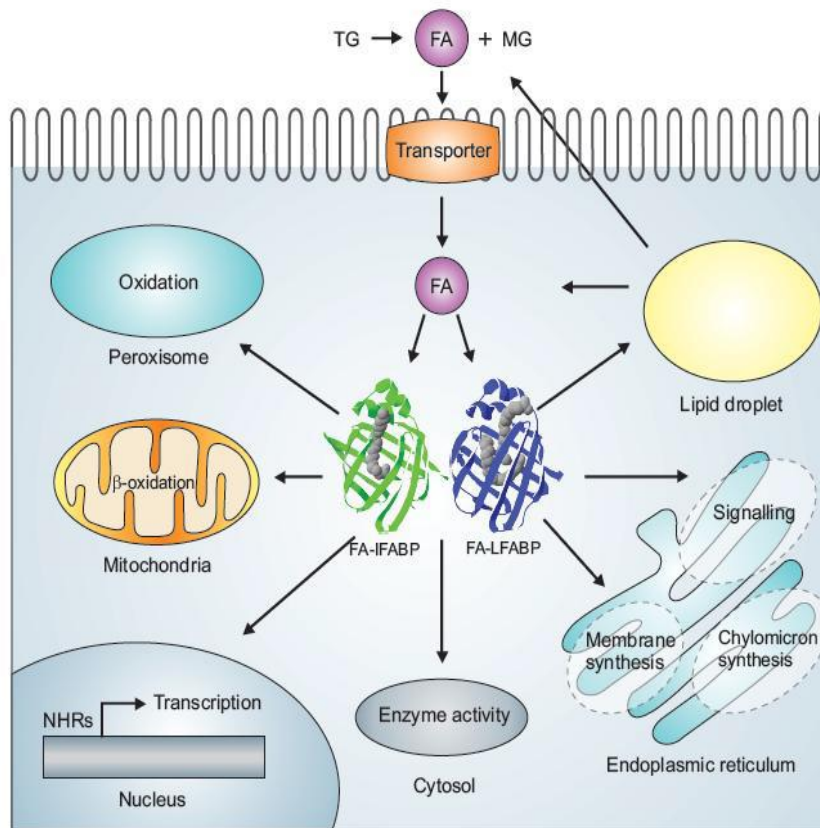


**Figura 1.1. Estructura común de las FABP.** Modelo tridimensional de IFABP de rata basado en datos de cristalografía de Rayos-X en su forma holo (código pdb:1ICN). Se indica la nomenclatura de los elementos de estructura secundaria.

La cavidad mencionada es muy inusual debido al gran número de residuos hidrofílicos que se hallan involucrados en distintas redes de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Existe un pequeño núcleo hidrofóbico desplazado del centro de la proteína que actúa como fondo del barril. Aunque las secuencias no se conservan, la naturaleza hidrofóbica de los residuos en esta área se mantiene. Aunque esta cavidad contiene varias moléculas de agua estructural que figuran en las estructuras cristalográficas, la misma es bastante inaccesible para el solvente (Banaszak et al., 1994; Kaieda & Halle, 2015). Al analizarse estructuras cristalográficas de FABPs se observa que presentan poros por los que se podrían intercambiar moléculas de agua, pero no serían lo suficientemente grandes como para permitir el paso de ácidos grasos. Por el contrario, las diferencias entre las estructuras apo- y holo- muestran que los cambios conformacionales se centran en los giros que conectan la hélice  $\alpha-II$  con  $\beta B$ ,  $\beta C$  con  $\beta D$  y  $\beta E$  con  $\beta F$ , en la superficie del barril- $\beta$ , lo que llevó a proponer la existencia de una región portal entre el motivo hélice-giro-hélice y los giros- $\beta$  mencionados, por donde ocurriría la entrada y salida de los ácidos grasos (cita). Estudios de dinámica molecular han comprobado teóricamente esta hipótesis, pero también han sugerido la coexistencia de un segundo portal en el surco presente entre las cadenas  $\beta D$  y  $\beta E$  (Mihajlovic & Lazaridis, 2007).

### 1.3. Rol de las FABP en el intestino delgado de mamíferos

El intestino delgado de mamíferos expresa tres proteínas de la familia de las FABP: IFABP, LFABP y IBABP (*Intestinal Bile Acid-Binding Protein*). Si bien la distribución de las mismas se superpone a lo largo del intestino delgado, cada una de ellas presenta su máxima expresión en regiones diferentes (Agellon et al., 2002; Storch et al., 2008). Gran parte de los enterocitos coexpresan, de manera abundante, LFABP e IFABP. Se cree que estas proteínas participan en la asimilación, el transporte y el procesamiento intracelular de las elevadas cantidades de ácidos grasos absorbidos por el intestino de la dieta. Pero, hasta la actualidad, se desconoce por qué un sólo tipo de célula contiene dos tipos distintos de FABP. La hipótesis es que estas proteínas cumplirían funciones distintas dentro del enterocito. En la **Figura 2.2** se muestra de manera esquemática el posible rol desempeñado por las FABP de enterocito durante la absorción de los lípidos de la dieta.



**Fig 1.2. Esquema del posible rol de las FABP en enterocitos.** Los ácidos grasos que provienen de la hidrólisis de triglicéridos dietarios se incorporan en los enterocitos por difusión simple o mediado por proteínas de membrana. Luego son oxidados en la mitocondria o incorporados en fosfolípidos y triglicéridos por distintas enzimas del metabolismo lipídico, previa activación a acil-CoA (ACA) por las Acil-CoA Sintetasa (ACS). Los niveles de ácidos grasos citoplasmáticos también pueden tener un efecto sobre la expresión de genes mediante la unión a factores de transcripción.

### 1.3.1. Diferencias entre IFABP y LFABP

El estudio de IFABP y LFABP ha evidenciado diferencias en su estructura, número de sitios de unión, afinidad y tipo de ligandos (**Tabla 1.1**). Estas diferencias apoyan la hipótesis de que IFABP y LFABP tienen funciones distintas en enterocitos.

Tabla 1.1: Diferencias entre IFABP y LFABP

Distribución tisular	LFABP se expresa en hígado, intestino delgado, riñón, pulmón y páncreas; IFABP se expresa en intestino delgado (Bass et al., 1988).
Diferencias estructurales	IFABP presenta una hélice anfipática en el segmento $\alpha$ I. 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. LFABP presenta una segunda hendidura en el barril- $\beta$ además de la existente entre $\beta$ D y $\beta$ E, característica única en su familia (Thompson et al., 1999).
Cavidad hidrofóbica	La cavidad de LFABP presenta un volumen aproximado de 610 Å <sup>3</sup> . La cavidad de IFABP presenta un volumen aproximado de 353 Å <sup>3</sup> . Esta diferencia puede ser la responsable de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que une cada FABP.
Especificidad por los distintos ligandos	LFABP puede ligar ácidos grasos con muy alta afinidad, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (Thompson et al., 1999). IFABP une solamente ácidos grasos. Considerando solamente los ácidos grasos: LFABP es capaz de unir dos ácidos grasos al mismo tiempo mientras que IFABP sólo puede unir un ácido graso.
Afinidad por los distintos ligandos	IFABP de rata mostró valores desde $K_d = 6$ 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 mostró valores desde $K_d = 9$ nM para el ácido esteárico hasta $K_d = 69$ nM para el ácido linolénico. El segundo sitio de unión de LFABP mostró afinidades equivalentes en el caso de los ácidos grasos saturados pero 10 veces más débiles que el primer sitio para los ácidos grasos insaturados (Richieri et al., 1994).

### 1.3.2 Funciones biológicas de IFABP y LFABP

A pesar de la abundante información sobre su estructura, distribución tisular y propiedades de unión de ligandos, 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 las FABP (Glatz et al., 1996; Vogel Hertz et al., 2000, Haunerland et al., 2004), algunas de las mismas se enumeran en la **Tabla 1.2**.

**Tabla 1.2: Funciones biológicas de IFABP y LFABP**

<b>Unión, selección, solubilización y compartimentalización de ácidos grasos de cadena larga a través del citoplasma.</b>
<b>Cofactores en reacciones que utilizan ácidos grasos de cadena larga como sustrato o agentes reguladores.</b>
<b>Modulación del proceso de mitosis, crecimiento celular y diferenciación celular.</b>
<b>Transporte direccionado de ácidos grasos hacia rutas metabólicas específicas.</b>
<b>Participación en mecanismos de transducción de señales, y en la regulación de la expresión génica mediada por ácidos grasos.</b>
<b>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.</b>
<b>Unión de grupos hemo, bilirrubina, prostaglandinas, hepatocarcinógenos, etc. (sólo LFABP).</b>

### 1.3.3. Estudios funcionales de FABP *in vitro*

Las proteínas recombinantes han sido ampliamente caracterizadas por técnicas biofísicas, además de haberse determinado la estructura de casi todos los miembros de la familia por cristalografía y/o NMR. Sus capacidades de transferencia de ligandos hacia membranas se ha reportado empleando ensayos de transferencias de energía por resonancia Förster (FRET, del inglés *Förster Resonance Energy Transfer*) entre antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA, de *Anthroyloxy-Fatty Acids*), análogos fluorescentes de los ligandos naturales, y membranas unilamelares pequeñas (SUV, de *Small Unilamellar Vesicles*), que contienen NBD-PC como aceptor FRET (Storch et al., 1990). Estos estudios han permitido clasificar a las FABP en dos subgrupos dentro de la familia: proteínas “difusionales” como la LFABP, LbFABP o CRABP II, que muestran un mecanismo de transferencia de ligandos cuyo paso limitante parece ser la disociación del ligando hacia el medio acuoso; y aquellas de tipo “colisional”, para las que el paso limitante sería la interacción del complejo proteína-ligando con la membrana aceptora (Storch et al., 2008). Esto sugiere que las proteínas “colisionales” podrían distinguir diferentes compartimentos subcelulares y dirigir el transporte de ácidos grasos preferencialmente a algunos de ellos, principalmente aquellos ricos en fosfolípidos aniónicos. Por otro lado, el mecanismo “difusional” podría ser un artefacto del sistema de estudio *in vitro* debido a la falta de otros componentes celulares que interaccionan específicamente con estas proteínas, como ser enzimas o factores nucleares relacionados al metabolismo de lípidos.

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. Además, mientras que LFABP parece ser insensible a la composición de las vesículasceptoras, IFABP aumenta su velocidad de transferencia cuando se enfrenta a vesículas con mayor densidad de carga negativa superficial, siendo los residuos de Lys de gran importancia para este efecto

(Córsico et al., 2005). De hecho, la responsabilidad del mecanismo de transferencia de ligandos se asignó específicamente a los motivos hélice-giro-hélice de cada proteína (Córsico et al., 1998; Córsico et al., 2004). En el caso de IFABP en particular, los residuos de Lys ubicados en esta región de la proteína resultaron ser críticos para determinar la velocidad de transferencia y la sensibilidad a la composición de las membranasceptoras (Falomir Lockhart, 2006). Estudios con mutante únicos de Trp permitieron evaluar la transferencia de ligandos naturales desde LFABP a membranas, ácidos grasos y acil-CoA, evidenciando coeficientes de velocidad de transferencia unas 200 veces mayores que para AOFA (De Gerónimo, 2010).

Finalmente, se evaluó también la interacción directa de las FABP de enterocito con membranas fosfolipídicas. El uso comparativo de fosfolípidos fotoactivables, ensayos de competencia con Citocromo c y ensayos de quenching de Trp por lípidos brominados permitieron demostrar que ambas proteínas son capaces de interactuar con membranas, pero LFABP lo hace preferencialmente en su forma apo-, mientras que IFABP cambia la región de interacción y la profundidad de inserción cuando se enfrenta a vesículas aniónicas (Falomir Lockhart et al., 2011; De Gerónimo, 2014).

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

#### **1.3.4. Estudios funcionales de FABP a nivel celular**

Se han realizado estudios empleando distintas líneas celulares de mamífero, en las que se ha modificado el nivel de expresión de IFABP o de LFABP. La sobreexpresión de LFABP en fibroblastos de ratón 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 (Rodríguez Sawicki et al., 2017). A su vez, se han detectado modificaciones en la distribución de oleico en distintas clases de lípidos en estas células modificadas, lo que podría ser responsable de su velocidad de crecimiento menor respecto a las células Caco-2 sin modificar.

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 triacilglicérols 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 ácidos grasos, 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 definitivos no observándose diferencias en la esterificación de lípidos, síntesis de lipoproteínas, y ensamblaje de lipoproteínas (Montoudis et al., 2006).

### 1.3.5 Estudios funcionales de FABP *in vivo*

La supresión de los genes que codifican para IFABP y LFABP ha dado lugar a la generación de ratones *knock-out* embriológicamente viables, es decir que, al menos durante el desarrollo embrionario, estas proteínas no son indispensable. La supresión del gen que codifica para LFABP en ratones (ratones LFABP<sup>-/-</sup>) (Newberry et al., 2009) no generó modificaciones fenotípicas sustanciales en animales respecto a las cepas salvajes, salvo en situaciones de estrés, como ayuno prolongado. Los niveles totales de los lípidos hepáticos, ácidos grasos no esterificados y triglicéridos se mantuvieron en sus valores normales. No obstante la capacidad de unión de ácidos grasos por parte del citosol de las células hepáticas se vio significativamente reducida. Se ha observado una reducción de la absorción de ácidos grasos del plasma sanguíneo y una clara reducción de los depósitos intracelulares de triglicéridos. 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 ácidos grasos mucho más bajas que para la cepa salvaje en idénticas condiciones (Erol et al., 2004; Atshaves et al., 2010).

En los casos en que se suprimió el gen de 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.

## 2. Hipótesis y Objetivos

---

### 2.1. Objetivo general de la línea de trabajo

Este trabajo se enmarca en el proyecto de investigación que se desarrolla en el laboratorio de la Dra. Córscico desde 1998 en el INIBIOLP, cuyo objetivo final es comprender y describir el proceso de asimilación de lípidos dietarios y el rol que cumplen las FABPs en dicho proceso, su posible participación en procesos patológicos y el uso de estos conocimientos para mejorar el diagnóstico y desarrollar nuevas estrategias de intervención terapéutica.

### 2.2. Hipótesis de trabajo

Se ha propuesto que ambas proteínas podrían funcionar en forma conjunta, como un sistema de censado y respuesta a la disponibilidad y el tipo de ácidos grasos, regulando así las funciones del enterocito en la asimilación de lípidos. En este contexto, las afinidades relativas de las FABPs por distinto tipo de ácidos grasos permitirían su direccionamiento diferencial hacia distintos destinos, incluyendo su degradación, reestirificación o la unión a factores de transcripción (PPARs). La interacción funcional entre ambas proteínas, la distribución y el intercambio de ligandos entre ambas FABPs, resulta entonces un paso crítico para comprobar la función coordinada de estas proteínas explicando también la necesidad de que varios tipos celulares expresen más de una isoforma de FABPs.

### 2.3 Objetivos específicos:

- 1) Expresar las FABPs intestinales recombinantes y purificarlas para su uso *in vitro*.
- 2) Puesta a punto y desarrollo de ensayos de interacción proteína-proteína basados en FRET entre las FABPs marcadas fluorescentemente.
- 3) Puesta a punto y desarrollo de ensayos de transferencia de ligandos entre las FABPs intestinales.





## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1 Transformación de plásmidos recombinantes:

Los plásmidos pET11a-rLFABP y pET11d-rIFABP que codifican para las FABP intestinales de rata recombinantes se transformaron en bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3). Esta cepa tiene incorporado en su genoma el gen de la T7-RNAPol bajo control del promotor inducible del operón *lac*. La transformación se realizó en bacterias competentes preparadas por un método químico empleando sales de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Rb}^{+}$ . Las colonias positivas (transformantes) se seleccionaron en medio LB-Agar con Ampicilina (Falomir-Lockhart, LJ *et al.*, 2006).

### 3.2 Screening de Expresión:

Para seleccionar las colonias que muestran la mayor expresión de las FABP recombinantes, se realizó un *screening* de expresión. En primer lugar, se inocularon 5 ml de medio líquido LB con Ampicilina (1000X, 100 mg/mL) con la colonia a estudiar y se incubaron *over night* (ON) a 37 °C. Luego se tomaron 0,5 ml del cultivo ON y se llevaron a 3 ml finales con medio LB con Ampicilina y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Una alícuota de 1 mL del cultivo se retiró, centrifugó y guardó a 4 °C antes de agregar IPTG hasta una concentración final de 400  $\mu\text{M}$ . La inducción se mantuvo por 2 hs a 37 °C y se retiró una nueva alícuota. Las muestras se resuspendieron en 20  $\mu\text{L}$  de Buffer de lisis TEK (10 Mm Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA; 30 mM KCl) y 180  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Las células se lisaron por calor (95 °C, 10 min) luego de mezclar 24  $\mu\text{L}$  de cada muestra con 6  $\mu\text{L}$  de Buffer Muestra 5X. Las muestras se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant Blue. Además, se corrió en cada gel un estándar de peso molecular como referencia para poder estimar el peso molecular de las distintas bandas presentes en las muestras.

#### 3.2.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

La electroforesis está basada en la migración que se produce al someter una partícula o molécula cargada eléctricamente a un campo eléctrico. Al colocar moléculas en una matriz porosa y someterlas a un campo eléctrico es posible analizar su migración en base a su peso, forma y carga eléctrica: diferentes especies de moléculas en la muestra alcanzarán distintas distancias en un mismo período de tiempo (West *et al.*, 2014).

Cabe destacar que las proteínas poseen carga si se encuentran en un medio cuyo pH es distinto a su punto isoeléctrico (pH específico al cual una proteína no presenta carga neta), por lo que se

utilizan buffers para fijar el pH en un valor determinado. En la electroforesis desnaturizante se agrega SDS, un detergente que desnaturaliza proteínas, de manera de que su forma tridimensional no influya en su velocidad de migración, y les otorga una carga negativa más uniforme, permitiendo así separar proteínas principalmente en base a su masa (2), aunque proteínas muy ácidas o muy básicas mostraran una desviación.

En este trabajo se emplearon geles discontinuos de poliacrilamida formados por una zona de apilamiento o *stacking* al 4 %, y una de resolución al 10 % y se corrieron en un equipo MiniProtean 3 (BioRad) o MiniProtean TetraCell (BioRad). Primero se preparó el gel de resolución: 3,96 ml Acrilamida-Bisacrilamida; 3,0 ml *Resolving* Buffer (pH 8,8); 4,75 mL H<sub>2</sub>O, 120 µL de APS; y 9,6 µL TEMED. Una vez gelificado, se preparó el gel de apilamiento: 0,78 mL Acrilamida-Bisacrilamida; 1,5 mL *Stacking* Buffer (pH 6,3); 3,66 mL H<sub>2</sub>O; 60 µL APS; y 6 µL TEMED. Ambas preparaciones se llevaron adelante en etapas. En primer lugar, se agregaron todos los compuestos exceptuando el APS y TEMED. Luego se desgasificó utilizando un Kitasato, para evitar que se generen burbujas al solidificarse el gel. Por último se agregó el APS y TEMED al momento de colocar las soluciones en el módulo de ensamblaje.

La corrida electroforética se realizó durante 20 minutos a una potencia de 140 V y a continuación durante 40 minutos a 240 V, utilizando el marcador de peso molecular de bajo rango (Cat# 17-0446-01, GE Healthcare). Luego de la electroforesis, se utilizó solución Colloidal Coomassie Blue previamente preparada para realizar la tinción bajo agitación suave en un agitador tipo *rocker* y se incubó por 16 hs a temperatura ambiente. Luego se decoloró con sucesivos lavados con agua destilada hasta obtener un patrón de bandas azules sobre un fondo transparente y se digitalizó la imagen en un escáner.

### **3.3 Expresión y purificación de las FABP:**

Para realizar los distintos experimentos de caracterización e interacción de LFABP e IFABP es necesario partir de una masa de proteína purificada suficiente. Existen distintos métodos para purificar proteínas basados en distintas características estructurales y fisicoquímicas de las mismas. En este trabajo se utilizó el protocolo que se usa de rutina en el grupo de la Dra. Córscico en el INIBIOLP desde 1999 y se describe brevemente a continuación.

#### **3.3.1. Crecimiento e inducción de las Cepas de *E. Coli***

Se inocularon 5 erlenmeyers de 1000 mL de capacidad, conteniendo 150 mL de medio de cultivo fresco suplementado con Ampicilina cada uno, con 15 ml de cultivo ON (del inglés *over night*, durante la noche). Se dejó crecer durante aproximadamente 2 h a 37°C con agitación a 220 rpm, midiendo la densidad óptica en forma regular. Al alcanzar una DO<sup>600</sup> entre 0,6 y 0,8, se indujo la expresión de la proteína recombinante por el agregado de 200 µL de IPTG, separando previamente 1 mL de cultivo para utilizar como control negativo de inducción. El cultivo inducido

se mantuvo durante 3 hs a 37 °C, luego se centrifugó durante 5 minutos a 6000 g y se descartó el sobrenadante. Los *pellet* de bacterias se pesan y pueden almacenarse a -70 °C si no se van a procesar inmediatamente.

### **3.3.2. Lisis celular:**

Entre 3 y 4 gr del *pellet* de bacterias se suspendieron en 12 mL de buffer de lisis TEK y se sonicaron durante 5 series, de 20 a 30 pulsos cada una, en un sonicador Branson funcionando a un 80 % de potencia y con un ciclo de trabajo del 70 %. Al final de este proceso, se verificó que la turbidez disminuyera y que la solución tuviera un color más oscuro. Se centrifugó a 25.000 g y a 4 °C durante 20 minutos para eliminar restos celulares y bacterias sin lisar. Se separó el sobrenadante y se tomaron muestras de 50 µL de sobrenadante y de *pellet* para verificar la ubicación de la proteína recombinante. Para ello, se resuspendió el *pellet* en 14 mL de buffer TEK y el excedente se reservó a -20 °C.

### **3.3.3. Salting out:**

Al sobrenadante de la centrifugación anterior (aproximadamente 15 mL) se agregó medio volumen (7,5 mL) de solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , con agitación constante, gota a gota. Luego de incubar la solución resultante durante 1,5 hs a 4 °C con agitación, la muestra se volvió a centrifugar con a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se separó el sobrenadante y se volvió a suspender el *pellet* en un volumen equivalente (22,5 mL) para tomar alícuotas de 50 µL de cada fracción para evaluar luego la eficiencia de cada paso el proceso de purificación.

### **3.3.4. Cromatografía de exclusión molecular:**

La cromatografía es una técnica que permite la separación de moléculas con propiedades diferentes presentes en una muestra compleja. El método está basado en la circulación de una fase móvil, que arrastra a la mezcla de compuestos a separar, a través de una fase estacionaria que muestra una afinidad relativa por ciertos componentes de la mezcla que se ven retrasados y eluyen a un tiempo o condición característicos.

La cromatografía de exclusión molecular (también llamada exclusión por tamaño) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con geles que se fabrican con este fin: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poli(acrilamida) (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos de un material hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.

Las moléculas quedan atrapadas y son retiradas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia dentro de los poros depende del tamaño efectivo (radio hidrodinámico) de las moléculas. Las que son más grandes que el diámetro de los poros, son excluidas y no son retenidas, eluyendo en primer lugar (frente de corrida). Aquellas cuyos diámetros son significativamente menores que los poros pueden penetrar a través de ellos, siendo retenidas por tiempos considerables y eluyendo en último lugar (como sales o los constituyentes del sistema buffer). Las moléculas cuyos tamaños se encuentran entre estos dos extremos son eluidas, generalmente, en orden decreciente de tamaño molecular (Lehninger *et al.*, 2005).

Antes de comenzar este paso es necesario preparar la columna y equilibrarla en el buffer de corrida. Se empleó una columna de 80 cm de largo y 4 cm de diámetro rellena con Sephadex G-50 (Pharmacia/GE Healthcare). Se hizo circular 1 L de buffer  $KClPO_4$  (4.365 g de  $K_2HPO_4$ , 3.402 g de  $KH_2PO_4$ , 55.9 g de KCl y 1 g de  $NaN_3$ , en un litro de agua destilada y pH ajustado con KOH hasta 7.4) por la columna a 1,5 mL/min utilizando una bomba peristáltica P1 (Pharmacia/GE Healthcare). Además se comprobó el buen funcionamiento de los émbolos, la compactación de la resina al flujo de trabajo y el funcionamiento del recolector de fracciones programable.

Para poder detectar la presencia de la proteína se agregaron 10  $\mu$ L de Ácido Palmítico marcado con  $^{14}C$  y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente antes de inyectar la muestra en la columna. Este ácido graso se une con alta afinidad a las FABPs y se mantiene unido durante toda la cromatografía. Luego se sembró en la columna Sephadex G-50 y se desarrolló con un flujo constante de 1,5 mL/min hasta que se colectaron unas 90 fracciones de 15 mL cada una. Para determinar en cuáles fracciones se halla la proteína, se tomaron 100  $\mu$ L de cada una y se mezclaron con 3 mL de líquido de centelleo en viales de plástico con tapa a rosca y se analizaron en un contador de centelleo. Además se midió la absorbancia a 280 nm, pudiendo construir así un cromatograma con las curvas de absorbancia y radioactividad.

Observando el cromatograma se determinó en qué fracciones se hallaba la proteína. Como la cromatografía de exclusión diluye las muestras entre 5 y 10 veces, dichas fracciones se juntaron y se concentraron hasta un volumen cercano a los 20 mL. Para esto se utilizó un concentrador Amico (Millipore) con una membrana de celulosa regenerada de corte 10 kDa (Millipore) y con agitación magnética, dentro de una heladera, para disminuir al mínimo el riesgo de degradación de las proteínas. Utilizando este tipo de membranas, el 50% de las proteínas de 10 kDa quedan retenidas y, como las FABP tienen un tamaño mayor, estas se retienen en el concentrado.

La solución obtenida fue analizada por SDS-PAGE para reafirmar la presencia de la proteína y evaluar su pureza, la que generalmente superaba el 95 % de las proteínas. Si no se continuaba con la purificación, el concentrado se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}C$ , para evitar que la muestra se contamine o degrade.

### 3.3.5. Cromatografía de intercambio iónico:

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies también ionizadas, pero con carga opuesta. La fase móvil es generalmente un buffer que estabiliza la solución a cierto pH. La cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La afinidad de cada proteína a los grupos cargados de la columna está influenciada por el pH y por la concentración de iones en solución (concentración salina), que compiten con la proteína por la interacción con la matriz. La separación de una proteína de la matriz cargada puede obtenerse gradualmente cambiando el pH y/o la concentración salina de la fase móvil, de tal forma que se genere un gradiente de concentración.

En este trabajo se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para separar la proteína a purificar de restos de ADN y ARN presentes en la muestra. Para esto se utilizó una columna DE-52, lavada con buffer  $\text{KClPO}_4$  sin sales, pH 7,4, a través de la cual se hizo circular la muestra. Como tanto IFABP como LFABP a pH 7,4 poseen carga neutra o ligeramente positiva, las mismas no son retenidas por la resina aniónica DE-52, pero si se retienen otros péptidos aniónicos y ácidos nucleicos. La Columna se regenera al finalizar la corrida lavándola con buffer  $\text{KClPO}_4$  con NaCl 2 M para que el ADN eluya. La muestra eluyente fue colectada en fracciones y, midiendo la absorbancia a varias longitudes de onda se confeccionó un cromatograma para identificar los tubos con proteína. Se realizó un SDS-PAGE con alícuotas de cada fracción para corroborar esta determinación y el resto de los tubos se descartaron.

### 3.3.6. Cromatografía de interacción hidrofóbica:

Las proteínas deben delipidizarse para eliminar la diversidad de ligandos que retienen de su expresión en bacterias y el ligando radioactivo utilizado para su monitoreo a lo largo de los pasos de purificación. Esto se logró utilizando una columna de interacción hidrofóbica Lipidex 2000 (C8-hidroxi-alcóxi-propil-dextran, SIGMA).

En primer lugar se regeneró la resina lavando sucesivamente con concentraciones crecientes de metanol en buffer fosfato (30, 50 y 100 %) y luego decrecientes (100, 50 y 30 %). Luego, la columna se rellenó, compactó y estabilizó acondicionándola por termostatación a 37 °C y realizando un lavado con  $\text{KClPO}_4$ . En este caso, no se utilizó una bomba, sino que el flujo fue el dado por la presión hidrostática, aproximadamente 1 mL/min, y los tubos se cambiaron manualmente cada 5 minutos.

Se sembró la muestra (aprox. 30 mL) y se eluyó con buffer  $\text{KClPO}_4$  manteniendo la termostatación a 37 °C y colectando fracciones de 5 min (aproximadamente 5 mL). Para determinar si la extracción de ácidos grasos se realizó correctamente, se reconstruyó el cromatograma de absorbancia y se eligieron tubos para medir radioactividad siguiendo el mismo

procedimiento utilizado anteriormente. En el caso en que el cromatograma obtenido mostró que la extracción de los ácidos grasos no fue suficiente, se incrementó la temperatura a 42 °C, ya que a esta temperatura no superara a la temperatura de desnaturalización de las proteínas, para facilitar la unión de los ligandos hidrofóbicos a la matriz.

Finalmente, se midió absorbancia y la radioactividad de la proteína pura, debiendo este último ser inferior al 1 % de la radioactividad original incorporada a la muestra antes de la cromatografía de exclusión molecular. La pureza se evaluó por SDS-PAGE.

### **3.3.7. Cálculo de la concentración de proteína purificada:**

Conociendo el coeficiente de extinción molar de las proteínas purificadas es posible estimar su concentración utilizando la Ley de Lambert-Beer:

$$A_{280} = \epsilon * b * c \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde  $A_{280}$  es la absorbancia de la muestra medida a la longitud de onda 280 nm,  $b$  es el camino óptico,  $\epsilon$  es la absortividad molar (6000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para LFABP y 16900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para IFABP) y  $c$  es la concentración que se quiere determinar. Los coeficientes de las FABP fueron obtenidos de bibliografía (Córsico et al., 2004).

## **3.4 Control estructural:**

### **3.4.1 Espectros de fluorescencia de las proteínas**

Prácticamente en cada grupo de biomoléculas existen subunidades con propiedades fluorescentes. En las proteínas, por ejemplo, los residuos de Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr) son los fluoróforos intrínsecos naturales y presentan espectros de fluorescencia en el Ultra Violeta. Los mismos pueden emplearse para estudiar las estructuras de las proteínas y el entorno inmediato que rodea estos residuos. Los residuos de Trp resultan más convenientes que los de Tyr, ya que poseen un rendimiento cuántico superior y a que su espectro de emisión responde a la polaridad de su entorno.

Teniendo en cuenta la presencia de Trp y Tyr en IFABP y de Tyr en LFABP, se midió la intensidad de la fluorescencia resultante de la excitación de cada muestra a las longitudes de onda de 275 y 295 nm, para longitudes de onda de emisión de entre 285 y 450 nm (Córsico et al., 2013).

### **3.4.2. Afinidad por ligandos hidrofóbicos**

Cuando una proteína y un ligando están en contacto, se establece un equilibrio que puede expresarse como:



Así, es posible definir la constante de disociación de una proteína ( $K_d$ ) para describir el equilibrio de la liberación de un ligando. Siendo  $[P_l]$ ,  $[L_l]$  y  $[L_u]$  las concentraciones de la proteína libre, el ligando libre y el ligando unido respectivamente, y considerando que la proteína tiene un único sitio de unión del ligando,  $K_d$  está definida como (Lehninger *et al.*, 2005):

$$K_d = \frac{[P_l][L_l]}{[L_u]} \quad \text{Ec.3.3}$$

Sin embargo, LFABP posee dos sitios de unión de ácidos grasos. Por el contrario, cuando se emplean análogos fluorescentes como AOFA o DAUDA, tanto IFABP como LFABP presentan un único sitio de unión. Para las FABPs se ha demostrado previamente que el sitio de unión de ácidos grasos de cadena larga está ubicado en el interior del barril- $\beta$ , por lo que la estimación del  $K_d$  y su comparación con los valores tabulados sirven como una medida del correcto plegamiento de la proteína.

De este modo, se realizaron titulaciones del análogo fluorescente de ácidos grasos DAUDA, a partir de las cuales se determinó la constante de disociación de cada FABP por este ligando. El espectro de emisión de fluorescencia de los ligandos se registró en función de la concentración de proteína para longitud de onda de excitación de 350nm, que corresponde al máximo de fluorescencia del DAUDA, y longitudes de onda de emisión entre 355 y 675 nm. Para cada proteína el ensayo se realizó por duplicado.

Los resultados obtenidos fueron analizados por dos métodos distintos para estimar el valor de  $K_d$ :

Ajuste a un modelo de unión de sitio único expresado por la siguiente ecuación:

$$F_{int} = \frac{(Y_u - Y_l)}{2} \left[ (K_d + [L_t] + [P_t]) - \sqrt{(K_d + [L_t] + [P_t])^2 - 4[P_t][L_t]} \right] + Y_l[L_t] \quad \text{Ec. 3.4}$$

donde:

$F_{int}$  es la fluorescencia integrada, es decir, la suma de la fluorescencia calculada como la integral de la curva  $F$  v  $s\lambda$  para cada concentración.

$Y_u$  es la fluorescencia específica que genera el ligando unido

$Y_l$  es la fluorescencia específica que genera el ligando libre

$[L_t]$  es la concentración de ligando total

$[P_t]$  es la concentración de proteína total



Este modelo se deduce a partir de las ecuaciones **3.2**, la conservación de la masa para la proteína y el ligando, y la suposición de que la señal observada de fluorescencia posee sólo dos contribuciones (**3.4**), la del ligando libre y la del ligando unido a la FABP, debido al cambio en su rendimiento cuántico de fluorescencia por el cambio de entorno entre el solvente polar y el sitio de unión más hidrofóbico propio de la proteína:

$$F_{int} = Y_u[L_u] + Y_l[L_l] \quad \text{Ec. 3.5}$$

Análisis mediante transformación de Scatchard:

La expresión dada para el  $K_d$  puede reescribirse de la siguiente manera:

$$\frac{[P_u]}{[P_l]} = \frac{1}{K_d} (B_{m\acute{a}x} - [P_u]) \quad \text{Ec. 3.6}$$

donde:

$[P_u]$  es la concentración de proteína unida al ligando

$B_{m\acute{a}x}$  el número total de sitios de unión

De esta forma, es posible obtener el  $K_d$  graficando  $\frac{[P_u]}{[P_l]}$  en función de  $[P_u]$ . Para ello, se transforman los datos de fluorescencia en fracción de proteína unida, suponiendo que la titulación alcanza la saturación del sistema. Luego se realiza un ajuste lineal de los puntos en el gráfico, la pendiente será la inversa de  $K_d(1)$ .

## 3.5 Ensayos de Interacción entre FABP de intestino

### 3.5.1. Marcación fluorescente de proteínas FABP y análisis por FRET:

Para analizar la interacción entre las FABP que se coexpresan en intestino se decidió recurrir a la técnica de transferencia de energía por resonancia tipo Förster (FRET), que es un mecanismo de desexcitación no radiativo entre dos fluoróforos. Este fenómeno se produce a causa de un acoplamiento de los momentos dipolares de las transiciones de desactivación del estado excitado del dador y de la excitación de una molécula aceptora que se encuentra originalmente en su estado fundamental. Este fenómeno es fuertemente dependiente de la distancia entre los fluoróforos, por lo que se emplea como una regla para medir la interacción entre moléculas. Sin embargo, este tipo de interacción no requiere necesariamente el contacto entre los fluoróforos, pero sí se restringe a una distancia entre ambos aproximadamente entre 1 a 10 Å. Además, el efecto FRET depende de la alineación de los momentos dipolares de las transiciones entre estados fundamentales y excitados, por lo que la orientación es otro factor importante que condiciona la eficiencia de este proceso. Finalmente, si bien no ocurre por un mecanismo de emisión/absorción,

también es determinante la superposición parcial del espectro de emisión del dador y de excitación del receptor, lo que evidencia la conservación de energía durante el proceso de FRET. Así, esta transferencia de energía puede evidenciarse como una disminución de la fluorescencia en el espectro de emisión del dador, como un aumento en la intensidad de la fluorescencia en el espectro del aceptor, como una disminución en el tiempo de vida del dador, un aumento de la anisotropía del dador o una disminución de la misma en el aceptor, excitando siempre específicamente al dador (Córsico *et al.*, 2013).

Cada FABP intestinal se marcó en residuos de Lys con fluorescentes de distinto color activados con NHS-éster. Las sondas fluorescentes se eligieron de forma tal que puedan funcionar como un par FRET, en este trabajo se utilizaron Atto488, para IFABP y Atto565, para LFABP (ATTO-TEC, Alemania) (Shvadchak *et al.*, 2011). Para realizar la marcación se siguió el procedimiento recomendado por ATTO-TEC. Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: buffer PBS (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*, pH 7.4). En un litro de agua destilada se disolvieron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  y 0.24 g de  $KH_2PO_4$ .

Solución B: 50 ml de una solución 0.2 M de bicarbonato de sodio se ajustó a pH = 9 agregando gota a gota NaOH.

Solución C: a 20 partes de la solución A se le agregó una parte de la solución B, obteniendo un buffer de pH=8.3.

Solución D: se dispuso de una disolución previamente preparada del colorante en DMSO anhídrido y libre de aminas y se midió su concentración.

A continuación, se cambió el buffer de cada proteína por la solución C empleando columnas de desalado PD10 rellenas con Sephadex G-25 (GE-Healthcare). Se estimó la concentración de cada proteína y se calculó el número de moles de cada fluoróforo activado que debe agregarse a cada una de modo que superare al de proteína en una relación 1,25 a 1. Así, a 500  $\mu$ L de IFABP Y LFABP se le agregaron 44  $\mu$ L del colorante respectivo. Este paso se realizó agregando gradualmente el colorante, agitando y protegiendo de la luz. La reacción de marcación se incubó durante 1 h, en agitación y protegiendo de la luz, a temperatura ambiente. Al finalizar, las muestras se volvieron a pasar a través de las columnas PD10 con Sephadex G-25 preequilibradas con buffer PBS para separar la proteína marcada del fluoróforo libre.

Se determinó el grado de marcación, DOL (del inglés *Degree Of Labeling*) utilizando la siguiente ecuación:

$$DOL = \frac{A_{m\acute{a}x}/\epsilon_{m\acute{a}x}}{A_{prot}/\epsilon_{prot}} = \frac{A_{m\acute{a}x} \cdot \epsilon_{prot}}{(A_{280} - A_{m\acute{a}x} \cdot CF_{280}) \cdot \epsilon_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ec. 3.7}$$

donde  $A_{m\acute{a}x}$  es la absorbancia a la longitud de onda máxima del fluoróforo,  $\epsilon_{m\acute{a}x}$  el coeficiente de extinción molar del fluoróforo en el máximo de absorción,  $A_{prot}$  es la absorbancia de la proteína,  $\epsilon_{prot}$  es el coeficiente de extinción molar de la proteína,  $A_{280}$  es la absorbancia medida a la

longitud de onda de 280 nm (proteína más fluoróforo) y  $CF_{280}$  es el factor de corrección (del inglés *correction factor*) de la absorbancia del fluoróforo entre su máximo y 280 nm.

Se midió la intensidad de la fluorescencia para longitudes de onda de entre 490 y 700 nm, excitando a 488 nm empleando una cuveta de fluorescencia con 0,3 cm de camino óptico de excitación y 1 cm de camino óptico de emisión (capacidad 150  $\mu$ L). Las medidas se realizaron en un espectrofluorómetro Fluorolog 3 (HORIBA/Jobin-Yvon) y se repitieron para dos concentraciones distintas de proteínas marcadas según el siguiente esquema:

a) IFABP-Atto488 10  $\mu$ M

LFABP-Atto565 10  $\mu$ M

LFABP-Atto565 10  $\mu$ M + IFABP-Atto488 10  $\mu$ M

b) IFABP-Atto488 20  $\mu$ M

LFABP-Atto565 20  $\mu$ M

LFABP-Atto565 20  $\mu$ M + IFABP-Atto488 20  $\mu$ M

Los espectros obtenidos se corrigieron por excitación directa del aceptor y por filtro interno primario según la **Ecuación 3.8**, y luego se normalizaron. Se evaluó en estas condiciones el aumento en la señal específica del aceptor excitando a 488 nm.

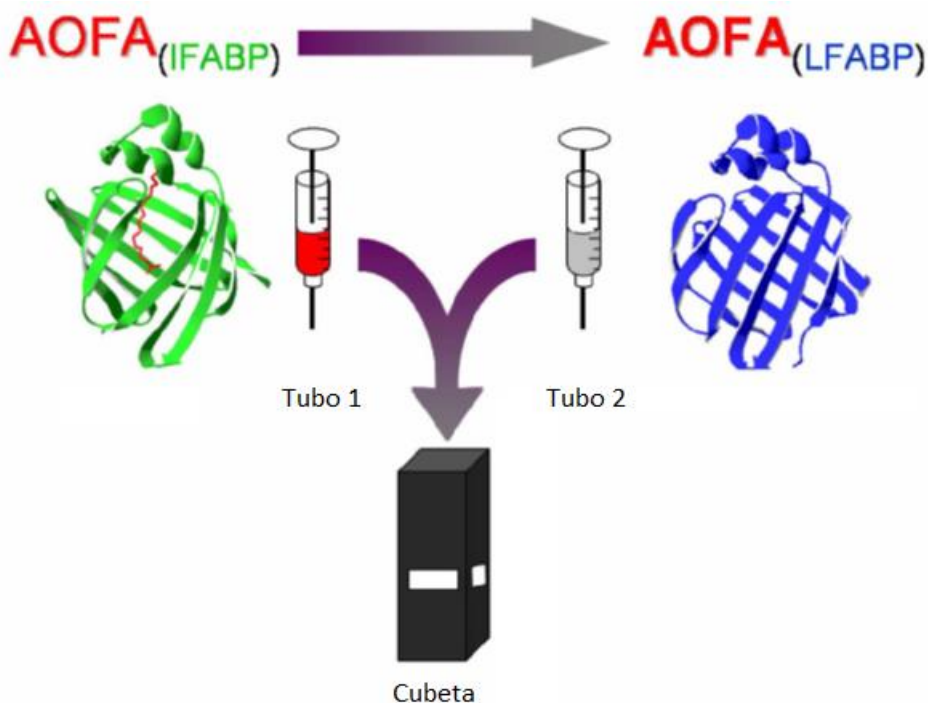
$$\frac{F}{F_0} = 10^{\varepsilon * c * b / 2} \quad \text{Ec. 3.8}$$

donde F es la Fluorescencia medida,  $F_0$  es la Fluorescencia real,  $\varepsilon$  la absorptividad molar correspondiente a la longitud de onda de máxima absorción, c es la concentración de la FABP marcada y b el camino óptico.

### 3.5.2 Transferencia de ligandos entre FABP:

A fin de estudiar la interacción funcional entre las FABP que se coexpresan en intestino, se decidió analizar la transferencia de ligandos entre las dos proteínas. Para ello nos valimos de la diferencia de rendimiento cuántico de fluorescencia que exhibe el análogo de ácido graso fluorescente 12AO (12-antróiloxi-oleico) cuando está unido a IFABP o a LFABP. Así, IFABP que presenta menor afinidad por este ligando se cargó previamente con 12AO, y luego se mezcló con una suspensión de LFABP empleando un módulo de cinética rápida de flujo detenido o *stopped-flow* modelo RX-2000 (Applied Photophysics) adosado al espectrofluorómetro Fluorolog 3 (HORIBA/Jobin-Yvon). Así se analizó la evolución temporal (cinética) de la señal de fluorescencia del 12AO. Las mediciones cinéticas se hicieron en el orden de los 30 segundos con una resolución del orden de los milisegundos (Córscico *et al.*, 2013).

Análogamente a los estudios de transferencia de ligando hacia membranas fosfolipídicas modelo, los ensayos se diseñaron preparando dos soluciones de partida, una conteniendo 15  $\mu\text{M}$  IFABP y 0,5  $\mu\text{M}$  12AO (tubo 1), concentraciones a las que se puede asumir que todo el ligando se encuentra unido a la proteína; y la otra conteniendo LFABP a distintas concentraciones (15, 30 y 45  $\mu\text{M}$ ) (tubo2). La temperatura de trabajo fue de 37  $^{\circ}\text{C}$ , y se realizaron mediciones de 30 segundos luego de la inyección.



**Figura 3.1:** La figura representa el esquema del ensayo de transferencia de ligando, inicialmente unido a IFABP (Tubo 1), cuando se inyecta en la misma cubeta LFABP (Tubo 2).

### 3.5.3. Análisis de Cinéticas de Transferencia

Como se mencionó en el párrafo anterior, se espera que en la solución contenida en el Tubo 1, todo el 12AO se encuentre unido a IFABP y que al inyectarse LFABP, que posee mayor afinidad por el ligando y que además genera un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia del ligando (Falomir-Lockhart *et al.*, 2006), se observe un incremento de la fluorescencia a medida que transcurre el tiempo, pudiéndose obtener parámetros cinéticos del proceso a partir de su análisis.

Los resultados se analizaron empleando 3 modelos distintos de complejidad creciente que consideran la distribución del ligando fluorescente entre dos o tres estados distintos, cada uno caracterizado por un rendimiento cuántico de fluorescencia específico. Cada modelo fue ajustado a los datos experimentales utilizando el *software* Sigma Plot:

Ajuste 1, exponencial simple de tres parámetros:

$$f = Y_0 + a * (1 - e^{(-b*x)}) \quad \text{Ec. 3.9}$$

Ajuste 2, doble exponencial de 5 parámetros:

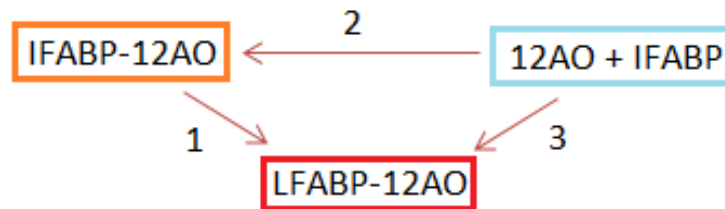
$$f = Y_0 + a * (1 - e^{(-b*x)}) + c * (1 - e^{(-d*x)}) \quad \text{Ec. 3.10}$$

Ajuste 3, triple exponencial de 7 parámetros:

$$f = Y_0 + a * (1 - e^{(-b*x)}) + c * (1 - e^{(-d*x)}) + e * (1 - e^{(-g*x)}) \quad \text{Ec. 3.11}$$

donde  $Y_0$  es la fluorescencia inicial,  $x$  el tiempo y  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$  y  $g$  parámetros a determinar por el ajuste.

Los parámetros  $a$ ,  $c$  y  $d$  en estos ajustes representan coeficientes de proporcionalidad entre la fluorescencia medida y el término exponencial. Por otro lado  $b$ ,  $d$  y  $g$  aparecen como exponentes multiplicando al tiempo, por lo que representan coeficientes de velocidad que describen procesos que ocurren en la mezcla. Así, cada término exponencial en los ajustes representa un proceso que puede modelarse según un esquema en donde existen tres situaciones para el ligando: en unión con IFABP, libre en la solución de buffer o en unión con LFABP (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2: Esquema de la partición de 12AO.** El recuadro naranja representa la situación inicial, en la que el 12AO se halla unido a IFABP. El recuadro celeste representa a IFABP y 12AO libres en la solución de buffer y el recuadro rojo representa al 12AO unido a LFABP. Las flechas 1, 2 y 3 representan los coeficientes de velocidad para cada uno de los procesos.

Según este esquema, el ajuste 1 contempla la existencia de un único proceso, el de la flecha 1, por el cual el 12AO pasa de estar unido a IFABP a unirse a LFABP, ya que las condiciones del ensayo se definieron como para que este proceso sea el más relevante. Los ajustes 2 y 3, por otro lado, contemplan una contribución relevante del ligando libre, que sería transferido a LFABP directamente (Ajuste 2, sólo dos procesos, los de las flechas 1 y 3) y a IFABP vacía (Ajuste 3). El proceso representado por la flecha 3 describe un proceso presumiblemente más rápido que el de

la flecha 1, dado por el paso de 12AO libre a su unión con LFABP sería más fácil ya que no requiere la disociación del 12AO de la IFABP. Por último, el Ajuste 3, posee tres términos exponenciales, es decir que contempla la coexistencia de los tres procesos, descritos en el esquema por las flechas 1, 2 y 3.

---

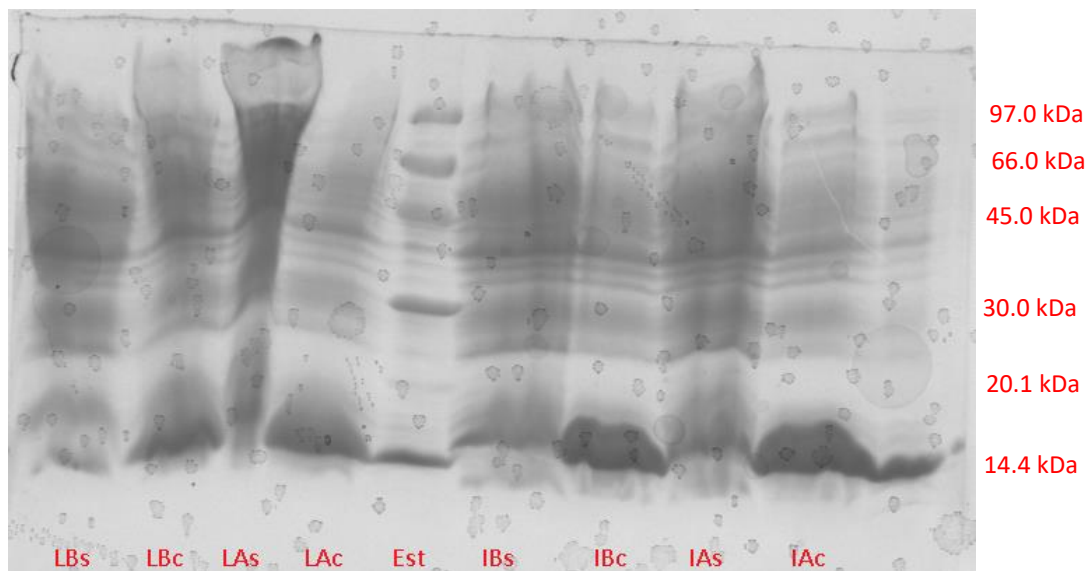


## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Screening de Expresión:

Utilizando plásmidos disponibles en el grupo se transformaron bacterias E.coli BL21 DE3 obteniéndose varias colonias en placas con distinta dilución, a partir de las cuales se realizó el *screening* de expresión.

Para seleccionar las colonias que muestran la mayor expresión de las FABP recombinantes, se realizó un *screening* de expresión y luego las muestras se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant Blue. Además, se corrió en cada gel un estándar de peso molecular como referencia para poder estimar el peso molecular de las distintas bandas presentes en las muestras (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1: SDS-PAGE Screening de Expresión.** LBs: cultivo ON LFABP B sin IPTG, LBc: cultivo ON LFABP con IPTG, LAs: cultivo ON LFABP A sin IPTG, LAc: cultivo ON LFABP A con IPTG, Est: estándar de pesos moleculares (los tamaños de cada banda se muestran en rojo a la derecha), IBs: cultivo IFABP B sin IPTG, IBc: cultivo IFABP B con IPTG, IAs: cultivo ON IFABP A sin IPTG, IAc: cultivo ON IFABP A con IPTG.

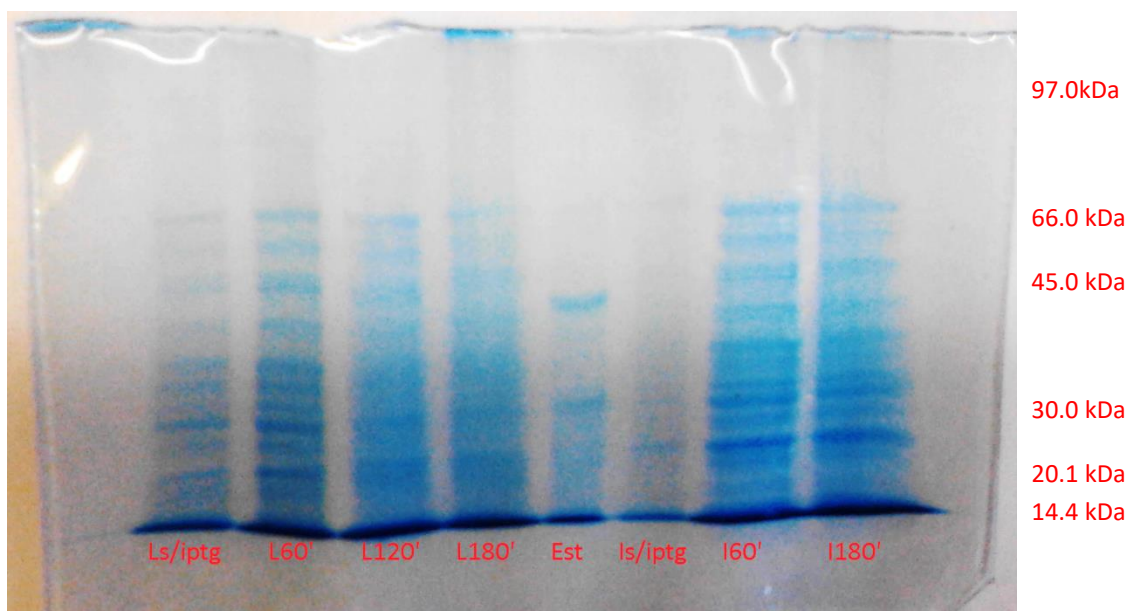
Observando las bandas correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 15 kDa, se observó un aumento significativo de una banda compatible con las FABP de intestino en presencia de IPTG respecto a su ausencia. Esto correspondería a la expresión de IFABP o LFABP recombinantes en las colonias evaluadas.



## 4.2. Expresión y purificación de las FABP:

### 4.2.1. Expresión recombinante de FABP

Como se describió en la sección “Materiales y Métodos”, se crecieron las colonias de *E. coli* que contenían el plásmido codificante para las FABP en medio LB suplementado con Ampicilina, para luego agregar IPTG como inductor de la expresión. Con el objetivo de hacer un seguimiento de la inducción, se tomaron muestras a distintos tiempos y se resolvieron mediante SDS-PAGE (figura 4.2).



**Figura 4.2: Expresión de FABP.** Ls/iptg: LFABP sin IPTG, control negativo; L60': LFABP luego de 60' de inducción con IPTG; L120': LFABP luego de 120' de inducción con IPTG; L180': LFABP luego de 180' de inducción con IPTG; Est: Marcador de peso molecular; Is/iptg: IFABP sin IPTG, control negativo; I60': IFABP luego de 60' de inducción con IPTG; I120': IFABP luego de 120' de inducción con IPTG; I180': IFABP luego de 180' de inducción con IPTG

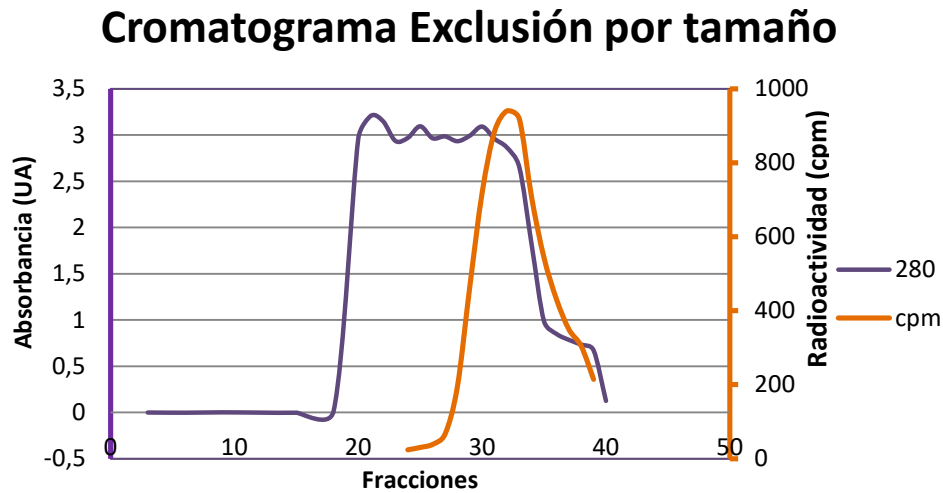
Como resultado del crecimiento y la inducción, se obtuvieron 3.75 g de pellet de células que expresaron LFABP y 3.59 g de pellet de células que expresaron IFABP. Los mismos se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta analizar las muestras obtenidas del procedimiento. En el gel de la Figura 3.2 se observa el aumento de la expresión de las FABP a partir del agregado de IPTG, por lo que se procedió a la purificación de cada FABP.

### 4.2.2. Purificación de FABP recombinantes:

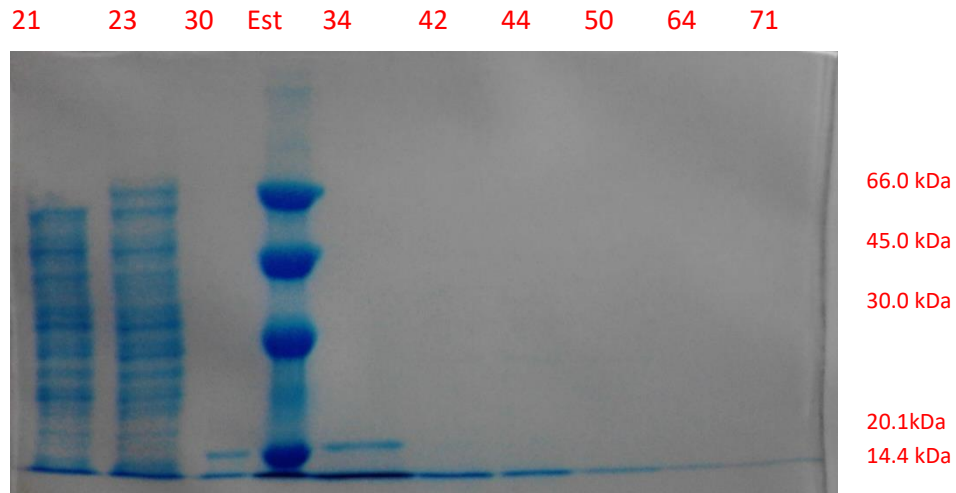
El pellet de bacterias se resuspendió en buffer de lisis TEK y lisaron las células por sonicado, liberándose el contenido citoplasmático. Luego de una centrifugación para eliminar los restos de

membrana y células sin lisar, se procedió a un fraccionamiento de la muestra por salting-out, luego del cual las FABP se recuperaron en la fracción soluble. Los componentes de este último sobrenadante se separó por tamaños mediante una cromatografía de exclusión molecular, luego de haber incluido  $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato como trazador de la presencia de las FABP. Esto permitió aislar a las FABP prácticamente puras de la mezcla de proteínas recombinantes que eluyeron primero por ser de mayor tamaño.

**A**

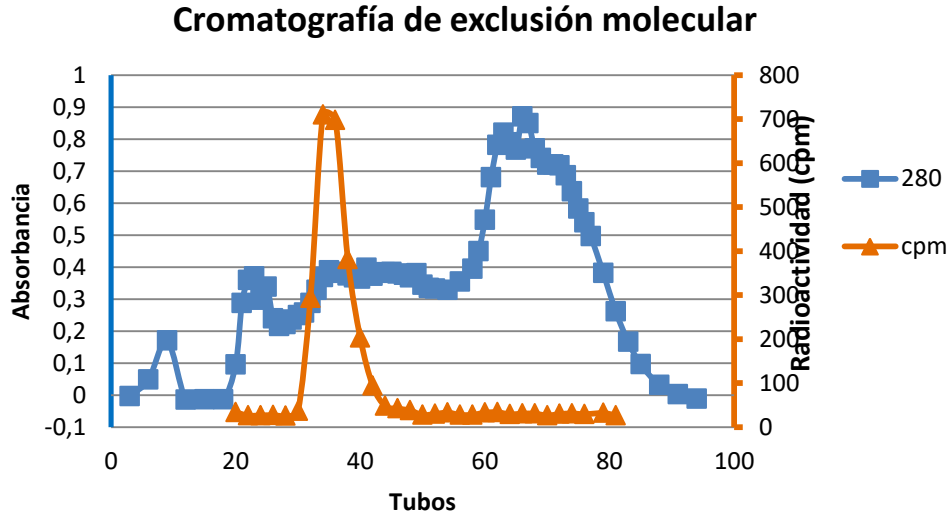


**B**



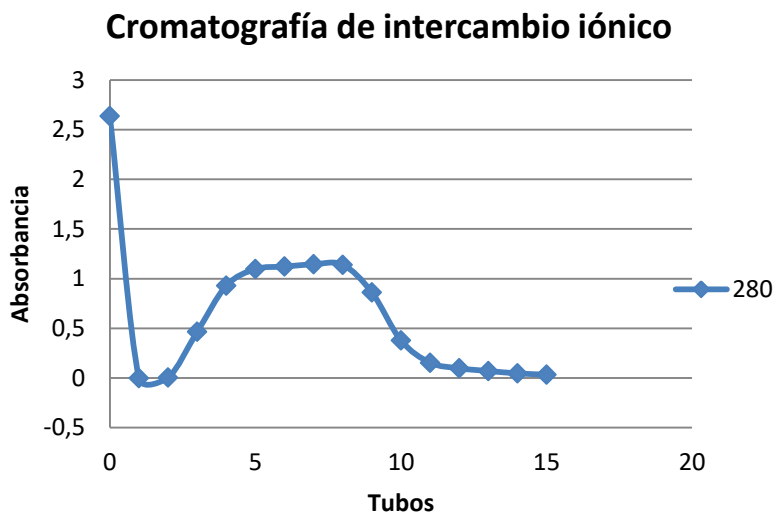
**Figura 4.3: Purificación de LFABP: A)** Cromatograma del paso de exclusión molecular. El perfil de elución se monitoreó por la  $A_{280}$  (violeta) y por radioactividad medida en centelleos por minuto, cpm (naranja). **B)** SDS-PAGE de fracciones seleccionadas de la cromatografía de exclusión molecular. La numeración de las calles corresponde al número de fracción. Est: marcador de peso molecular.

Para el caso de la LFABP, la **Figura 4.3 A** muestra el cromatograma que describe la exclusión molecular en base a medidas de DO y radioactividad, a partir del cual se determinó que la proteína se hallaba entre los tubos 27 y 39. Se tomaron los tubos mencionados, se reunieron y se analizó la muestra por SDS-PAGE. Como no se logró el grado de pureza deseado, la muestra se concentró para volver a realizar la separación por tamaño. Luego de la segunda cromatografía de exclusión molecular, el cromatograma arrojó que la proteína se encontraba entre los tubos 30 y 44, por lo que los demás tubos fueron descartados (**Figura 4.3 B**).



**Figura 4.4: Cromatografía de exclusión molecular.** Cromatograma del paso de exclusión molecular. El perfil de elución se monitoreó por la  $A_{280}$  (violeta) y por radioactividad medida en centelleos por minuto, cpm (naranja).

Si bien las muestras parecen estar puras según los geles de SDS-PAGE, las muestras aún mantenían cierto grado de contaminación por ácidos nucleicos que resultantes de la fragmentación del ADN genómico que no son teñidos por el Coomassie Blue. Esto genera problemas para la cuantificación de la proteína recombinante, ya que los espectros están fuertemente influenciados por los restos de ácidos nucleicos. Para eliminar esta contaminación se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico con la resina DE-52, que retiene tanto ácidos nucleicos como algún contaminante de péptidos aniónicos que pudiera mantenerse. Las FABP de intestino, como son ligeramente básicas, no tienen carga neta o la misma es ligeramente positiva al pH de trabajo y, por lo tanto, eluyen con el frente de corrida. -Los resultados de la cromatografía de intercambio aniónico se observaron en un cromatograma, graficando la absorbancia para cada fracción a 280 nm. El análisis mostró que la proteína se hallaba entre los tubos 4 y 11, de modo que el resto de los tubos se descartó (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5 Cromatografía de intercambio iónico.** Perfil de la Absorbancia medida a 280 nm para tubos seleccionados.

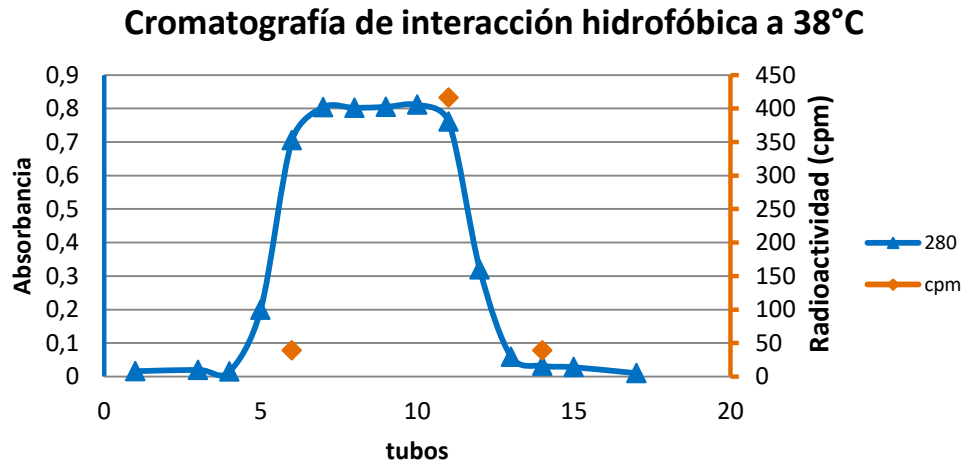
El paso final de la purificación consistió en la eliminación de los distintos ligandos que arrastran las FABP por su expresión recombinante en bacterias y el agregado de palmitato radioactivo. Al utilizar la columna de interacción hidrofóbica (Lipidex 2000) se busca extraerle a la proteína sus ligandos, y el ácido graso marcado radiactivamente sirve como trazador para evaluar este proceso. En este caso también se realizó un cromatograma con medidas absorbancia y de centelleo para varias muestras o fracciones (muestra previa al pasaje por la columna, Tubo 5, Tubo 10, Tubo 12, Tubo 17 y control negativo sin muestra) (**Figura 4.6, A**).

Este ensayo fue realizado a 38°C, pero al analizar el cromatograma y comparando con la medida tomada para la muestra pre-Lipidex, se notó que sólo se habían extraído aproximadamente dos terceras partes del lípido marcado. Por lo tanto, la columna Lipidex fue regenerada como se indica en la sección de Materiales y Métodos, y este paso se repitió aumentando la temperatura a 42°C. En estas nuevas condiciones la eficiencia se consideró aceptable, ya que se observó que la radioactividad remanente fue de aproximadamente el 9 % (**Figura 4.6, B**).

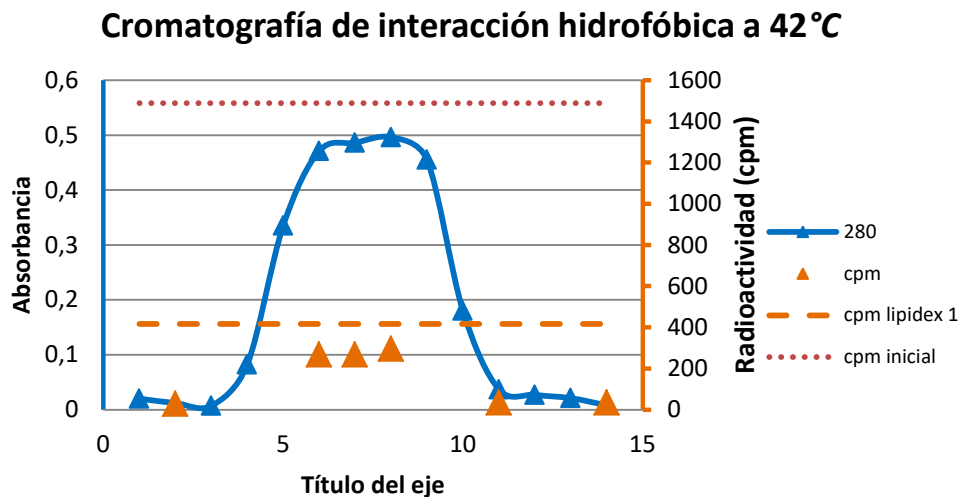
#### 4.2.3. Cálculo de la concentración de proteínas purificadas:

Conociendo el coeficiente de extinción molar de las proteínas puras, se calculó la concentración de las proteínas por absorbancia utilizando la Ley de Lambert-Beer. De este modo se obtuvo una concentración de 1.44 mg/mL para LFABP y de 0.84 mg/mL para IFABP. Esto significa que el rendimiento de la purificación fue de 5.76 mg/gr de peso húmedo de bacterias para LFABP y 3.51 mg/gr de peso húmedo de bacterias para IFABP.

A



B



**Figura 4.6: Cromatografía de interacción hidrofóbica. A)** Cromatograma del paso de interacción hidrofóbica a 38°C. Perfil de la absorbancia medida a 280nm (azul) y la radioactividad, cpm, para tubos seleccionados (naranja). **B)** Cromatograma del paso de interacción hidrofóbica a 42°C. Perfil de la Absorbancia medida a 280nm (azul) y la radioactividad medida, cpm, para tubos seleccionados (triángulos naranjas) comparando con la radioactividad inicial (rojo) y la reactividad luego de la primer cromatografía de interacción hidrofóbica (línea discontinua naranja).

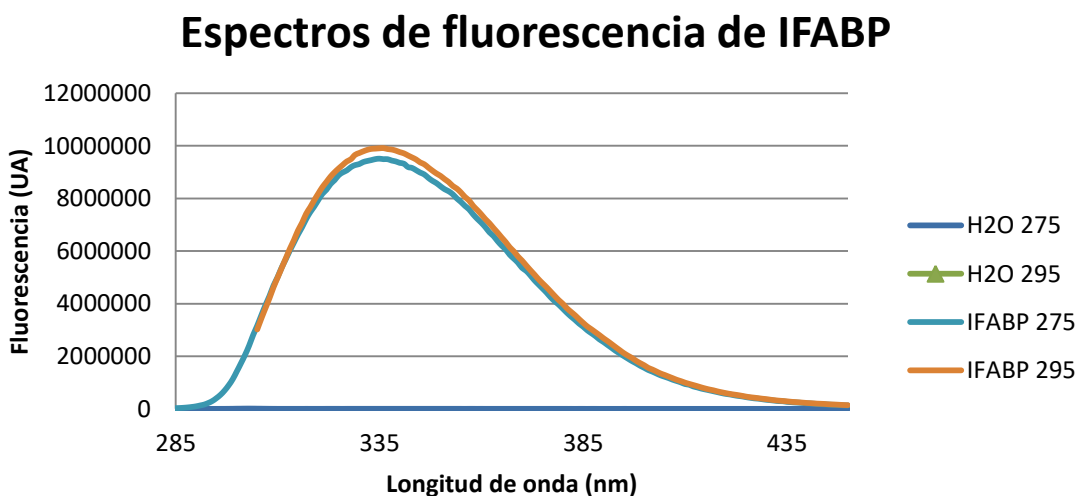
#### 4.3. Control estructural:

Para comprobar que las proteínas purificadas estaban bien plegadas se hicieron dos

controles estructurales. Por un lado, se registraron los espectros de fluorescencia característicos de cada proteína y se determinó la posición del máximo de emisión. Por otro lado, se determinó la afinidad por ligandos hidrofóbico fluorescentes análogos de ácidos grasos. Ambos estudios confirman que las proteínas son funcionales.

#### 4.3.1. Espectros de fluorescencia de las proteínas

Como se describió previamente se midieron los espectros de fluorescencia para cada FABP a 275 y 295 nm (Figura 4.7). Los resultados muestran para IFABP un pico de fluorescencia a una longitud de onda de 335 nm aproximadamente, consistente con la presencia de los dos residuos Trp de la proteína. La posición del máximo es una característica de cada proteína, que depende del número y entorno de los residuos de aminoácidos que son naturalmente fluorescentes, Tyr y Trp. Si la IFABO estuviera desplegada, los residuos Trp estarían expuestos al solvente y mostrarían un espectro de fluorescencia menos intenso y corrido hacia longitudes de onda mayores.



**Figura 4.7: Espectros de Fluorescencia de IFABP pura.** El gráfico muestra la Fluorescencia en unidades arbitrarias en función de las longitudes de onda de emisión medidas en nm, para  $H_2O$  excitada a 275 nm (azul),  $H_2O$  excitada a 295 nm (verde), IFABP excitada a 275 nm (celeste) y IFABP excitada a 295 nm (naranja)

#### 4.3.2. Afinidad por ligandos hidrofóbicos

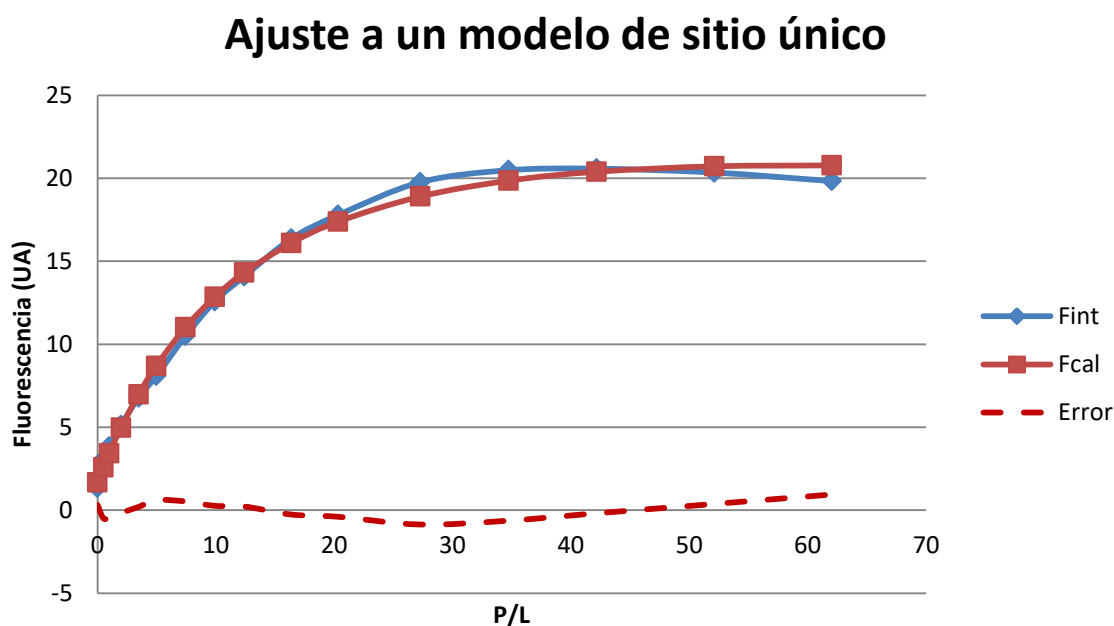
La afinidad por ligandos hidrofóbicos se estudió realizando titulaciones de DAUDA, un análogo de ácido graso fluorescente, para cada proteína. Para calcular la constante de disociación se emplearon dos métodos de análisis, ya descritos en la sección correspondiente de “Materiales y Métodos”.

La concentración inicial de DAUDA fue de 0.38  $\mu M$  y se realizaron agregados sucesivos de FABP

cuya concentración en el stock fue de 95  $\mu\text{M}$ . Luego de cada agregado, se dejó equilibrar la muestra por 3 min y se midió la fluorescencia emitida en un rango de longitudes de onda entre 355 y 675 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes para realizar los ajustes descriptos. Para ambas proteínas se observó un aumento gradual de la fluorescencia del ligando. Los datos se analizaron de acuerdo a las ecuaciones 3.4 y 3.6.

#### Ajuste a un modelo de unión de sitio único:

Este ensayo se realizó por duplicado, a continuación se muestran los resultados obtenidos para uno de ellos y el error asociado (figura 4.8).



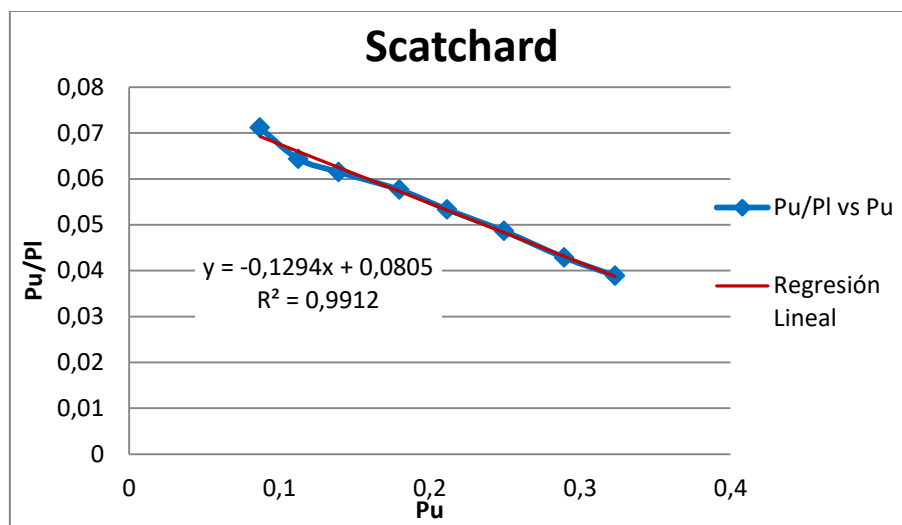
**Figura 4.8: Ajuste a un modelo de sitio único.** En el gráfico se muestra la Fluorescencia integrada (celeste) y la Fluorescencia calculada por el modelo (rojo) y el error asociado al modelo (línea discontinua roja) en función de la relación proteína-ligando en la solución.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos para cada proteína.

	K <sub>d</sub>
IFABP	7,36±1,18 $\mu\text{M}$
LFABP	4,77±2,94 $\mu\text{M}$

### Análisis mediante transformación de Scatchard:

Para los mismos set de datos se realizó un análisis de Scatchard como se describió en “Materiales y Métodos” a fin de poder comparar los valores de  $K_d$  con los publicados en la bibliografía. La **Figura 4.9** muestra un ejemplo de este procedimiento.



**Figura 4.9: Scatchard.** El gráfico representa la razón de las concentraciones de proteína unida y proteína libre en función de la concentración de proteína unida (naranja) y se ajustó una recta (azul), cuya ecuación se muestra en el gráfico.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos por este método de análisis para cada proteína:

	$K_d$
IFABP	$6,55 \pm 1,18 \mu\text{M}$
LFABP	$3,12 \pm 1,41 \mu\text{M}$

Los valores de  $K_d$  obtenidos son similares a los publicados hasta el momento, por lo que se confirma el correcto plegamiento de las FABP.

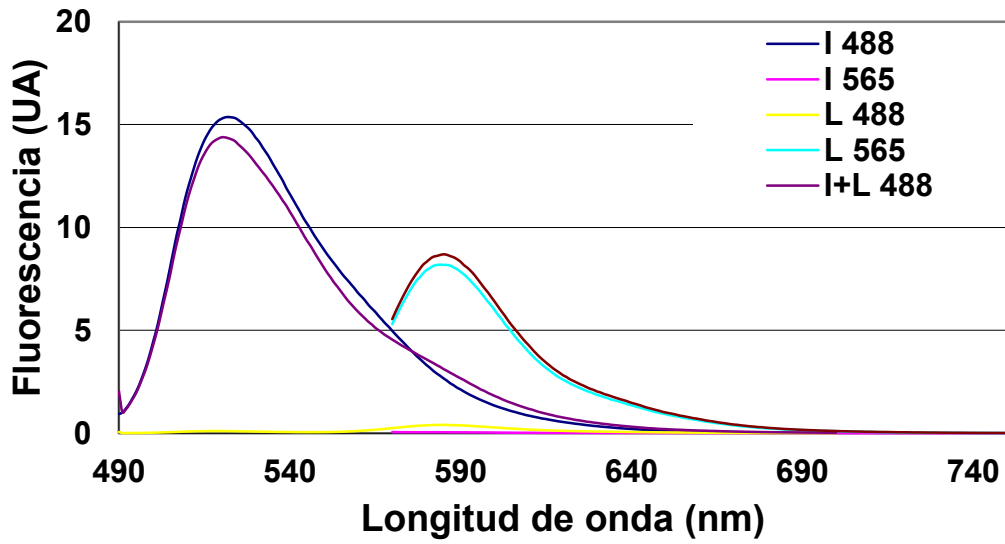
## 4.4 Ensayos de Interacción entre FABPs

### 4.4.1 Marcación fluorescente de proteínas FABPs y análisis por FRET:

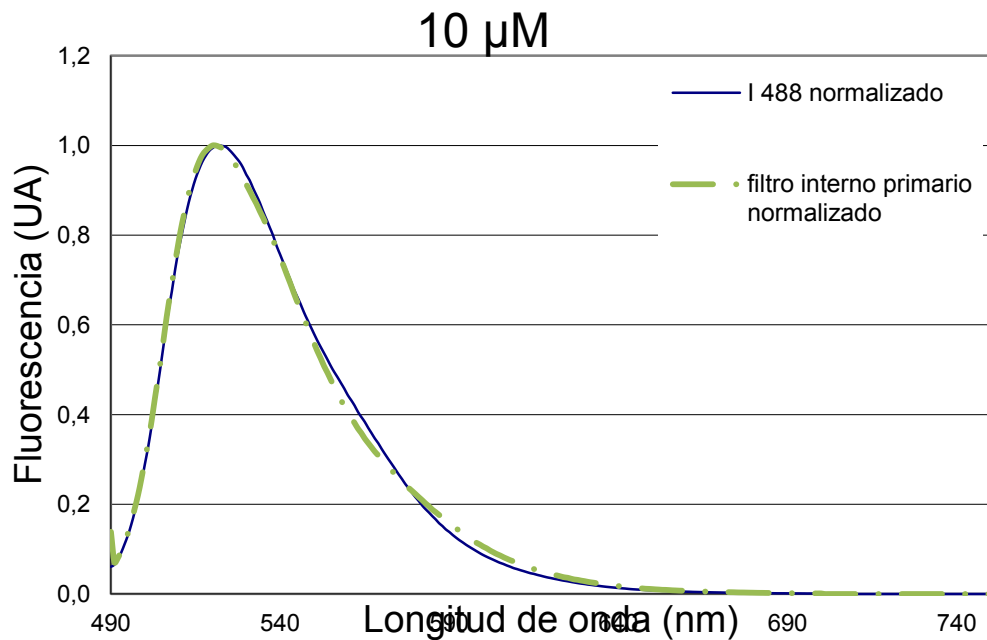
En primer lugar, se marcó cada FABP intestinal en residuos de Lys con fluorescentes de distinto color activados con NHS-éster: Atto488, para IFABP y Atto565, para LFABP, luego de lo cual se calculó el grado de marcación (DOL) para cada caso, obteniéndose un DOL=0.26 y DOL=0.69 para LFABP y IFABP respectivamente.



A

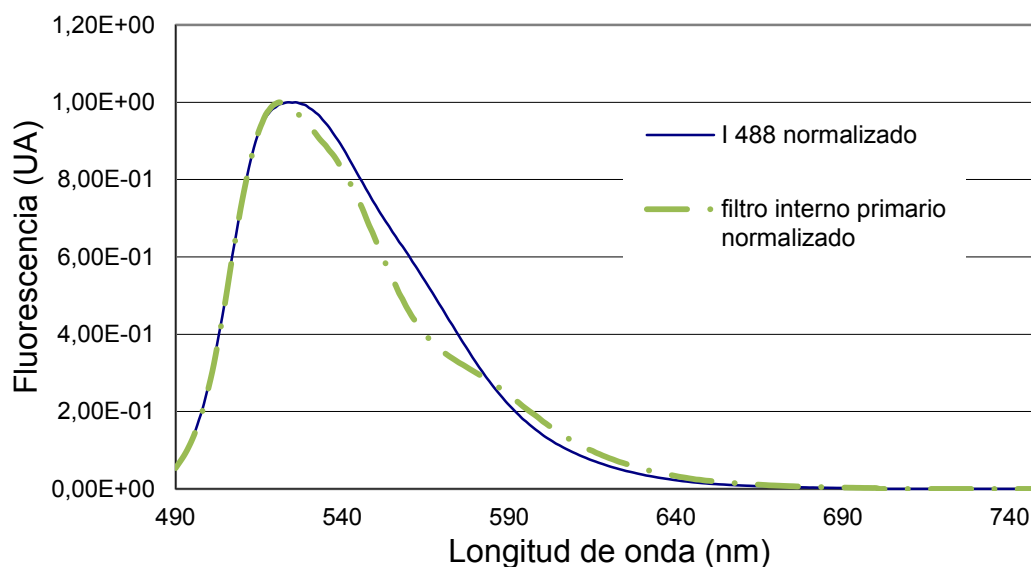


B



**Figura 4.10: Análisis de interacción entre FABP intestinales por FRET:** A) Espectros de fluorescencia de emisión para IFABP-Atto488 (azul), LFABP-Atto565 (amarillo) e IFABP-Atto488 + LFABP-Atto565 (violeta) excitadas a 488 nm, IFABP-Atto488 (fucsia), LFABP-Atto565 (celeste) e IFABP-Atto488 + LFABP-Atto565 (bordó) excitadas a 565 nm. El panel B) muestra la comparación del espectro normalizado para IFABP-Atto488 (azul) y para IFABP-Atto488 + LFABP-Atto565 normalizado y corregido por filtro interno primario (verde) excitados a 488 nm.

A fin de evaluar si cambios en la concentración de las proteínas alteraba la formación del complejo de interacción entre IFABP y LFABP, se repitieron los ensayos anteriores, pero duplicando la concentración de las proteínas. Las mismas correcciones y análisis se realizaron sobre estos nuevos espectros. La **Figura 4.11** muestra los espectros corregidos y normalizados para la muestra de FRET y control. En este caso si se observó un leve cambio del espectro de la muestra FRET que contiene ambas proteínas juntas. Sin embargo, el cambio es muy pequeño y se observa una deformación sesgada del espectro de emisión del donador que no se corresponde con el fenómeno FRET, sino, quizás, con un efecto de filtro interno secundario, es decir, la absorción selectiva de la emisión del donador por el aceptor.



**Figura 4.11: Fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión.** Espectro de fluorescencia normalizado para IFABP-Atto488 (azul) y para IFABP-Atto488 + LFABP-Atto565 normalizado y corregido por filtro interno primario (verde) excitados a 488 nm.

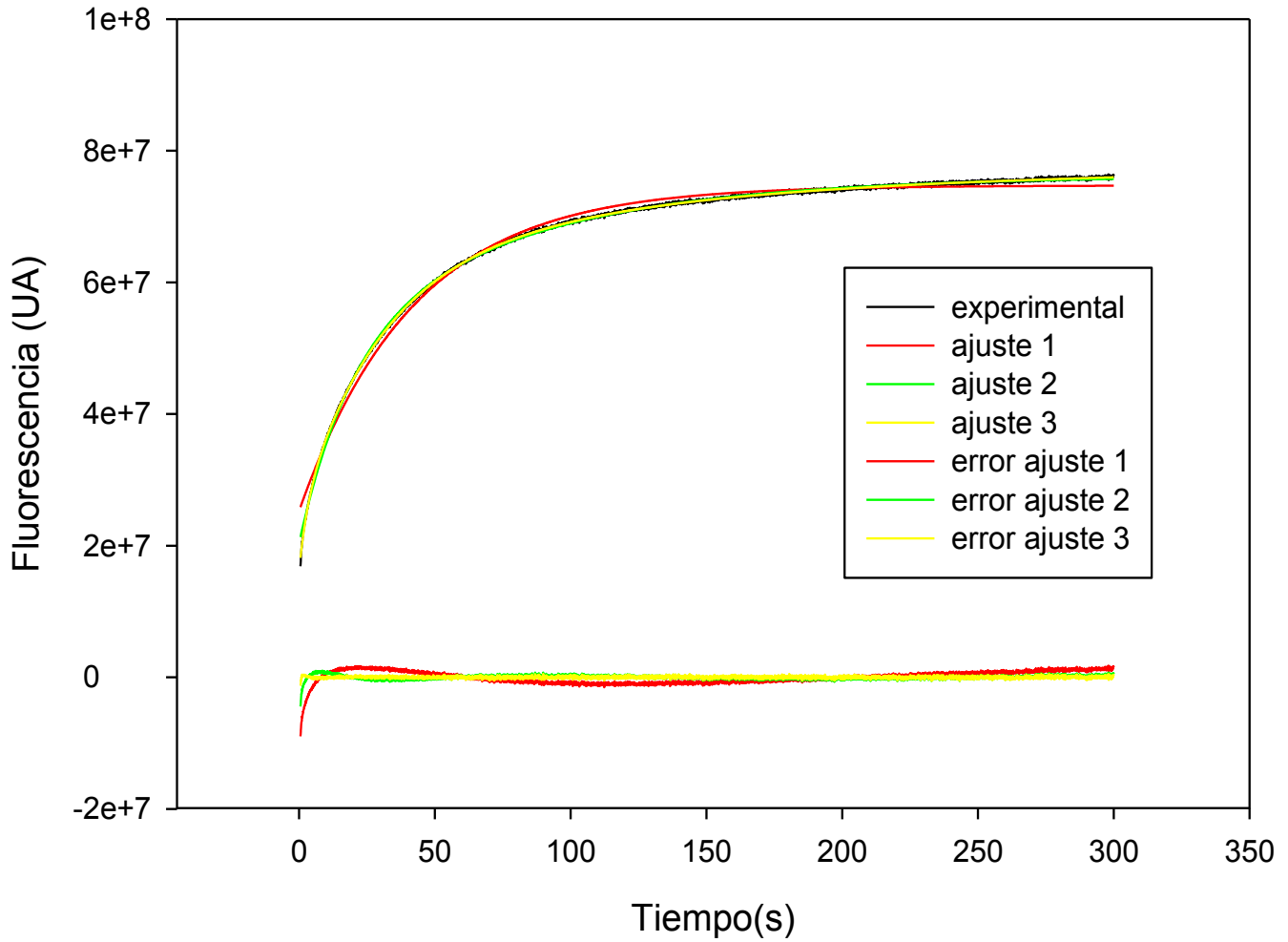
En los ensayos realizados a las distintas concentraciones de FABP marcadas no se pudo demostrar una interacción evidente por FRET entre IFABP y LFABP. Esto no necesariamente significa que no existen interacciones entre estas FABP, sino que puede deberse a que el nivel de marcación (DOL) logrado para cada FABP fue demasiado bajo. De hecho, el grado de marcación alcanzado sólo permitiría ver menos del 20 % de las interacciones que se den entre IFABP y LFABP, lo que limita considerablemente la sensibilidad del ensayo. Más aun, es posible que las interacciones que se den entre IFABP y LFABP sean de naturaleza transiente y no duren lo suficiente como para detectarlas por este método.

#### 4.4.2 Transferencia de ligandos entre FABP de intestino:

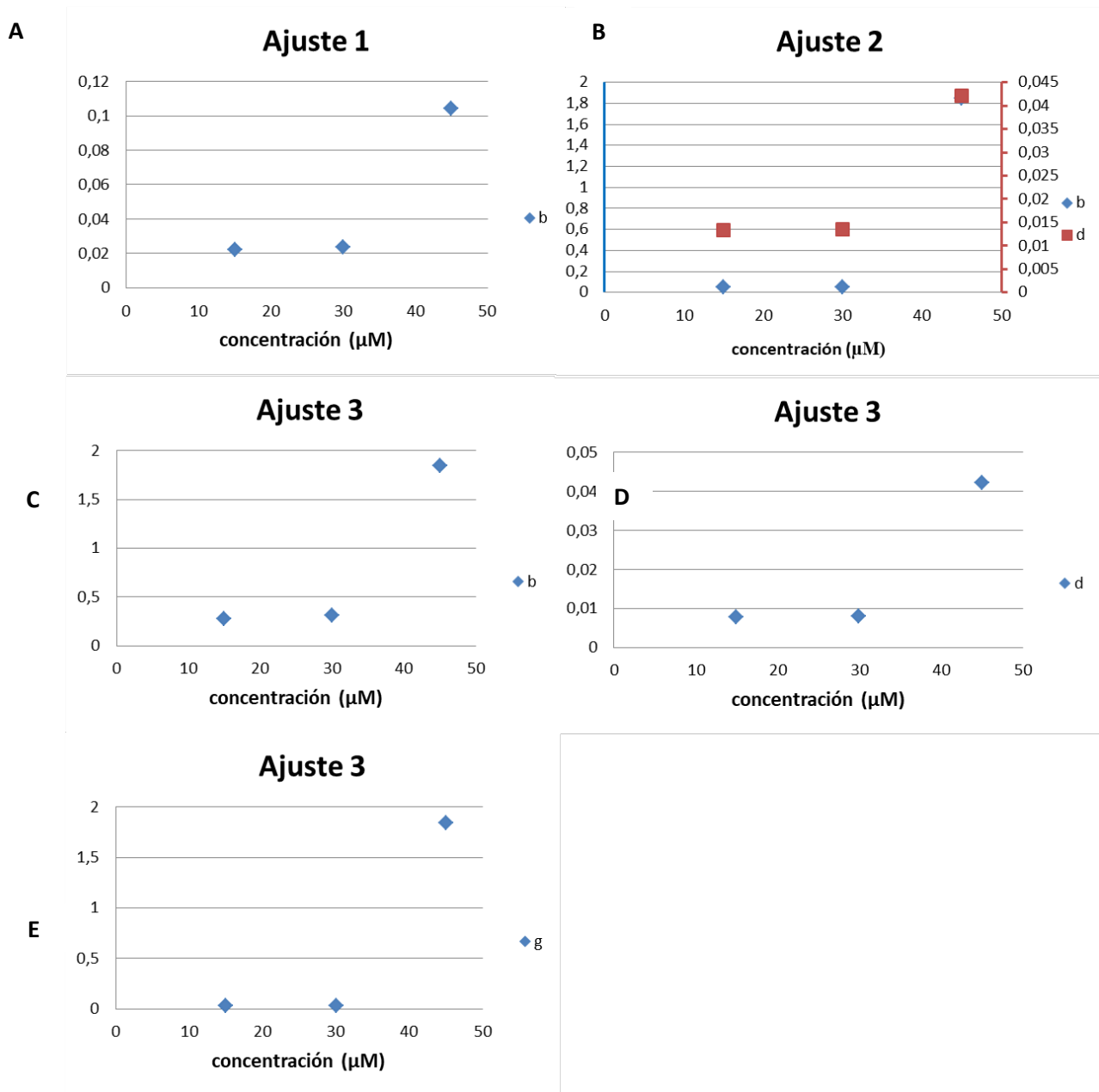
Como se describió previamente la transferencia de ligandos entre FABP de distintos tejidos y membranas modelo se estudió ampliamente analizando la evolución temporal de la señal de fluorescencia. Análogamente a estos ensayos, nos propusimos evaluar la interacción funcional entre las FABP intestinales mediante la transferencia específica de ligandos entre ellas. Así se realizaron medidas de la variación de la intensidad de fluorescencia para 12AO en función del tiempo para distintas concentraciones de LFABP finales (15, 30 y 45  $\mu\text{M}$ ), mantenimiento constantes las concentraciones de 12AO y IFABP (0.5 y 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente). La temperatura de trabajo fue de 37 °C, y se realizaron mediciones cinéticas de 30 segundos desde la inyección.

En todos los casos se observó un aumento de la fluorescencia, lo que indica que el 12AO se transfiere a un entorno en el que muestra mayor rendimiento cuántico de fluorescencia (**Figura 4.12**). Para cuantificar los cambios observados se realizó un ajuste a un modelo de transferencia de ligandos caracterizado por el intercambio del ligando entre dos compartimentos, compatible con un aumento exponencial. Sin embargo, el modelo no resultó satisfactorio, por que se evaluaron dos modelos más, progresivamente más complejos, que incorporan procesos independientes.

Para el ensayo de transferencia de 12AO hacia 30 $\mu\text{L}$  de LFABP, la Figura 4.12 muestra los datos experimentales, los 3 ajustes a los modelos de distinta complejidad y la distribución de errores respecto a los datos experimentales asociados a cada uno de ellos. A diferencia de lo que ocurre con la transferencia de AOFA desde FABP hacia membranas fosfolipídicas modelo, el proceso no puede describirse como una exponencial simple. Llamativamente, tampoco es satisfactorio un modelo más complejo que considere dos transferencias independientes desde la fracción de 12AO unido a IFABP y de la fracción libre hacia LFABP, de acuerdo a la distribución de errores que se observa en cada caso, ya que no están distribuidos aleatoriamente, sino que se observa una tendencia a lo largo de la cinética. Sólo un modelo que considera 3 procesos de transferencia de ligando ocurriendo simultáneamente reproduce aceptablemente el aumento de fluorescencia durante la transferencia de 12AO entre las FABP intestinales. Sin embargo, este modelo requiere de una evaluación más detallada que permita asignar inequívocamente la identidad de cada proceso: rápido, intermedio y lento.



**Figura 4.12: Análisis de la Transferencia de ligandos.** La parte superior del gráfico representa la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo (negro) y los ajustes realizados (ajuste 1 en rojo, ajuste 2 en verde y ajuste 3 en amarillo). En la parte inferior se muestra el error asociado a estos ajustes con la misma distribución de colores.



**Figura 4.13: Parámetros termodinámicos para los ajustes realizados.** La figura A corresponde al ajuste 1 (exponencial simple), y se grafica el parámetro  $b$  en función de la concentración en  $\mu\text{M}$ . La figura B corresponde al ajuste 2 (doble exponencial) y se grafica el parámetro  $b$  y  $d$  (azul y rojo respectivamente). Las figuras C, D y E corresponden al ajuste 3 (triple exponencial) y se grafican los parámetros  $b$ ,  $d$  y  $g$  respectivamente.

Los diferentes ajuste permitieron estimar los coeficientes cinéticos aparentes de velocidad de transferencia de ligandos ( $b$ ,  $d$  y  $g$ ), que se graficaron en la **Figura 4.13**. Dichos coeficientes poseen unidades de  $\text{s}^{-1}$ . El problema con estos modelos es la identidad de los procesos que

representan. De acuerdo a los datos de afinidad y concentración, se habían seleccionado las condiciones iniciales como para que no haya otros procesos relevantes además de la transferencia específica entre ambas FABP. Suponemos que dos posibilidades pueden estar originando esta divergencia del diseño experimental. O bien el sistema no fue bien definido y, por lo tanto, no se cumple la condición inicial de que más del 95% del 12AO se encuentra unido a la IFABP al inicio de las transferencias; o existen múltiples configuraciones del 12AO unido a la IFABP y/o a la LFABP. Esta segunda opción también podría explicar la coexistencia de más de un proceso sin la necesidad de que la fracción de 12AO sea relevante, ya que cada configuración del 12AO podría mostrar diferente afinidad por IFABP o LFABP, pero, sobre todo, diferente rendimiento cuántico. Por lo tanto, es necesario revisar y confirmar el diseño experimental actual, así como diseñar nuevos ensayos que permitan distinguir entre las opciones mencionadas.

Independientemente de la identidad de los procesos que se distinguen en el análisis cinético, es posible observar que los coeficientes aparentes de velocidad de transferencia de 12AO no muestran una clara tendencia con el aumento de la concentración de la proteína aceptora, LFABP. Por otro lado, si bien cada determinación se realizó en función de un promedio de 7 medidas sucesivas, no se han realizado replicados completamente independientes que nos permitan evaluar realmente el error en la determinación de los coeficientes cinéticos **b**, **d** y **g**. Por lo tanto, con los datos obtenidos hasta el momento, no es posible demostrar que IFABP y LFABP interactúan o que durante dicha interacción son capaces de intercambiar sus cargas de ligandos hidrofóbicos.



## 5. Conclusiones

---

El estudio de los mecanismos moleculares por los cuales se asimilan nutrientes y se regula dicho proceso son temas de alto interés que aún no están completamente entendidos y que tienen gran relevancia para el desarrollo de terapias para enfermedades de relevancia social como la obesidad o la aterogénesis y sus complicaciones cardíacas.

El objetivo de este trabajo se centró en evaluar la interacción funcional entre las FABP coexpresadas en epitelio intestinal. Para ello se expresaron y purificaron las proteínas recombinantes de rata IFABP y LFABP a partir de bacterias que contenían los plásmidos pET11a-rLFABP o pET11d-rIFABP. Antes de proceder al estudio propuesto propiamente dicho, se realizaron controles estructurales de unión de un análogo fluorescente de ácido graso, comprobándose que las proteínas obtenidas estaban bien plegadas y eran funcionales.

Respecto a la interacción directa entre las FABP intestinales, en los ensayos realizados a las distintas concentraciones de proteínas marcadas, no se observó interacción por FRET. Como se mencionó anteriormente, esto no necesariamente significa que no existe interacciones entre estas FABP, sino que puede deberse a que el nivel de marcación (DOL) logrado para cada FABP fue bajo. De hecho, el grado de marcación alcanzado sólo permitiría ver menos del 20 % de las interacciones que se den, lo que nos limita considerablemente la sensibilidad del ensayo. Más aun, es posible que las interacciones que se den entre IFABP y LFABP sean de naturaleza transiente y no duren lo suficiente como para detectarlas por este método.

Una posibilidad para continuar con este estudio, y evitar algunos inconvenientes técnicos que se encontraron, es realizar ensayos de interacción por FRET pero midiendo el tiempo de vida del donador que es un parámetro insensible a los efectos de filtro interno o excitación directa del aceptor. Estos estudios no son posibles de llevarse a cabo en el Fluorolog3 o el Fluorómetro SLM-Olis disponibles en el INIBIOLP, pero si se podrían llevar a cabo en un fluorómetro con módulo de tiempo de vida por conteo de fotones únicos, como el equipo disponible en el INIFTA.

Con el fin de estudiar la interacción transiente pero funcional entre las FABP, se realizaron ensayos de transferencia de ligando entre ellas, y se logró demostrar la transferencia de ligandos entre IFABP y LFABP. Sin embargo, no fue posible evaluar si el mecanismo de transferencia de 12AO era mediado por la disociación del ligando hacia la fase acuosa o si tenía como intermediario la interacción de ambas proteínas en un mecanismo colisional. Esto se debió en parte que fue necesario aplicar ajustes de mayor complejidad, respecto a los estudios clásicos de transferencia a membranas fosfolipídicas, para poder describir satisfactoriamente los procesos que tienen lugar durante la transferencia de ácidos grasos entre IFABP y LFABP. Este procedimiento llevó a contemplar la posibilidad de que coexistan hasta tres procesos independientes, ya sea porque las condiciones iniciales del ensayo no pudieron eliminar o minimizar la posibilidad de que ocurran fenómenos alternativos al que se deseaba estudiar o



porque el sistema en realidad es polidisperso y es necesario considerar diferentes configuraciones de unión del 12AO a las FABP, observación que resulta completamente novedosa a la luz de la bibliografía disponible.

Para finalizar, vale destacar que el estudio de los mecanismos de absorción de nutrientes y la regulación de su distribución hacia distintos destinos metabólicos es aún un tema de gran interés médico y tecnológico, pero que requiere de gran atención para resolver un gran número de interrogantes que aún no han sido resueltos, dentro de los cuales se encuentra identificar y describir las funciones específicas de las FABP que se coexpresan en niveles relativamente elevados en enterocitos, IFABP y LFABP.

---

## 6. Referencias Bibliográficas

---

- 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, 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.
- 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.
- 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. The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol.* 1988. 111:143-84. Review.
- Bloom W.; and D. W. Fawcett. Bloom-Fawcett Tratado de Histología, duodécima edición. Editorial Interamericana-Mc Graw-Hill. 1995.
- 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.
- Córsico B. *et.al.*, Análisis estructural y funcional de macromoléculas; edición literaria a cargo de Betina Córscico; Lisandro J. Falomir Lockhart ; Gisela R. Franchini ; Natalia Scaglia . – 1ª ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2013. ISBN 978-950-34-1057-8 le,
- 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.
- De Gerónimo et al., IFABP portal region insertion during membrane interaction depends on phospholipid composition, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1841, Issue 1, January 2014, Pages 141-150.
- De Gerónimo et al., Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein LFABP) to membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1801, Issue 9, September 2010, Pages 1082-1089.
- 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.

- Falomir-Lockhart et al., Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: Clues for specific physiological roles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1811, Issues 7–8, July–August 2011, Pages 452-459.
- 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.
- 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.
- Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*. 1996. 35(3):243-82.
- Hauerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*. 2004. 43(4):328-49.
- 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.
- 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.
- Lagakos, W., Storch, J., Zhou, Y. X., Rusznak, T., and Agellon, L. *FASEB J*. 23, 521. 2009.
- 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.
- 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.
- 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
- Murota K, Matsui N, Kawada T, Takahashi N, Fushiki T. Inhibitory effect of monoacylglycerol on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001. 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, 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.
- 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.
- Rodriguez Sawiki et al., FABP1 knockdown in human enterocytes impairs proliferation and alters lipid metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1862, Issue 12, December 2017, Pages 1587-1594.
- Shvadchak V V *et al.* Specificity and kinetics of alpha-synuclein binding to model membranes determined with fluorescent excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) probe. *J. Biol. Chem.* 286, 13023–13032 (2011).
- Storch J, Corsico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 2008. 28:73-95.
- 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.
- 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.
- Trotter PJ, Ho SY, Storch J. Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J Lipid Res.* 1996. 37(2):336-46.
- 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.
- 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.
- West Donald M., Holler F. James, Crouch, Stanley R., Skoog Douglas A., *Fundamentos de Química Analítica* ISBN-13: 9786075193779, eBook: 9786075193786, 1088 Páginas | 9ª Edición | © 2014