



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Análisis de las funciones específicas de las  
proteínas que unen ácidos grasos (FABPs)  
de intestino.”**

---

Lic. Luciana Rodriguez Sawicki  
Director: Dra. Betina Córscico

2015

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

**“Análisis de las funciones específicas de las  
proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) de  
intestino.”**

Lic. Luciana Rodriguez Sawicki

Directora

Dra. Betina Córscico

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Betina Córscico. Durante el desarrollo de la misma se realizó una estadía en el laboratorio de la Dra. Judith Storch, en el Departamento de Ciencias Nutricionales, Universidad Rutgers, la universidad del estado de Nueva Jersey.

Durante la realización del mismo se recibió apoyo económico de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Wellcome Trust (Reino Unido), y de la Fundación Fulbright-Ministerio de Educación de la República Argentina.

Parte de los resultados aquí presentados fueron publicados en *Biochimica et Biophysica Acta* y en *Journal of Biological Chemistry*.

# Índice.

Índice. ....	3
Agradecimientos.....	8
Abreviaturas.....	10
Resumen. ....	13
Introducción. ....	19
1. Proteínas que unen ácidos grasos (FABP).....	20
1.1. Distribución tisular de las FABP. ....	21
1.2. Estructura génica y evolución. ....	23
1.3. Estructura general de las proteínas pertenecientes a la familia de las FABPs.....	24
1.4. La hipótesis del “portal”. ....	26
1.5. Digestión y absorción de lípidos en el intestino de mamíferos: Generalidades.....	27
1.6. FABPs del intestino delgado de mamíferos.....	29
1.7. Diferencias entre I- y LFABP.....	30
1.8. Funciones biológicas de I- y LFABP.....	32
1.9. Estudios funcionales in vitro.....	33
1.10. Estudios a nivel celular.....	35
1.11. Estudios in vivo.....	37
1.12. Polimorfismos de las FABPs con consecuencias en la salud humana.....	41
Materiales y métodos.....	42
2.1. Protocolos de Biología Molecular.....	43
2.1.1. Minipreparación de Plásmidos.....	43
2.1.2. Digestión con enzimas de restricción.....	44

2.1.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	45
2.1.4. Construcción del vector anti-ARNm hLFABP.....	45
2.1.5. Obtención de células competentes.....	46
2.1.6. Transformación de bacterias competentes.....	47
2.2. Protocolos de Bioquímica.....	49
2.2.1. Screening de expresión de proteínas recombinantes.....	49
2.2.2. Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.....	49
2.2.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	51
2.2.3.1. Expresión y purificación de las FABP nativas y mutantes puntuales .....	51
2.2.3.2. Expresión y purificación de las variantes estructurales de las FABP intestinales.....	53
2.2.4. Cuantificación de proteínas.....	54
2.2.4.1. Coeficiente de extinción molar.....	54
2.2.4.2. Bradford.....	55
2.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales anti-IFABP en conejo.....	55
2.2.6. Western Blot de proteínas.....	56
2.2.7. Ensayo de determinación de fósforo inorgánico.....	57
2.3. Protocolos de Biofísica.....	59
2.3.1. Ensayos de unión a ligandos.....	59
2.3.1.1. Determinación de la constante de afinidad por ácidos grasos naturales empleando el método de ADIFAB.....	59
2.3.1.2. Determinación de la constante de disociación de AOFA.....	59
2.3.1.3. Ensayo de Lipidex 1000.....	60
2.3.2. Ensayos de interacción con membranas artificiales.....	61
2.3.2.1. Preparación de membranas artificiales.....	61
2.3.2.1.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).....	61

2.3.2.1.2. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs).....	62
2.3.2.2. Cálculo del coeficiente de partición.....	62
2.3.2.3. Transferencia de antroiloxi-ácidos grasos (AOFA) desde FABP hacia SUVs.....	64
2.3.2.3.1. Efecto de la concentración de las vesículas aceptoras.....	64
2.3.2.3.2. Efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras.....	65
2.3.3. Quenching de acrilamida en ausencia y presencia de LUVs.....	66
2.3.4. Ensayo con vesículas cargadas con sacarosa.....	66
2.4 Protocolos de Biología Celular.....	67
2.4.1. Propagación, mantenimiento y subcultivo de células Caco-2.....	67
2.4.2. Congelado y descongelado de células Caco-2. ....	68
2.4.3. Obtención de clones Caco-2 con expresión disminuida de hLFABP.....	69
2.4.4. Determinación de la capacidad de crecimiento.....	70
2.4.4.1. Tiempo de duplicación.....	70
2.4.4.2. Asimilación de <sup>3</sup> H-Timidina.....	71
2.4.5. Diferenciación de células Caco-2.....	72
2.4.6. Asimilación de ácidos grasos.....	73
2.4.7. Distribución y metabolismo de FA.....	74
2.4.8. Extracción de lípidos totales.....	75
2.4.9. Cromatografía en capa fina.....	76
2.5. Análisis estadísticos.....	78
Resultados y Discusión. ....	79
Estudios biofísicos.....	80
3. Caracterización de la unión a ligandos e interacción con membranas de la variante estructural de IFABP, IFABP-D98D.....	80
3.1. Introducción e hipótesis de trabajo.....	80

3.2. Determinación de la unión a ligandos.....	85
3.2.1. ADIFAB.....	85
3.2.2. Antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA).....	86
3.3. Coeficiente de partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos.....	88
3.4. Transferencia de 12 AO y 12AS desde D98D hacia membranas artificiales.....	90
3.5. Efecto de la carga en la transferencia de AOFA desde FABP hacia membranas.....	92
3.6. Ensayo de interacción con vesículas cargadas con sacarosa.....	93
3.7. Ensayo de quenching de acrilamida.....	94
3.8. Discusión.....	97
Estudios biofísicos.....	101
4. Estudio de la capacidad de unión de monoacilglicéridos a LFABP.....	101
4.1. Introducción e hipótesis de trabajo.....	101
4.2. Análisis cromatográfico de ciosol de hígado de ratones wild type y ratones nulos para LFABP.....	104
4.3. Análisis de equilibrio de unión. Ensayo de Lipidex 1000.....	106
4.4. Localización del ligando monooleína en el complejo formado con LFABP obtenida por RMN en solución (estudios realizados por el grupo de la Dra. Stark en colaboración con la Dra. Storch).....	108
4.5. Transferencia de 12AO y MG12AO desde LFABP hacia SUVs (estudios realizados por el grupo de la Dra. Murota en colaboración con la Dra. Storch).....	110
4.6. Discusión.....	111
Estudios con células en cultivo.....	114
5. Análisis de la proliferación celular y metabolismo lipídico en una línea celular con la expresión de LFABP disminuida.....	114
5.1. Introducción e hipótesis de trabajo.....	114

5.2. Obtención de poblaciones con la expresión disminuida de LFABP.....	118
5.3. Proliferación y diferenciación celular.....	121
5.4. Asimilación de ácido oleico.....	125
5.5. Metabolismo de ácido oleico.....	128
5.6. Discusión.....	133
Conclusiones.....	136
Bibliografía.....	141



## Agradecimientos

A Betina, por la dirección de mi tesis. Por tantos años de aprendizaje en el laboratorio, por la paciencia a mis errores, por darme libertad y alentarme en todos mis proyectos. Por contagiarme su incesante interés por la ciencia, acompañarme y respetarme en momentos difíciles. A Gabriel por su buen humor y hacerme reír.

A mis compañeros del laboratorio: Gisela o Mamá Morsa, que nos ha alimentado, hecho reír y ayudado en todo; Lisandro, con sus llamadas de viernes a las 17 hs desde Göttingen; Xime, que me enseñó a trabajar ordenadamente en el laboratorio, Nati S, por la gran ayuda con las Caco-2; Edu, por sus mates, caricaturas y su humor relajado; Mari y Flor, por sus charlas amigas; Jor y Vale, mis palomos amigos, tantos mates, risas, consejos, terapias de ultracentrífuga, siempre presentes y ayudándome; Nati B, con quien dimos nuestros primeros pasitos juntas, y sé que siempre puedo contar con ella incondicionalmente; Kari y Juli, los “peques” del lab. Gracias a todos por ser grandes compañeros y amigos, por ayudarme y contenerme, por los mates, los almuerzos, las juntas, y el excelente ambiente de trabajo.

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

A Judy y su laboratorio en la Universidad de Rutgers, por hacerme sentir cómoda y bienvenida, por su generosidad y la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A mis amigos, los de Mar del Plata, los de La Plata, los que ahora están en Buenos Aires, La Pampa, etc. A Andre por ser una amiga incondicional, a Juli, Ruty, Estefi y Martincho, por compartir tantos momentos lindos. A aquellos que están en mi vida desde hace más de 10 años, y seguirán estando siempre,

Carme, Mariem, Ana, Juje, Guille, Cami. A los Anitos y Margaritos, a los compañeros de cátedra.

A mi papá Ricardo y mi mamá Silvia, que siempre me acompañan en todo, me ayudan, me consuelan, me han hecho la persona que soy hoy en día. A mi hermano Juan, que a pesar de la distancia, está siempre cerca. A mi tía Rosa, que siempre está presente acompañándome en todos los momentos de mi vida, buenos y malos, mi segunda mamá. A mis tíos Jorge, Ricardo y Olga. A mis primos, Maitu, Fer, Daiana y Sebastián. A Aurelie y toda su familia que me miman desde lejos. A mis abuelos Rodolfo y Pichona, y a mis abuelos que ya no están, Baba y Didi. Gracias por su ejemplo y su cariño.

A Martín, Mar, Tincho, por ser la persona especial que me elige cada día. Por aguantarme en todo, sostenerme cuando me caigo, quererme y estar a mi lado. A su familia: Erica, Roberto, Cecilia y Javi, que siempre me han recibido con mucho cariño.

## Abreviaturas.

**12AO** 12-(9-anthroiloxi) oléico

**12AS** 12-(9-anthroiloxi) esteárico

**2-AG** 2-araquidonilglicérido

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNc** ADN complementario

**AEA** Araquidonoiletanolamida

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

**AOFA** Anthroiloxi-derivados de ácidos grasos

**ARN** Ácido Ribonucleico

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

**BSA** Albúmina Sérica Bovina

**CB1** Receptor Canabinoide 1

**CB2** Receptor Canabinoide 2

**CD** Dicroísmo Circular

**CL** Cardiolipina

**CRABP** Proteínas que unen ácido retinoico

**CRBP** Proteínas que unen retinol

**DG** Diacilglicéridos

**DO** Densidad óptica

**EC** Ésteres de colesterol

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

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

**EPC** Fosfatidil colina de huevo

**FA** Ácidos grasos

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

**FAS** Ácido graso sintasa

**FAT/CD36** Traslocasa de ácidos grasos

**FATP** Proteína transportadora de ácidos grasos

**FFA** Ácidos grasos libres

**FRET** Foster Resonance Energy Transfer

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

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

**HNF4 $\alpha$**  Receptor Nuclear de Hormona Esteroidea

**HRP** HorseRadish Peroxidase, peroxidasa de rábano

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

**IPTG** Isopropiltiogalactósido

**K<sub>d</sub>** Constante de Disociación

**K<sub>p</sub>** Coeficiente de Partición

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

**LB** Luria Bertoni

**LCFA** Ácido graso de cadena larga

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

**LUV** vesículas unilamelares grandes

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

**MG** Monoacilglicéridos

**NAE** n-aciletanolamina

**NAPEs** n-acilfosfatidiletanolaminas

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

**NMR** Resonancia magnética nuclear

**OA** Ácido oleico (*oleic acid*)

**PA** Ácido palmítico (*palmitic acid*)

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

**PC** Fosfatidilcolina

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEG** Polietilenglicol

**PL** Fosfolípidos

**PPAR** Receptor activador de la proliferación peroxisomal

**PS** Fosfatidilserina

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

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

**SUV** Vesículas unilamelares pequeñas

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

**TG** Triacilglicéridos

**TLC** Thin Layer Chromatography, cromatografía en capa fina

**Trp (W)** Triptofano

**WT** Wild Type, tipo salvaje, nativo

# Resumen.

En el enterocito intestinal de mamíferos se expresan elevadas concentraciones de dos proteínas que unen ácidos grasos (FABPs): FABP intestinal (IFABP) y hepática (LFABP). Las células de intestino metabolizan una gran cantidad de lípidos dietarios y, por lo tanto, el estudio de proteínas que participan en el procesamiento de los mismos es clave para la comprensión detallada de los procesos fisiológicos y patológicos vinculados con estos compuestos.

I- y LFABP poseen una estructura terciaria característica y bien conservada en la familia de las FABPs, la cual consta de 10 hojas  $\beta$  antiparalelas empaquetadas formando un barril  $\beta$  levemente elíptico y dos segmentos  $\alpha$ -helicoidales cortos que formarían parte de un pequeño portal en la parte superior del barril. Pese a que estas dos proteínas presentan una estructura tridimensional muy similar, poseen un bajo nivel de homología en su estructura primaria.

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

Con la finalidad de contribuir al estudio de las funciones específicas de IFABP y LFABP en el enterocito, en este proyecto se han abordado los siguientes objetivos específicos:

a) Estudiar la relación estructura-función de los subdominios presentes en la proteína IFABP. Empleando una variante estructural de IFABP obtenida mediante proteólisis limitada, IFABP-D98D, se estudió la unión, partición de equilibrio entre proteína y membrana, velocidades y mecanismos de transferencia de ligandos e interacción proteína-membrana.

b) Estudiar la unión de monoacilglicéridos (MG) a LFABP. Se analizó la capacidad de unión del ligando *in vivo e in vitro* y se determinó la afinidad del ligando por la proteína.

c) Analizar el efecto de la disminución de la expresión de LFABP en la línea celular Caco-2, modelo de epitelio intestinal. Se estudió el efecto de la disminución de LFABP en la proliferación y diferenciación celular. Asimismo, se abordó el estudio del metabolismo lipídico, analizando la capacidad de asimilar y metabolizar el ácido oleico (OA).

Se ha propuesto que la transferencia de los FAs desde IFABP hacia vesículas ocurre mediante interacciones proteína-membrana. En este trabajo, hemos analizado la interacción proteína-membrana de una variante estructural de IFABP obtenida por proteólisis limitada. Para ello, se expresó la proteína IFABP-D98D y se analizó su unión tanto a ácido oleico como a derivados fluorescentes de ácidos grasos. Empleando ensayos de partición de ligando y transferencia de ligando hacia membranas artificiales, se analizó el mecanismo de transferencia de ligandos hacia membranas artificiales y se estudió el efecto de la carga negativa superficial de la membrana. Ensayos de quenching de acrilamida en ausencia y presencia de vesículas permitieron obtener información sobre el acceso al solvente del único triptófano presente en la proteína. Se completó el análisis de interacción proteína-membrana con un ensayo con vesículas cargadas con sacarosa, método de centrifugación diferencial que permite estudiar la unión interfacial entre membrana y FABP.

IFABP-D98D es el producto de la proteólisis limitada en presencia del ligando oleato. Debido a su forma de obtención, nosotros hipotetizamos que este fragmento de 98 kDa resistente a proteólisis mantiene los subdominios estructurales que determinan la funcionalidad de la proteína, tales como la unión y afinidad por el ligando así como la interacción con membranas. Los resultados muestran claramente que, a pesar de carecer de gran parte de la proteína original, IFABP-D98D aún conserva afinidad por los ligandos. Sin embargo, IFABP-D98D presenta un mecanismo de transferencia de ligando distinto del de la proteína nativa. Los ensayos de interacción con membranas, el quenching de acrilamida así como el ensayo de vesículas cargadas con sacarosa, muestran que, IFABP-D98D retiene la capacidad de interactuar con membranas, la cual se ve influenciada por la presencia de cargas negativas en la



superficie. Todos estos resultados afirman nuestra hipótesis inicial. El hecho que la proteína se encuentre unida al ligando oleato durante la proteólisis, hace que los componentes estructurales de la interacción entre la proteína y el ligando y que son cruciales para su función estén protegidos al efecto de la proteólisis y por ende se encuentren presentes en el fragmento remanente.

LFABP posee características únicas de unión a ligandos, como el hecho de ser capaz de unir dos ligandos en su cavidad. Está claro que LFABP une FAs de cadena larga y serviría como una proteína intracelular de transporte de FAs, pero aún queda por estudiar el transporte intracelular de MGs en el enterocito, el cual no ha sido considerado en profundidad. En ratones *knockout* de LFABP (LFABP<sup>-/-</sup>), se ha observado que el metabolismo intestinal de MG está significativamente perturbado, aunque estos cambios no están dados por cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de MG y triacilglicéridos (TG). Con la finalidad de resolver la controversia sobre la unión de MG a LFABP, se utilizó citosol de hígado proveniente de ratones *wild type* (WT) y ratones LFABP<sup>-/-</sup> para evaluar la capacidad de unión al ligando así como un ensayo para determinar la afinidad de la proteína por el mismo.

Se utilizó citosol de hígado de ratones WT y LFABP<sup>-/-</sup> con el fin de analizar si LFABP une MG en un contexto fisiológico. El *Western Blot* mostró la presencia de LFABP en la fracción de peso molecular de ~14kDa, confirmando que LFABP está uniendo FAs en el citosol de hígado. Resultados idénticos se encontraron usando MG radioactivamente marcado, donde las fracciones conteniendo proteínas de ~14kDa de citosol de hígado WT pero no de LFABP<sup>-/-</sup> retuvieron el ligando [<sup>3</sup>H]monooleína. El análisis de equilibrio de unión usando la resina Lipidex mostró que las afinidades de unión de LFABP por los ligandos FAs y MGs se encuentran dentro de rangos similares, aunque la afinidad por MGs es aproximadamente 2 veces menor. Estos resultados no sólo aportan evidencias que indican que LFABP une MG, sino que además lo hace *in vivo*, y es probable que sea la proteína intracelular de unión a MG mayoritaria en el hígado, así como en el intestino y riñón, donde LFABP también se expresa.

Con el fin de tener una visión más cercana al contexto fisiológico de estas proteínas, se decidió modificar el nivel de expresión de LFABP en un modelo de células epiteliales intestinales, Caco-2. Se obtuvieron poblaciones clonales y no clonales con la

expresión de LFABP disminuida, en la cuales no se observó un efecto compensatorio con la proteína IFABP.

Tanto el crecimiento como la diferenciación de las células con la expresión de LFABP disminuida se vieron retrasados en comparación con las células control. Esto podría deberse a una menor incorporación de ácidos grasos y por ende menor cantidad de masa disponible para la síntesis de fosfolípidos (PL). Dado que existe evidencia de la interacción de LFABP cargada con su ligando con factores de transcripción, la disminución de esta proteína podría estar alterando la expresión de proteínas necesarias para el crecimiento, división y diferenciación celular. Por otro lado, se ha demostrado que LFABP direccionaría ácidos grasos a la mitocondria para su  $\beta$ -oxidación, la disminución de la expresión de la proteína podría dar como resultado una disminución de la energía disponible en la célula. Asimismo se observó que en las células que subexpresan LFABP tanto la velocidad de asimilación como la cantidad total de ácido oleico captado disminuyó. La cantidad de proteína presente en el citoplasma de la célula parecería regular la cantidad de ácido graso que puede ingresar, siendo menor la cantidad de ácido graso asimilado cuando los niveles de LFABP están disminuídos. La distribución del ácido oleico asimilado en las diversas fracciones lipídicas mostró una mayor incorporación de OA en TG y una disminución de la marca radioactiva incorporada en PL en las líneas con la expresión de LFABP disminuida. Esto indicaría que LFABP direcciona los FAs hacia la síntesis de PL, como se ha observado en modelos celulares anteriores. Pero hay que tener en cuenta que el enterocito es una célula altamente diferenciada y especializada en su rol de captación de nutrientes y redistribución al resto del organismo. Estas observaciones podrían explicarse como un intento de esta célula altamente diferenciada por compensar la disminución de LFABP. Por otro lado, se detectó una disminución en la cantidad de lípidos secretados basolateralmente por la célula. Se ha demostrado que LFABP forma parte de la maquinaria proteica que ensambla la vesícula prequilomicrosómica. La baja expresión de esta proteína afectaría el correcto ensamblaje de la vesícula prequilomicrosómica, así como la composición de la misma, dando como resultado defectos en la secreción de quilomicrones. Estos resultados muestran claramente que LFABP juega un rol relevante en la biología celular del enterocito, alterándose no sólo la captación y metabolismo de FAs, sino también la proliferación y diferenciación de

estas células ante la disminución de esta proteína. Aún queda por dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales observamos estos cambios en las células con la expresión de LFABP alterada.

Las diferencias observadas en cuanto a las propiedades de unión de ligandos así como su mecanismo de transferencia de FAs hacia membranas y su interacción con las mismas subyacen en las características estructurales de I- y LFABP, las cuales determinan sus propiedades funcionales. En los estudios en cultivo, se observó que no sólo la alteración de la expresión de LFABP no fue compensada por IFABP, sino que además se registraron cambios drásticos en el crecimiento y metabolismo del enterocito. En estudios comparativos *in vivo* entre ratones nulos para IFABP y ratones nulos para LFABP se han observado cambios a nivel del balance energético total del organismo. En general, todas las evidencias observadas *in vitro*, en cultivo e *in vivo*, apoyan nuestra hipótesis inicial que IFABP y LFABP cumplen funciones diferentes en el enterocito.

# Introducción.

## 1. Proteínas que unen ácidos grasos (FABP).

El tráfico de los ácidos grasos (FAs) en las células es un proceso complejo y dinámico que afecta múltiples aspectos de la función celular. Los ácidos grasos funcionan tanto como fuente de energía así como señales en la regulación metabólica, actuando a través de redes enzimáticas y transcripcionales para modular la expresión de genes, vías de crecimiento y supervivencia, y respuestas inflamatorias y metabólicas (Hotamisligil 2006; Saltiel and Kahn 2001). Aún más, particularmente los ácidos araquidónico y linoleico pueden ser metabolizados para conformar una gran y diversa familia de mediadores lipídicos bioactivos llamados eicosanoides, los cuales actúan como mediadores pro- y antiinflamatorios (Haeggström et al. 2010; Serhan, Yacoubian, and Yang 2008). Un componente regulatorio crítico de la biosíntesis de eicosanoides se encuentra a nivel de la disponibilidad de FAs no esterificados liberados desde los fosfolípidos de membrana. Esto es sólo un ejemplo donde se evidencian todos los aspectos de los cuales depende el complejo procesamiento, transporte, disponibilidad y remoción de los lípidos necesarios para mantener un balance entre las especies lipídicas en los compartimentos blanco así como regular su compromiso como blancos de señalización.

Las chaperonas intracelulares de los FAs son conocidas como FABPs, del inglés *Fatty Acid Binding Proteins* (Proteínas que Unen Ácidos Grasos). Las FABPs son proteínas de 14-15 kDa que se encuentran expresadas abundantemente en diversos tejidos y unen reversiblemente y con gran afinidad ligandos hidrofóbicos, tales como ácidos grasos de cadena larga (LCFA) saturados e insaturados, eicosanoides así como otros lípidos (Coe and Bernlohr 1998; Zimmerman and Veerkamp 2002; Smathers and Petersen 2011). Las FABPs se encuentran ampliamente distribuidas a través de las especies, desde *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* hasta ratón y humano, mostrando una conservación evolutiva muy fuerte. Sin embargo, poco se sabe sobre sus funciones biológicas exactas y mecanismos de acción. Estudios realizados en células en cultivo sugieren potenciales acciones de las FABPs en el ingreso, almacenamiento y egreso de los FAs así como en el metabolismo de fosfolípidos y colesterol (Hauerland and Spener 2004; Chmurzynska 2006). Las FABPs también han sido propuestas como distribuidoras de ligandos para regular procesos de

señalización y actividades enzimáticas. En un contexto más amplio, las FABPs son vistas como chaperonas de los lípidos, escoltándolos y probablemente dictaminando sus funciones biológicas. Recientemente, mediante el uso de varios modelos genéticos y químicos tanto en células como en animales enteros, se ha demostrado que las FABPs son centrales en los procesos mediados por lípidos y se encuentran relacionadas a vías metabólicas, de señalización y de la respuesta inmune. Estos estudios han resaltado el potencial de estas proteínas como blancos terapéuticos para una variedad de desórdenes asociados a las mismas, incluyendo obesidad, diabetes y aterosclerosis.

Desde el descubrimiento de las FABPs en 1972 (Ockner et al. 1972) hasta la actualidad se han sumado numerosos representantes de esta familia pertenecientes a distintos grupos del reino animal. Es importante destacar que las proteínas que unen retinol (CRBP) y ácido retinoico (CRABP) están estrechamente relacionadas con las FABP ya que presentan una estructura terciaria muy similar. Entre los miembros de esta familia de proteínas se observa una elevada conservación de la estructura terciaria, aún con identidades de secuencia que llegan tan solo al 20% en algunos casos.

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

La denominación original que se ha otorgado a las distintas proteínas de esta familia está relacionada con el tejido en el que originariamente fueron encontradas (Tabla 1.1). Los distintos miembros de la familia de las FABP exhiben un patrón determinado de expresión en tejidos, y son especialmente abundantes en aquellos con un alto metabolismo lipídico. Actualmente se sabe que la mayoría de los tejidos expresan varios tipos de FABPs variando solamente en los niveles de expresión (Storch and Thumser 2010). Específicamente, LFABP se expresa en hepatocitos, enterocitos, colonocitos y células de los túbulos proximales del riñón. Por otra parte IFABP se expresa exclusivamente en el intestino. De esta manera se pueden encontrar tipos celulares específicos, como el enterocito, que expresan más de un tipo de FABPs.

Tabla 1.1. Miembros de la familia de las FABP en mamíferos.

Gen	Nombre	Nombre original	Identificada en:	Expresión	Ligandos naturales
<i>fabp1</i>	FABP1	LFABP	Hígado	Hígado, intestino, riñón, pulmón y páncreas	LCFA, acil-CoA, MG, LisoPL, sales biliares y grupo hemo.
<i>fabp2</i>	FABP2	IFABP	Intestino delgado	Intestino delgado	LCFA
<i>fabp3</i>	FABP3	HFABP	Corazón	Músculo esquelético, corazón, cerebro, riñón, pulmón, glándulas adrenales y mamas, testículos, ovarios y estómago	LCFA
<i>fabp4</i>	FABP4	AFABP ó aP2	Tejido adiposo	Tejido adiposo, macrófagos, piel y placenta	LCFA
<i>fabp5</i>	FABP5	EFABP ó KFABP	Piel	Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, corazón, músculo esquelético, retina, intestino, testículos, y riñón	LCFA
<i>fabp6</i>	FABP6	IBABP ó ILBP	Intestino delgado	Ileon, ovario	Sales biliares
<i>fabp7</i>	FABP7	BFABP	Cerebro	Cerebro, células de la glia y retina	LCFA
<i>fabp8</i>	FABP8	MFABP	Células de la vaina de Mielina	Cerebro y células de Schwann, bulbo olfativo, medula espinal	LCFA
<i>fabp9</i>	FABP9	TFABP	Testículo	Testículo, glándula salival y mamaria	LCFA
<i>fabp1<sub>2</sub></i>	-	-	-	Células de retinoblastoma, retina, células germinales de testículo, cortex cerebral, riñón, epidídimo	LCFA

<sup>a</sup> Adaptado de (Storch and Corsico 2008; Furuhashi and Hotamisligil 2008; Smathers and Petersen 2011).

## 1.2. Estructura génica y evolución.

Para la mayoría de las FABP, los genes han sido identificados y caracterizados. Todos ellos presentan una estructura génica muy similar, consistente en cuatro exones interrumpidos por tres intrones que varían su longitud pero presentan una posición similar dentro de la secuencia génica (J. F. Glatz and van der Vusse 1996). El hecho de presentar una estructura génica tan similar sugiere la existencia de un gen ancestral para las FABPs; esta secuencia original habría dado origen a la variedad de FABPs conocidas en la actualidad mediante el proceso de duplicación génica (Hauerland and Spener 2004; Smathers and Petersen 2011). Se ha propuesto que dicho gen ancestral habría surgido luego de la divergencia del grupo animal de aquellos de los hongos y las plantas; alrededor de 1.200-1.000 millones de años atrás, y que el mismo codificaría para una proteína capaz de unir numerosos ligandos hidrofóbicos. A partir de este gen ancestral, las FABPs se habrían diversificado y especializado en su capacidad de unión de ligandos hidrofóbicos específicos, dando lugar a los distintos tipos de FABPs (Schaap, van der Vusse, and Glatz 2002).

Considerando la estructura primaria, los miembros de esta familia muestran un moderado nivel de identidad de secuencia que varía entre un 20% y un 70% para un mismo organismo (Tabla 1.2) (Banaszak et al. 1994). Asimismo, cada tipo de FABP presenta una alta identidad de secuencia aminoacídica con sus ortólogos aislados de otros organismos dentro del grupo de los vertebrados. Por ejemplo, la FABP3 o HFABP (FABP de Corazón) presenta un porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre 85 y 96% al comparar las ortólogas humana, bovina, murina y de rata; mientras que la identidad de secuencia entre FABP3 y FABP1 (LFABP o FABP de Hígado) humanas es tan solo de un 27% (Santomé et al. 1998).



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

	AFABP	MFABP	EFABP	HFABP	IFABP	LFABP
AFABP	100	67	51	64	28	<b>22</b>
MFABP		100	52	58	28	<b>23</b>
EFABP			100	46	23	<b>18</b>
HFABP				100	31	<b>24</b>
IFABP					100	<b>24</b>
LFABP						<b>100</b>

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

El análisis evolutivo de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los miembros de las FABPs de vertebrados ha dado como resultado un árbol filogenético en el cual se distinguen claramente cuatro grupos o *clusters* (Schaap, van der Vusse, and Glatz 2002; Smathers and Petersen 2011). Estos grupos parecen reflejar la especificidad del tipo de ligando que unen los distintos miembros. El primer grupo está constituido por IFABP y LFABP, siendo sus principales ligandos LCFA, sales biliares, colesterol y grupo hemo. El segundo grupo incluye a las CRBP/CRABP y sus ligandos son los derivados de la vitamina A (retinol, ácido retinóico, etc.). El grupo más poblado es el que está compuesto por HFABP, AFABP, BFABP, KFABP, entre otros; y sus ligandos son principalmente LCFA, retinoides y eicosanoides. El último grupo está representado sólo por IFABP, que sólo presenta afinidad por un solo tipo de ligando, LCFA. Además, cabe destacar que la orientación de los FAs es diferente dentro de cada *cluster* (Hamilton 2004).

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

A pesar del amplio rango de identidad de secuencia que se observa entre los distintos miembros de la familia de FABPs, este grupo de proteínas posee una estructura tridimensional muy bien conservada, que resulta ser prácticamente

superponible. La misma consiste en 10 cadenas  $\beta$  antiparalelas (nombradas desde  $\beta A$  hasta  $\beta J$  desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal) y dos  $\alpha$ -hélices cortas que se ubican entre  $\beta A$  y  $\beta B$  (denominadas  $\alpha I$  y  $\alpha II$ ) (Fig. 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 determinando una cavidad central. La unión entre las cadenas  $\beta A$  y  $\beta B$  es el motivo hélice-giro-hélice; el resto de las cadenas presentan giros entre sí. Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un solo dominio con un radio de giro de 14 Å (Banaszak et al. 1994).

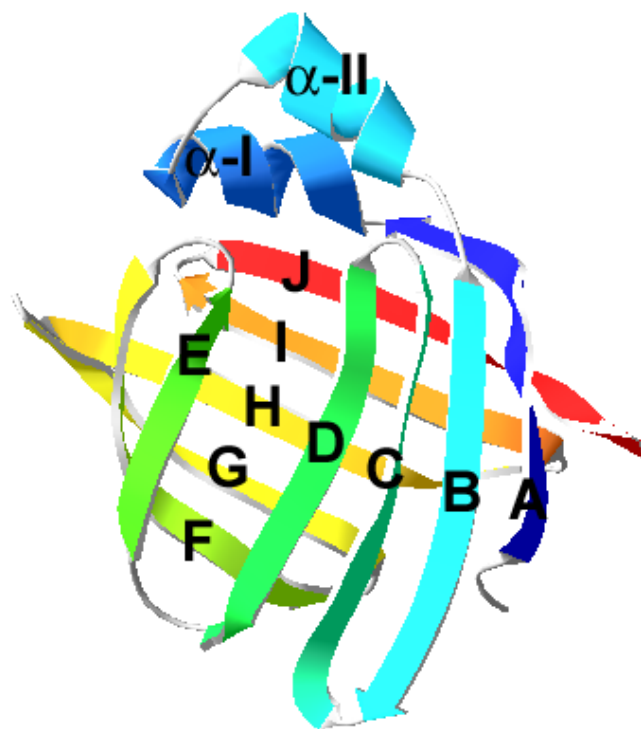


Fig. 1.1. Estructura común de las FABP. Modelo tridimensional de IFABP de rata basado en datos de cristalografía de Rayos-X en su forma holo (código pdb:1ICN). Se indica la nomenclatura de los elementos de estructura secundaria.

La cavidad de estas proteínas es muy inusual porque contiene un gran número de residuos hidrofílicos que se hallan involucrados en distintas redes de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Existe un pequeño núcleo hidrofóbico que se haya desplazado del centro de la proteína. Aunque las secuencias no se conservan, la naturaleza hidrofóbica de los residuos en esta área se mantiene. Esta cavidad es bastante inaccesible para el solvente, cuando se analizan las estructuras

cristalográficas de algunas FABPs, las mismas presentan aperturas por las cuales se podría establecer un intercambio de moléculas de agua; pero ninguno de estos poros parece lo suficientemente grande como para dejar pasar un ácido graso (Banaszak et al. 1994; Thompson et al. 1999; Hamilton 2004).

#### 1.4. La hipótesis del “portal”.

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

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

Sin embargo, estudios recientes *in silico* por Dinámica Molecular han sugerido posibles mecanismos diferentes para la unión de los ligandos a las FABP. Estos proponen puntos de entrada a través de distintas regiones de la estructura de las FABPs. Por ejemplo, se observó que para el caso de AFABP la hendidura entre  $\beta$ D y  $\beta$ E

se abre para permitir la entrada del ligando ácido palmítico (Friedman, Nachliel, and Gutman 2005). Para IFABP se observó que el ligando ácido palmítico se adsorbe inicialmente en la región portal (Friedman, Nachliel, and Gutman 2006). Por otro lado, no se observó entrada del ligando en las simulaciones de multi-nano-segundos cuando se intentó repetir el ensayo para IFABP, incluso orientando el ligando inicialmente cerca del Dominio Portal o de la hendidura del barril- $\beta$  (Friedman, Nachliel, and Gutman 2006).

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

La función del intestino en conjunto con el hígado y el páncreas, es digerir el alimento, reducir los hidratos de carbono, grasas y proteínas a moléculas que puedan ser absorbidas por la mucosa. La grasa proveniente de la dieta es importante para la salud humana, provee una gran fuente de energía calórica así como FAs esenciales y vitaminas liposolubles. Los lípidos presentes en la dieta están constituidos principalmente por triacilglicéridos (TG) y en menor medida por ésteres de colesterol (EC) y fosfolípidos (PL). Los mismos son emulsionados 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 pancreáticas en el entorno acuoso del intestino; generándose por cada TG dos FAs y un *sn*-2-monoacilglicerol (MG). Los ácidos grasos libres de cadena larga son incorporados a las células intestinales mediante difusión pasiva y así como transporte facilitado por proteínas. Los ácidos grasos de cadena larga difunden a través de la membrana a través del “*flip-flop*” de FAs protonados a favor de un gradiente. Los FAs son “atrapados” a través de la unión a FABPs (Storch and Thumser 2010) y/o convertidos a derivados de acil-coA, siendo estos los primeros pasos del transporte dentro de los enterocitos del intestino delgado. El ingreso de FAs a través de la membrana muestra un perfil de transporte facilitado por proteínas. Existe una especificidad por ácidos grasos de cadena larga (mayores a 8 carbonos) así como una constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de transporte en rangos nanomolares (Su and Abumrad 2009). Más aún, trabajos realizados en líneas celulares establecidas de

intestino (como Caco-2) han demostrado una cinética saturable de incorporación de ácidos grasos al citoplasma para ácidos grasos de cadena larga así como para monoacilglicéridos (Murota and Storch 2005; Trotter, Ho, and Storch 1996). Además, el procesamiento de los FAs incorporados en el enterocito es dependiente del sitio de entrada de los mismos, es decir, membrana apical o basal (Storch, Zhou, and Lagakos 2008). Ingresando por la membrana apical, se observó un aumento de hasta 10 veces la relación de formación de TG respecto a PL, mientras que el ingreso basolateral mostró un aumento de tres veces en la oxidación de FAs. Asimismo se observó un aumento en dos veces de la incorporación de FAs en el fosfolípido fosfatidiletanolamina con una disminución aproximada de tres veces en la relación fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina para el ingreso apical respecto al basolateral (Storch, Zhou, and Lagakos 2008). Estos resultados sugieren que las proteínas de membrana en el enterocito facilitarían el transporte y direccionamiento de los FAs a sus destinos metabólicos. Entre los transportadores para LCFA en la membrana del intestino delgado, se han identificado los siguientes: CD36 (Drover et al. 2005; Drover et al. 2008) y FATP4 (Stahl et al. 1999), proteína transportadora de ácidos grasos con actividad de acil-CoA sintetasa.

Los enterocitos pueden resintetizar triacilglicéridos 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 (Gilham et al. 2005). 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 (S.-Y. Ho, Delgado, and Storch 2002). Esta ruta involucra la acilación del glicerol-3-fosfato con ácido graso-CoA para obtener ácido lisofosfatídico; que luego de acilarse y desfosforilarse se transforma en diacilglicerol. La conversión de diacilglicerol a triacilglicerol, catalizado por la diacilglicerol aciltransferasa 1, 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.

Los FAs, sus derivados acil-CoA, monoglicéridos y esteroides son transportados por una red de transportadores y vías metabólicas reguladas que por último proveen los sustratos para la biosíntesis de lípidos complejos y el ensamblaje de lipoproteínas en el enterocito. Estas vías metabólicas se interceptan en el dominio apical del retículo endoplásmico e involucran interacciones cruciales entre la apolipoproteína B (apoB) y MTP (proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos) que facilitan la entrega del complejo lipídico en la vía secretoria. ApoB es la proteína estructural de superficie requerida para la formación de lipoproteínas en el retículo endoplásmico. MTP promueve la biogénesis de lipoproteínas trasladando lípidos neutros desde la bicapa del retículo endoplásmico hacia una molécula apoB aceptora. La biogénesis de las lipoproteínas involucra la maduración y transporte de la vesícula prequilomicroónica desde el retículo endoplásmico hasta los compartimentos del aparato de Golgi y eventualmente la entrega vectorial de la partícula de quilomicroón madura para su secreción en la circulación linfática. Una vez que los pasos iniciales de la formación del quilomicroón están completados, las partículas nacientes prequilomicroónicas intracelulares deben dejar el retículo endoplásmico (C. M. Mansbach and Siddiqi 2010). La maquinaria de proteínas COPII, junto con otras proteínas como LFABP y CD36, promueven la formación de las vesículas prequilomicroónicas desde el retículo endoplásmico para el transporte de su carga destinada a la secreción a través del aparato de Golgi (Neeli et al. 2007).

### **1.6. FABPs del intestino delgado de mamíferos.**

Se considera que la presencia de proteínas que unen lípidos en el intestino es crucial para su gran capacidad de absorción, particularmente porque los niveles de expresión de FABPs son muy altos (Storch and Corsico 2008). En el enterocito intestinal se encuentran presentes dos FABPs, FABP de intestino (IFABP) y de hígado (LFABP), se expresan en gran parte en las células de las vellosidades absorptivas del intestino, pero no en las células de la cripta (Caspary 1992). Además de I- y LFABP, también se expresa IFABP, la cual posee baja afinidad para la unión de FAs, pero une

mayoritariamente ácidos biliares. Si bien la distribución de las mismas se superpone a lo largo de la longitud del intestino delgado, cada una de ellas presenta su máxima expresión en regiones diferentes (Agellon, Toth, and Thomson 2002; Storch and Corsico 2008). En ratones, se detectó ARNm de LFABP en los dos tercios proximales del intestino delgado; mientras que el ARNm correspondiente a IFABP es detectable en toda la longitud del órgano presentando un pico de expresión en la región media. El ARNm de IBABP está presente solamente en la región distal del intestino delgado, correspondiente al íleon (Agellon, Toth, and Thomson 2002). De esta forma, gran parte de los enterocitos coexpresan, de manera abundante, I- y LFABP. Particularmente en humanos, se expresa mayor cantidad de LFABP que IFABP en el intestino (Levy et al. 2009). Se cree que estas proteínas participan en el transporte y procesamiento intracelular de las elevadas cantidades de ácidos grasos absorbidas por el intestino. Pero, hasta la actualidad, se desconoce **por qué un solo tipo de célula contiene dos tipos distintos de FABP.**

### **1.7. Diferencias entre I- y LFABP.**

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

*Distribución tisular.* LFABP se expresa tanto en hígado como en el intestino delgado, riñón, pulmón y páncreas; mientras que IFABP lo hace exclusivamente en el intestino delgado (Nathan M Bass 1985)(Tabla 1.1).

*Diferencias estructurales.* A pesar de que I- y LFABP presentan un bajo nivel de homología de secuencia, correspondiente con un 29% (Banaszak et al. 1994), los elementos de estructura secundaria son básicamente los mismos con la excepción de la presencia en IFABP de una hélice anfipática en el segmento  $\alpha$ I. Además LFABP presenta una región más laxa en el barril por la falta de la malla de puentes de hidrógeno que se forman entre  $\beta$ F y  $\beta$ G. En comparación con el resto de los miembros de la familia el giro- $\beta$  entre  $\beta$ G y  $\beta$ H tiene dos residuos menos. Así, sólo LFABP presenta

una segunda hendidura en el barril- $\beta$  además de la existente entre  $\beta$ D y  $\beta$ E (Thompson et al. 1999).

*Cavidad hidrofóbica.* La cavidad de LFABP es la más grande de la familia y presenta un volumen aproximado de 610 Å<sup>3</sup>. La cavidad de IFABP, por otra parte, es mucho menor presentando un volumen aproximado de 353 Å<sup>3</sup>. Estas diferencias en el volumen de la cavidad pueden ser las responsables de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que unen I- y LFABP.

*Especificidad y afinidad por los distintos ligandos.* LFABP presenta el rango más amplio de ligandos de la familia de las FABPs, puede unir ácidos grasos con muy alta afinidad, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (Thompson et al. 1999). Por el contrario, IFABP es capaz de unir solamente ácidos grasos. Considerando solamente los ácidos grasos, LFABP presenta una estequiometría que le es única en la familia ya que es capaz de unir dos ácidos grasos al mismo tiempo mientras que IFABP sólo puede unir un ácido graso por vez (Fig. 1.2).

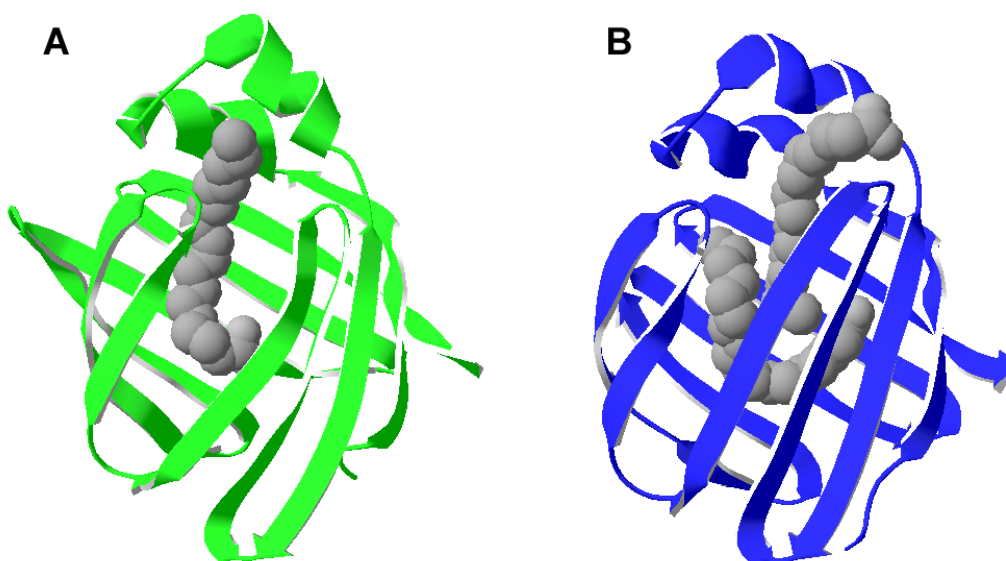


Fig. 1.2. Unión de FAs a FABPs intestinales. Se muestra la diferente orientación del ligando ácido oleico en IFABP (A, verde) y LFABP (B, azul). Se observa que la orientación que presenta el oleato unido a IFABP es distinta a las de ambas moléculas unidas a LFABP. Se distingue bien que el ligando en posición 2 en LFABP está mucho más expuesto al solvente que el de la posición 1. Las estructuras están basadas en la estructura obtenida para cada proteína en sus formas holo (códigos pdb: 1ICN y 1LFO, respectivamente).



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

### **1.8. Funciones biológicas de I- y LFABP.**

A pesar de la abundante información sobre su estructura, distribución tisular y propiedades de unión, aún no está claro cuáles son las funciones que estas proteínas desempeñan *in vivo*. En los últimos años se han propuesto una serie de funciones para las FABPs (J. F. Glatz and van der Vusse 1996; Haunerland and Spener 2004; Furuhashi and Hotamisligil 2008), algunas de las mismas se enumeran a continuación:

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

- Protección contra los efectos nocivos provocados por grandes concentraciones de ácidos grasos de cadena larga libres en el citoplasma celular y funcionando como un antioxidante.

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

### **1.9. Estudios funcionales *in vitro*.**

*Ensayos de transferencia de energía de resonancia.* Se utilizó un ensayo de transferencias de energía de resonancia Förster (FRET, del inglés *F*örster *R*esonance *E*nergy *T*ransfer) donde se monitorea directamente la transferencia de antioiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA, de *A*nthroyl*Q*xy-*F*atty *A*cids) (análogos fluorescentes de los ligandos naturales) desde las FABPs hacia membranas unilamelares pequeñas (SUV, de *S*mall *U*nilamellar *V*esicles), que contienen NBD-PC como aceptor FRET (Storch and Kleinfeld 1986). Estos estudios han permitido caracterizar gran parte de los miembros de la familia de las FABPs en cuanto a sus propiedades de transferencia de ligandos, definiendo dos subgrupos dentro de la familia de las FABPs. Por un lado se reconocen las proteínas “difusionales” como la LFABP, LbFABP o CRABP II, ya que muestran un mecanismo de transferencia de ligandos cuyo paso limitante parece ser la disociación del ligando hacia el medio acuoso. Por otro lado, el resto de las FABPs presenta un comportamiento de tipo “colisional”, ya que en este caso, el paso limitante sería la interacción del complejo proteína/ligando con la membrana aceptora.

El análisis comparativo entre IFABP y LFABP ha permitido detectar marcadas diferencias entre estas proteínas. En principio, la velocidad absoluta de transferencia del AOFA hacia membranas modelo es mayor desde IFABP que desde LFABP. Más aún, el mecanismo aparente de transferencia de FAs en estas dos proteínas es diferente. Mientras que la transferencia de FAs desde IFABP pareciera ocurrir mediante la colisión directa del complejo proteína-ligando con la bicapa fosfolipídica, la transferencia desde LFABP estaría de acuerdo con un mecanismo mediado por la difusión acuosa del ligando hacia la membrana (Hsu and Storch 1996; Storch and Thumser 2000). Estos resultados apoyan la idea de que estas dos FABP podrían estar

desempeñando funciones diferentes dentro del enterocito, regulando el transporte de los FAs y, por ende, su utilización. La primera idea es que LFABP podría estar funcionando como un buffer citosólico de la concentración de FAs libres, mientras que IFABP podría estar involucrada en el transporte vectorial de los FAs desde y hacia estructuras subcelulares o vías metabólicas específicas.

*Interacción de IFABP con membranas.* Utilizando una variante de IFABP que carece de región alfa-helicoidal (HL-IFABP) (Kim, Cistola, and Frieden 1996), se ha demostrado la importancia crítica del dominio  $\alpha$ -helicoidal en la interacción de IFABP con membranas y en su mecanismo de transferencia de ácidos grasos (Corsico et al. 1998; Wu et al. 2001). Además, la construcción de proteínas quiméricas en las que se intercambiaron las porciones N-terminal ( $\beta$ A y  $\alpha$ -I o el motivo hélice-giro-hélice completo) entre I- y LFABP, ha permitido corroborar que el dominio  $\alpha$ -helicoidal de ambas FABPs es responsable del mecanismo característico de transferencia de ligandos respectivo (Córscico, Liou, and Storch 2004; Franchini, Storch, and Corsico 2008).

Asimismo, se ha comprobado que la interacción de IFABP con membranas durante la transferencia de ligandos tiene un fuerte componente electrostático, que se ve intensificado cuando se emplean vesículas aceptoras con carga neta negativa, debido a la incorporación de fosfatidilserina (PS, de sus siglas en inglés *Phosphatidyl-Serine*) o cardiolipina (CL) en las vesículas zwitteriónicas de referencia de fosfatidilcolina (PC) (Hsu and Storch 1996; A. E. A. Thumser and Storch 2000). Esto nos indujo a pensar que las cargas positivas en la superficie de la proteína serían relevantes para el mecanismo de transferencia colisional de IFABP. De hecho, la acetilación completa de los residuos de Lisina (Lys o K) ha permitido corroborar esta hipótesis y ha sugerido que las interacciones hidrofóbicas tendrían su participación junto con las electrostáticas, posiblemente debido a la intervención de residuos superficiales no polares expuestos al solvente en la hélice  $\alpha$ -II o a la naturaleza anfipática de la hélice  $\alpha$ -I (Córscico et al. 2005). La sustitución de los residuos de Lys de la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP nos ha permitido demostrar la gran importancia que tienen las  $\alpha$ -hélices, principalmente la  $\alpha$ -II, en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre la proteína y membranas fosfolipídicas. La neutralización o reversión de carga del dominio  $\alpha$ -helicoidal por sustitución de sus residuos de Lys por Ile o Glu,

respectivamente, ocasiona un gran decaimiento en la velocidad de transferencia de los AOFAs hacia membranas zwitteriónicas, efecto que se ve magnificado cuando se sustituye el residuo Lys27 de la hélice  $\alpha$ -II. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la región portal sufriría un cambio conformacional durante la interacción proteína-membrana, lo que conduciría a la liberación del ácido graso unido y que la hélice  $\alpha$ -II es de particular importancia en establecer interacciones electrostáticas entre la IFABP y la bicapa lipídica (Falomir-Lockhart et al. 2006).

En nuestro laboratorio se han empleado una serie de ensayos que permiten analizar, aunque de una manera indirecta, la posible interacción de las FABPs con membranas. Estos estudios han demostrado que tanto IFABP como LFABP interactuarían con membranas fosfolipídicas, a pesar de presentar mecanismos diferentes de transferencia de ligandos hacia membranas (Falomir-Lockhart et al. 2011). Más aún, estudios realizados *in silico* han hipotetizado que la interacción física previamente observada entre LFABP y membranas se estaría dando con una orientación tal que el fondo del barril  $\beta$  es el que interacciona directamente con la membrana (Zamarreño et al. 2012).

#### **1.10. Estudios a nivel celular.**

Es inusual que un tipo celular exprese proteínas diferentes con funciones idénticas; por este motivo se considera que I- y LFABP tendrían distintos roles en el metabolismo lipídico intestinal. En el intestino, los productos de hidrólisis de los TG dietarios ingresan desde el lumen a través de la membrana apical a la célula, mientras que los lípidos endógenos presentes en el torrente sanguíneo ingresan a través de la membrana basolateral (Porter, Trevaskis, and Charman 2007). El sitio de entrada de los FAs al enterocito impacta sobre su destino metabólico: los FAs que ingresan del lado apical son dirigidos a la síntesis de TG y quilomicrones; los FAs ingresados basolateralmente suelen ser incorporados como PL a la mucosa u oxidados como fuente de energía (Mansbach and Dowell 1992; Storch, Zhou, and Lagakos 2008). Se han examinado los roles de I- y LFABP en el direccionamiento de FAs suministrados apical o basolateralmente en enterocitos. Usando un sistema de explantos intestinales, se observó que LFABP une más FAs que IFABP, independientemente del sitio de

entrada. Es posible que la estequiometría de unión de LFABP, 2 FAs por proteína, sea la responsable de estas observaciones. Interesantemente, IFABP unió mayor cantidad de FAs luego de la administración apical, sugiriendo que esta proteína estaría involucrada principalmente en el transporte de FAs dietarios (Alpers et al. 2000). Asimismo se observó que ambas FABPs se encontraban localizadas en el lado apical de los enterocitos en ratas en estado de ayuno, pero estas proteínas se encontraban distribuidas en todo el citoplasma en ratas en el estado alimentado (Alpers et al. 2000). Otro estudio mostró que tanto fibroblastos transfectados con I- o LFABP tenían un aumento en la incorporación de [<sup>3</sup>H]ácido oleico en TG relativo a las células control. Las células conteniendo LFABP mostraron mayor incorporación de marca radioactiva en PL; sin embargo, las células expresando IFABP mostraron mayor recuperación de marca en la fracción de lípidos neutros (Prows, Murphy, and Schroeder 1995). Un rol importante para las FABPs en el enterocito puede ser la regulación de los niveles intracelulares de FAs no unidos (Hauerland and Spener 2004; Martin et al. 2006). Los enterocitos intestinales poseen abundantes cantidades de FAs provenientes de la dieta, y se sabe que altos niveles de FAs libres pueden ser tóxicos para la célula. Se ha propuesto que las FABPs funcionan de modo protector uniendo el exceso de FAs en la célula (Atshaves et al. 2010). De este modo, las FABPs serían importantes para mantener concentraciones de FA libre que se encuentren dentro del rango funcional de enzimas o receptores. Las FABPs intestinales podrían funcionar manteniendo un pool estable de FAs y MGs, permitiendo que exista disponibilidad para la regulación de la síntesis de TG y PL, la biogénesis de quilomicrones, así como señalización celular. En soporte de este rol, la expresión de las FABPs intestinales se ha visto regulada positivamente durante un estado alimentado alto en grasas, probablemente en respuesta a una mayor cantidad de FAs ingresando a través del enterocito (Malewiak et al. 1988; Bass 1990). Se ha demostrado que LFABP es capaz de unir ácidos grasos y acil CoAs (De Gerónimo et al. 2010). I- y LFABP podrían participar en la unión y/o direccionamiento de la gran cantidad de FAs en el citosol, los cuales ingresan desde la luz intestinal en el estado alimentado, de modo de evitar el exceso de FAs libres en el citosol y mantener niveles homeostáticos de la concentración de FAs libres. Para el caso de LFABP, mantener los niveles de MG no unido también podría ser una función importante.

Las FABPs expresadas en el enterocito también podrían funcionar a través de interacciones específicas proteína-proteína, con el fin de entregar sus ligandos hacia los blancos, incluyendo enzimas y factores de transcripción.

La coexpresión en el enterocito, además de las evidencias en cuanto a diferencias en la regulación transcripcional, especificidad de unión a ligandos y mecanismo de transferencia del ligando, todo esto sugiere que I- y LFABP poseerían roles distintos en el intestino. Sin embargo, sus funciones no están claramente comprendidas. Se han realizado estudios *in vivo* usando ratones nulos para IFABP y LFABP con el fin de analizar las consecuencias de la eliminación de una u otra proteína, y por ende dilucidar sus funciones.

### **1.11. Estudios *in vivo*.**

Dos laboratorios han generado, de modo independiente, modelos de ratones C57BL/6 nulos para LFABP (Newberry et al. 2003; Martin, Danneberg, et al. 2003). Ambos laboratorios han demostrado que los ratones nulos para LFABP (LFABP<sup>-/-</sup>) poseen defectos en la oxidación hepática de FAs, disminución de la captación de FAs así como una capacidad de unión de FAs reducida por parte de los hepatocitos, y menor secreción de VLDL (Newberry et al. 2003; Erol et al. 2003; Newberry et al. 2010). Sin embargo se han reportado diferencias respecto al peso corporal de los animales. . La ablación del gen que codifica para LFABP en ratones obtenidos por Newberry et al no ha dado como resultado alteraciones de apariencia, morfología, viabilidad u otras modificaciones fenotípicas sustanciales en estos animales respecto a las cepas salvajes, a menos que se sometan a situaciones de stress como ayuno prolongado. Mientras que los ratones obtenidos por el grupo de Martin et al alimentados con una dieta normal *ad libitum* muestran un aumento de peso. Los diferentes resultados obtenidos con las dos líneas de ratones LFABP<sup>-/-</sup> podrían deberse a los distintos métodos utilizados para la ablación del gen, los protocolos dietarios, efectos ambientales provenientes de las instalaciones donde se encuentran los animales, tales como la microbiota intestinal presente.

En el caso de los ratones nulos para IFABP (IFABP<sup>-/-</sup>), se demostró claramente que IFABP no es esencial para la absorción de los lípidos de la dieta (Lagakos et al.

2011; 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. La pérdida de IFABP lleva a un aumento moderado 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.

Con el fin de evidenciar si existían cambios más profundos en los fenotipos de los ratones nulos, el grupo de la Dra. Storch utilizó ratones LFABP<sup>-/-</sup> obtenidos por Martin et al y ratones IFABP<sup>-/-</sup>, los cuales fueron sometidos a dietas altas en grasas, conteniendo gran cantidad de LCFA, saturados o insaturados (Gajda et al. 2013). Los ratones LFABP<sup>-/-</sup> ganaron más peso y grasa que los ratones normales, mientras que los ratones IFABP<sup>-/-</sup> eran esbeltos, con menor peso corporal y menor grasa que los ratones normales (Gajda et al. 2013). Los ratones LFABP<sup>-/-</sup> mostraron un coeficiente respiratorio menor, sugiriendo que estos animales oxidan grasa como fuente preferencial de energía. Por el contrario, los animales IFABP<sup>-/-</sup> mostraron coeficientes respiratorios más altos, evidenciando un consumo preferencial de carbohidratos como fuente de energía. Los lípidos en la materia fecal de los ratones LFABP<sup>-/-</sup>, IFABP<sup>-/-</sup> o normales no mostraron diferencias, hecho que confirma que no existe malabsorción en estos modelos (Gajda et al. 2013).

También se observó que los ratones LFABP<sup>-/-</sup> consumían más calorías que los ratones normales al ser alimentados con dietas altas en LCFA. Recientemente se ha demostrado que las FABPs pueden transportar AEA (N-araquidonoiletanolamina) (Kaczocha, Glaser, and Deutsch 2009), un endocanabinoide que es ligando del receptor CB1 (Kaczocha, Glaser, and Deutsch 2009). La unión de AEA al receptor CB1 causa un aumento en la ingesta de comida; interesantemente, se encontraron niveles altos de AEA en la mucosa de los ratones LFABP<sup>-/-</sup> (Gajda et al. 2013). Adicionalmente, se encontraron niveles elevados de 2-AG (2-araquidonilglicérido) en los ratones LFABP<sup>-/-</sup>, un MG que es un endocanabinoide endógeno que se une a receptores cannabinoides y

también promueve el aumento de ingesta de alimentos (Stella, Schweitzer, and Piomelli 1997). Recientemente se ha demostrado que LFABP une MG (Lagakos et al. 2013). Aunque los roles de los endocannabinoides intestinales en la regulación de la ingesta de alimentos no están del todo claros, estas observaciones sugieren que LFABP podría participar en la regulación de estos lípidos señalizadores para mantener la homeostasis energética en el cuerpo (Chon et al. 2012).

En los ratones IFABP<sup>-/-</sup> alimentados con dieta alta en grasas, se observó una disminución en la incorporación de FA radioactivo en TG relativo a PL en la mucosa intestinal, mientras que los ratones LFABP<sup>-/-</sup> mostraron menor incorporación de MG radioactivo en TG relativo a PL (Gajda et al. 2013), como se había observado con dieta normal (Lagakos et al. 2011). Estos resultados demuestran la importancia de IFABP en el tráfico de FAs hacia TG, y de LFABP en el tráfico de MGs en el enterocito. A su vez los ratones LFABP<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta alta en grasas mostraron reducción en la oxidación de FAs en el intestino (Gajda et al. 2013), también de acuerdo con los resultados previamente expuestos. Interesantemente, estos cambios en el metabolismo de los ratones IFABP<sup>-/-</sup> y LFABP<sup>-/-</sup> no fueron acompañados por diferencias notables en la expresión de enzimas clave involucradas en el metabolismo lipídico intestinal, sugiriendo que en el intestino, estas alteraciones son resultado de defectos en el tráfico y/o direccionamiento de los ligandos.

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



La Fig. 1.3 resume las funciones de I- y LFABP en el enterocito.

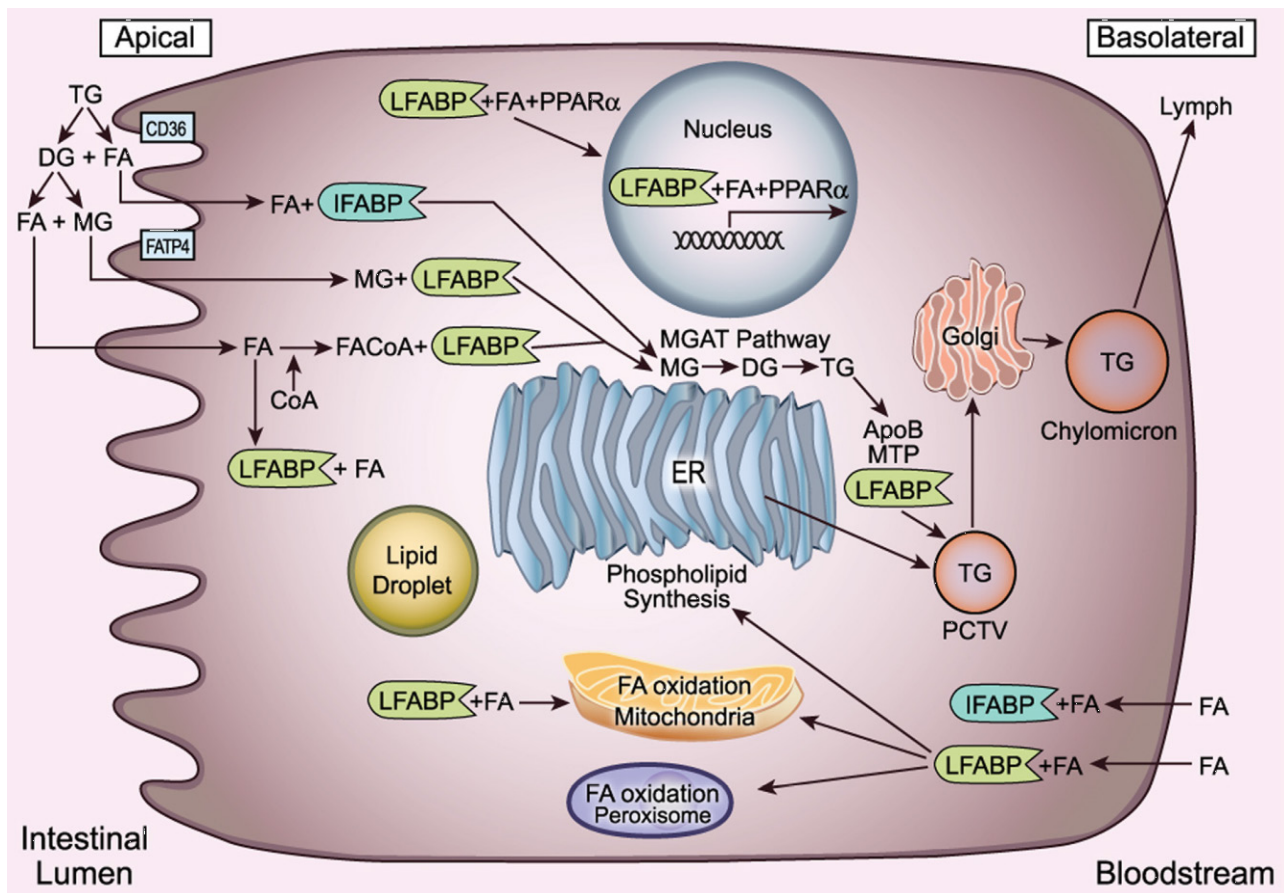


Fig. 1.3. Tomada de (Gajda and Storch 2015). Funciones de I- y LFABP en el enterocito intestinal. En la luz intestinal, los TG de la dieta son hidrolizados por lipasas en diacilglicéridos (DGs) y FAs; los DGs son hidrolizados a MGs y FAs. Los FAs y MGs son transportados a través de la membrana apical por difusión o transporte facilitado por CD36 o FATP4. En el citosol, IFABP une específicamente los FAs, mientras que LFABP une los FAs, acil-CoAs y MGs. En el retículo endoplásmico (ER), los FAs y MGs son resintetizados para dar lugar a los TG. LFABP es parte de un complejo junto con MTP, CD39 y ApoB48, el cual es responsable de la movilización y transporte de la vesícula prequilomicronica (PCTV) desde el ER. La PCTV llega al aparato de Golgi donde se forman los quilomicrones maduros. Los quilomicrones dejan el enterocito a través de la cara basolateral hacia el sistema linfático. LFABP también puede entregar los FAs a PPAR $\alpha$  (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) en el núcleo, promoviendo la expresión de genes oxidativos. Los FAs y MGs de la circulación ingresan al enterocito a través de la membrana basolateral donde pueden unirse a I- o LFABP. Los lípidos derivados del torrente sanguíneo son direccionados a su oxidación o incorporación en PL.

### 1.12. Polimorfismos de las FABPs con consecuencias en la salud humana.

No se han reportado casos humanos de delección completa del gen de LFABP. Recientemente, se ha observado que una sustitución de alanina por treonina en la posición 94 (T94A) de LFABP está asociada con un aumento de TG y FAs libres plasmáticos (Brouillette et al. 2004; Fisher et al. 2007). Interesantemente, los sujetos humanos portadores del alelo A94 de LFABP poseen una respuesta disminuida en los niveles plasmáticos de TG cuando son tratados con fenofibrato comparados con las personas que portan la LFABP normal. El fenofibrato es un activador de PPAR $\alpha$  (del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), se hipotetiza que la variante de LFABP T94A no es capaz de entregar el fenofibrato a PPAR $\alpha$  (Brouillette et al. 2004). Los hepatocitos humanos que expresan la forma A94 de LFABP muestran una reducción en los genes regulados por PPAR $\alpha$  en respuesta a fenofibrato (Martin et al. 2013), aportando más evidencia que apoya la participación de LFABP en las vías lipídicas metabólicas mediadas por PPAR $\alpha$ .

No se han reportado casos humanos de delección completa del gen de IFABP; sin embargo se ha identificado un polimorfismo en el cual la treonina es sustituida por alanina en el aminoácido 54 (A54T) (Baier et al. 1995). Esta sustitución resulta en un aumento de afinidad por FAs en comparación con la proteína nativa (Pratley et al. 2002; Baier et al. 1995). Los individuos que expresan la variante con treonina muestran resistencia a la insulina y altos niveles de TG plasmáticos, con alta prevalencia de diabetes. La población aborígen Pima de los EEUU presenta una alta proporción de individuos con esta sustitución. Este hallazgo sugiere que IFABP participaría en la absorción y metabolización de los ácidos grasos en el intestino.

# **Materiales y métodos.**

## **2.1. Protocolos de Biología Molecular.**

### **2.1.1. Minipreparación de Plásmidos.**

Con el objetivo de analizar, amplificar y modificar las secuencias de ADN (ácido desoxiribonucleico) con las que se trabajó a lo largo de esta tesis doctoral, fue necesario tener una fuente madre fácilmente manipulable. Las secuencias de ADNc (ADN complementario) de las proteínas empleadas fueron cedidas por otros laboratorios en forma de vectores con los distintos insertos, o modificadas por el nuestro para obtener las variantes estructurales de interés. Para trabajar con estas secuencias, se utilizó la técnica de minipreparación de plásmidos.

La obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias de *E. coli* se realizó siguiendo el protocolo que figura en el manual de laboratorio de Sambrook & Russell (Sambrook and Russell 2001). Se cosecharon 5 ml de cultivo bacteriano fresco en medio LB (Luria Bertani) con el correspondiente antibiótico (crecido toda la noche a 37°C y con agitación) en un tubo eppendorf de 1.5 ml centrifugándolo a 12000 rpm durante 1-2 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet de bacterias se resuspendió con 100 µl de una solución 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8, agitando en vórtex. La lisis alcalina se realizó adicionando 200 µl de una solución de 0.2 M NaOH y 1% SDS recientemente preparada, agitando suavemente por inversión hasta la disolución del pellet, e incubando a temperatura ambiente por no más de 5 minutos. La lisis se finaliza por neutralización adicionando 150 µl de una solución 5 M de acetato de potasio y 11,5% v/v ácido acético, enfriada en hielo. Nuevamente se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Es importante no agitar vigorosamente ni vortexear en éstos últimos pasos para evitar que se fragmente el ADN cromosómico que podría contaminar la muestra. La muestra se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

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

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

El pellet se disuelve en 20-50  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril, se agrega ARNasa en una concentración aproximada de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración de ADN plasmídico purificado se midió usando un Nanodrop Thermo por absorbancia a 260/280 nm, para evaluar su grado de pureza. La presencia de plásmido con inserto se evidencia mediante una digestión con las enzimas de restricción correspondientes seguida de una electroforesis en gel de agarosa.

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

Para analizar los plásmidos, vectores y construcciones empleadas a lo largo de este trabajo de tesis se recurrió al corte con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son herramientas útiles debido a su alta especificidad y a que generan terminales ligables de fragmentos de ADN. Esto permite el corte de ADN plasmídico en lugares específicos para su posterior manipulación o análisis. Las digestiones fueron realizadas según el mismo protocolo básico y empleando un buffer adecuado en el cual la combinación de enzimas empleadas en la mezcla tenga una actividad igual o mayor al 75%. Para un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  de reacción, 1 a 5  $\mu\text{l}$  de ADN (0.5-1.0  $\mu\text{g}$ ) se mezclaron con 1  $\mu\text{l}$  Buffer 10X provisto junto con las enzimas a utilizar; 0.1  $\mu\text{l}$  BSA (albúmina bovina sérica); 0.5  $\mu\text{l}$  de cada enzima de restricción y  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril necesaria para completar el volumen. Las muestras se incubaron al menos 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1.3. Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica útil para separar fragmentos de ácidos nucleicos, ADN o ARN (ácido ribonucleico), de distinto tamaño. La aplicación de un campo eléctrico induce el desplazamiento de las moléculas, cargadas negativamente, a través de la trama del gel de agarosa. Los fragmentos de ADN o ARN se separan en base a su peso molecular, es decir, tamaño o número de bases; a medida que se desplazan del cátodo al ánodo. Esta técnica fue utilizada en el análisis de digestiones de vectores. El protocolo consiste en preparar una solución de agarosa con un porcentaje adecuado como para resolver el/los fragmentos de interés. En el caso de los plásmidos linealizados se emplean geles de 1% de agarosa. La solución se preparó en buffer 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8 y se le agregó 1  $\mu$ l de Cyber Safe (Invitrogen) para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador ultravioleta.

### 2.1.4. Construcción del vector anti-ARNm hLFABP.

El plásmido empleado para obtener la línea de células Caco-2 con la expresión disminuída de la LFABP humana (hLFABP), se construyó usando el vector pcDNA3.1-Neo(+), un plásmido optimizado para la expresión de ARNm (ARN mensajero) en células eucariotas. Tiene una longitud de 5.4 kb y 6.0 kb una vez ligado el inserto con la secuencia del ADNc de hLFABP. El vector contiene el origen de replicación ColE1, que le permite ser replicado en bacterias *E. coli*, junto con el gen de selección *amp<sup>r</sup>* que confiere resistencia a Ampicilina, por lo que las bacterias satisfactoriamente transformadas pueden ser seleccionadas en un medio selectivo conteniendo este antibiótico. La presencia del inserto se confirmó por secuenciamiento empleando *primers* específicos que reconocen las secuencias de los promotores T7 y SP6, en ambos extremos del sitio de clonación múltiple, y que también sirven para su transcripción *in vitro*. La transcripción en células eucariotas es posible gracias a la presencia del promotor de citomegalovirus humano (CMV) “río arriba” del sitio de clonación múltiple. Antes del sitio de terminación de la transcripción también se incluye en el ARN resultante una secuencia de poliadenilación derivada del gen de la

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

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

#### **2.1.5. Obtención de células competentes.**

Para amplificar los ADN plasmídicos y para expresar las proteínas recombinantes es necesario incorporar los vectores dentro de la cepa apropiada de *Escherichia coli*. Este protocolo permite generar y almacenar bacterias competentes para su transformación posterior con ADN plasmídico, tanto de las cepas de *E.coli* JM109, XL1Blue o BL21 (DE3). Brevemente, se inoculan 3 ml de medio de cultivo líquido LB sin antibiótico con un stock de bacterias no competentes recién descongeladas. Se incuba el cultivo toda la noche a 37°C, con agitación fuerte y se diluye a la mañana siguiente en 100 ml de medio LB fresco sin antibiótico. La incubación debe mantenerse hasta alcanzar una Densidad Óptica ( $DO_{600nm}$ ) de 0.5. Una vez que el cultivo llega a la concentración deseada, se lo deja enfriar sobre hielo

durante aproximadamente 15 minutos. Se centrifugan las bacterias a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C en tubos tipo falcon de 50 ml estériles y se descarta el sobrenadante. El pellet de bacterias se resuspende en 30 ml de buffer TFB1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato de potasio, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glicerol, pH 5.8; esterilizado por filtración), se incuba sobre hielo durante 90 minutos y se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 4 ml de buffer TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glicerol, pH 8; esterilizado en autoclave). Las bacterias se alicuotan de a 200 µl, pueden ser empleadas en el momento o ser almacenadas a -70°C en un ultrafreezer.

### **2.1.6. Transformación de bacterias competentes.**

La incorporación de ADN plasmídico en el citoplasma bacteriano se logra gracias a que las células bacterianas han sido pretratadas, como se indicó en la sección anterior. La cepa JM109 tanto como la cepa XL1Blue son ideales para el trabajo de Biología Molecular ya que pueden hospedar cómodamente y en alta concentración vectores multicopia, como los de la serie del Sistema pET, a la vez que carecen de la T7 RNAPol necesaria para la expresión de las proteínas recombinantes. En cambio, la cepa BL21 (DE3) brinda doble control para la expresión de proteínas recombinantes cuando están bajo regulación del Promotor LacZ.

El protocolo es equivalente para cualquier cepa que se desea transformar. Brevemente, se toman 50 ng de plásmido en no más de 10 µl de la mezcla de reacción de ligazón y se depositan en un eppendorf de 1.5 ml en un baño de hielo. Luego se le agregan 100 µl del stock de bacterias competentes, se mezcla por pipeteo; se incuban en hielo durante 30 minutos. Luego se aplica un shock térmico colocando el tubo en un baño termostatzado a 42°C durante 45 segundos, seguido de dos minutos de incubación en hielo. Es necesario dar un tiempo para que comiencen a expresarse los marcadores de selección. Para ello se agregan 900 µl de medio LB sin antibiótico y se incuba con agitación fuerte durante 90 min a 37°C. La selección se realiza creciendo colonias aisladas en un medio sólido que contenga el agente de selección. Por lo tanto se toman al menos dos alícuotas de distinto tamaño del cultivo y se distribuyen con ayuda de una espátula de Drigalsky (esterilizada por incineración a la llama con alcohol



70%) sobre placas de medio LB con agar 1.5% (LB-agar) conteniendo el antibiótico correspondiente, dependiente del vector que se usó para la transformación. Se realiza un control transformando 100 µl de bacterias competentes con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y siguiendo el protocolo previamente detallado. Una alícuota del cultivo control se siembra en una placa LB-agar conteniendo el antibiótico correspondiente al vector que se usó, siendo este el *control negativo*, donde no se espera crecimiento. Otra alícuota del cultivo control se siembra en una placa LB-agar sin antibiótico, siendo este el *control de viabilidad* de las bacterias competentes utilizadas, donde se espera crecimiento bacteriano. Las placas se incuban toda la noche invertidas en estufa a 37°C. Al día siguiente se seleccionan varias colonias repicándolas en 5 ml de medio fresco LB con el antibiótico adecuado y se dejan crecer toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, se prepara un stock de glicerol para guardar (500 µl cultivo + 500 µl medio fresco con glicerol 20%) y se constata la presencia del plásmido mediante una minipreparación y corte con enzimas de restricción. Los stocks de glicerol de las bacterias transformadas se almacenan a -70°C en un ultrafreezer.

Los antibióticos empleados más comunes son Ampicilina en una concentración 100 µg/µl, 170 µg/µl Cloranfenicol y 50 µg/µl Kanamicina.

## **2.2. Protocolos de Bioquímica.**

### **2.2.1. Screening de expresión de proteínas recombinantes.**

El primer paso en la obtención de proteínas recombinantes es contar con una cepa bacteriana que la produzca en gran cantidad, BL21 (DE3), y para eso se seleccionan de un agar LB varias colonias de *E.coli* transformadas con los plásmidos de expresión con el ADNc de las proteínas recombinantes. Las colonias se repican en 3 ml de medio líquido con el antibiótico de selección, en el caso de los plásmidos de la serie pET11 utilizados Ampicilina (100 µg/ml) y se deja creciendo toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente, se preparan glicerol-stocks, como se indicó anteriormente, y se diluyen 500 µl a 5 ml de medio fresco con antibiótico. El cultivo se deja crecer por 2 horas en las mismas condiciones que antes, se le agrega el inductor, isopropil-tiogalactósido (IPTG) para aquellas proteínas expresadas en vectores tipo pET11 o ácido nalidíxico en el caso de IFABP-HL expresada en el vector pMON, en una concentración final de 0.4 mM y 0.1 mM respectivamente, y se deja actuar durante 2 horas. Luego las células se cosechan por centrifugación 5 minutos a 7000 rpm y se resuspenden en buffer TEK (10 mM tris, 1 mM EDTA, 100 mM KCl pH 7.4). Una alícuota de 200 µl se mezcla con 200 µl de buffer muestra 2X para SDS-PAGE y se incuba 5 minutos a 100°C. Una alícuota de 20 µl de las muestras se siembra en un gel de SDS-PAGE y se analiza la presencia de una banda prominente dentro del patrón de bandas de la bacteria a la altura esperada para la proteína recombinante.

### **2.2.2. Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.**

La electroforesis de proteínas es una técnica que se emplea para analizar una mezcla de proteínas compleja o para caracterizar una proteína. Debido a que las proteínas poseen coeficientes electroforéticos muy variados y que dependen de la conformación así como del pH del buffer en el que se encuentra, es fundamental fijar algunas variables para poder realizar comparaciones. Se fija el pH del gel y de los buffer de corrida; y se recurre a un agente desnaturizante que permite desplegar los péptidos de forma que la conformación de cada proteína no influya en la corrida. En la

mayoría de los casos la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método glicina-SDS-PAGE de Laemmli (Laemmli 1970), en la cual el agregado de SDS permite tanto desnaturalizar las muestras como dotarlas de una relación carga/masa prácticamente uniforme y, de este modo, se logra una separación en base al tamaño molecular de los péptidos. Las muestras son incubadas, en el “buffer muestra”, durante 5 minutos a 100°C antes de la siembra. El agregado de  $\beta$ -mercaptoetanol en el buffer muestra permite romper los enlaces disulfuro. Junto con las muestras se siembra también un Standard de Peso Molecular como referencia. Se empleó el *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare), que tiene bandas de proteínas de los siguientes tamaños: 97, 66, 45, 30, 20.1 y 14.4 kDa.

Se emplearon geles en una concentración de 15% acrilamida 0.4% bisacrilamida, que permite resolver péptidos de hasta 10-12k Da. Los mismos se forman en dos pasos. Primero se forma el gel de 15% acrilamida donde se resuelven las proteínas y que tiene un espesor de 0.75 ó 1 mm, unos 6 cm de alto y 8 cm de largo. Luego de su gelificación, se forma sobre el anterior el gel de “apilamiento” o *stacking*, un gel con menor contenido de acrilamida (3.9% acrilamida 0.1% bisacrilamida), en el cual, por los cambios de pH se produce la pérdida de electrolitos que logra concentrar la muestra en una banda concentrada de unos pocos mm de espesor. Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (Bio-Rad) y se corrieron generalmente en dos tiempos: 30 minutos a 100 V, para que se concentre la muestra en el gel *stacking*, y 60-90 minutos a 200 V, hasta que el frente de corrida llega a pocos milímetros del borde inferior del gel.

La tinción de los geles se realizó en una solución 0.1 % Coomassie Blue R-250 en H<sub>2</sub>O:metanol:acético (5:5:2). La decoloración se efectuó con una solución acuosa con 10% ácido acético 30% etanol. Los geles fueron digitalizados usando el equipo Image Quant (GE Healthcare) y analizados por densitometría con ImageJ (NIH). Los pesos moleculares de las bandas se estima por comparación con las bandas del Standard incluido en la corrida electroforética.

### **2.2.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.**

La purificación de una proteína puede realizarse por varios métodos. Por lo general se recurre a una serie de pasos que van enriqueciendo la muestra en nuestra proteína de interés. A lo largo de la purificación es necesario poseer algún método para reconocer la presencia de nuestra proteína. Como ya se mencionó anteriormente, las FABPs tienen la característica de que no poseen una actividad enzimática que pueda medirse, por lo que el seguimiento debe realizarse por la única capacidad que tienen bien determinada, la unión de compuestos hidrofóbicos.

#### **2.2.3.1. Expresión y purificación de las FABP nativas y mutantes puntuales.**

La purificación de las proteínas nativas y mutantes se realizó con un protocolo adaptado del método descrito por Hsu et al. (Hsu and Storch 1996). El protocolo consiste en crecer 20 ml medio líquido LB con Ampicilina (100 µg/ml) con *E.coli* BL21(DE3) transformadas con pET11-“FABP” durante toda la noche a 37°C con agitación. A la mañana siguiente, el cultivo es repartido en 10 frascos erlenmeyer (1000 ml de capacidad cada uno), conteniendo cada uno 100 ml de medio fresco e incubado hasta que alcance una  $DO_{600nm}$  entre 0.6 y 1. En ese instante, la expresión de la proteína es inducida por el agregado de IPTG desde una solución madre 1000X (concentración final: 0.4 mM). Las bacterias se incuban unas 3 horas más con agitación a 37°C y se cosechan por centrifugación 5 minutos a 7000 rpm en una centrifuga refrigerada. En este punto las bacterias pueden ser almacenadas a -70°C para ser procesadas más adelante.

El pellet de bacterias se resuspende en buffer TEK hipotónico (10 mM Tris, 1 mM EDTA y 40 mM KCl) y se lisan en un sonicador de punta Branson en un baño de agua-hielo. Los restos de pared celular y complejos supramacromoleculares se descartan centrifugando la muestra a 20000 rpm durante 45 minutos en una ultracentrífuga (Beckmann). El sobrenadante se colecta con cuidado y se somete a una primera etapa de purificación incubándolo por el agregado de medio volumen de una solución sobresaturada de  $(NH_4)_2SO_4$ , que se agrega gota a gota lentamente y se incuba a 4°C en agitación durante 1-2 horas. La muestra se centrifuga a 10000 rpm

durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada. Esta técnica permita la precipitación fraccionada de proteínas según su grado de solvatación, y las FABP se recuperan en la fracción soluble.

El sobrenadante obtenido del paso anterior es apto para ser sembrado en una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex G-50 (GE Healthcare), pero para contribuir al seguimiento de la proteína en la marcha de purificación se agregan unas 30000 cpm de [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] Palmitato y se incuba 15 min a temperatura ambiente para permitir que el ácido graso se reparta entre las distintas proteínas que lo unen, en particular la FABP que estamos purificando. La cromatografía de exclusión molecular se lleva a cabo en columnas preparativas (1.20 m de largo y 10 cm de diámetro aproximadamente) y se usa buffer  $\text{KCl.PO}_4$  (fosfatos 10 mM, KCl 150 mM, pH 7.4) como eluyente. Se colectan fracciones de 10 ml aproximadamente a un flujo de 1.5-2.5 ml/min en tubos de 15 ml en un colector de fracciones (GE Healthcare). Luego se obtienen los perfiles de absorbancia a 280 nm (Abs280) y cpm/100  $\mu\text{l}$  de la corrida cromatográfica, donde se debe observar cómo la FABP eluye como un pico importante luego de la mezcla de proteínas que salen en el volumen muerto de la columna. La pureza relativa de las fracciones en FABP se analiza en un gel de SDS-PAGE, se seleccionan aquellos tubos que no contienen contaminantes y se obtiene un pool de FABP pura. Normalmente este protocolo tiene un rendimiento lo suficientemente alto como para no requerir más etapas, pero de ser necesario las fracciones impuras pueden concentrarse y volver a separarse en una nueva corrida por la columna de exclusión molecular.

El pool de FABP se eluye usando el buffer  $\text{KCl.PO}_4$  pH 7.4 a través de una columna de intercambio aniónico DE-52 (GE Healthcare) de modo de eliminar el ADN contaminante. Dependiendo del punto isoeléctrico de la proteína, la misma queda retenida en la columna, o pasa de largo con el eluyente. En el caso de quedar retenida, se vuelve a eluir nuevamente con buffer  $\text{KCl.PO}_4$  pH 7.4, esta vez aumentando la fuerza iónica del mismo a 200 mM NaCl. Se le realiza un espectro de absorbancia de 200 a 300 nm al pool de proteína de modo de evidenciar la ausencia del pico de ácidos nucleicos a 260 nm. El ADN que queda retenido en la matriz de la columna es eluido con un buffer  $\text{KCl.PO}_4$  pH 7.4 de alta fuerza iónica, 1-2 M NaCl. En el caso de aquellas proteínas que deben ser eluidas con una fuerza iónica mayor, se realiza un paso

posterior de diálisis contra el buffer  $\text{KCl.PO}_4$  pH 7.4 con el fin de continuar la purificación con el mismo buffer. La diálisis se realiza a  $4^\circ\text{C}$ , en agitación durante toda la noche, usando 100X el volumen de buffer contra el volumen de proteína. Se realizan al menos 3 cambios de buffer para asegurar un cambio de buffer total.

La proteína purificada es concentrada en un dispositivo concentrador de presión positiva (Millipore) para alcanzar una concentración superior a 1 mg/ml, lo que prolonga su vida útil almacenada a  $-70^\circ\text{C}$ . Finalmente, el último paso de purificación es la deslipidización de la FABP pura utilizando una columna rellena con Lipidex 1000 (hidroxialcoxi-propil-dextran Tipo IV, Sigma) (Glatz and Veerkamp 1983) que retiene todos los sustratos hidrofóbicos. La corrida se realiza a 1 ml/min con el mismo buffer  $\text{KCl.PO}_4$  pH 7.4 para todas las proteínas derivadas de la IFABP, pero para la LFABP se setea la bomba a 0.5 ml/min, y normalmente se requiere repetir la operación si la deslipidización no es mayor al 95% (según las cpm remanentes).

La pureza de las proteínas purificadas se constata mediante una corrida electroforética en un gel de SDS-PAGE 15%. La concentración fue asignada en base a su Abs280 utilizando su coeficiente de extinción molar,  $\epsilon_{\text{IFABP}} = 16900$  y  $\epsilon_{\text{LFABP}} = 6000$  (Richieri, Ogata, and Kleinfeld 1994), se alícuota de a 0.5-1 ml y se almacena a  $-70^\circ\text{C}$ .

### **2.2.3.2. Expresión y purificación de las variantes estructurales de las FABP intestinales.**

La purificación de las variantes estructurales de IFABP siguieron un protocolo similar al empleado para las proteínas nativas y los mutantes puntuales de IFABP, pero con algunas modificaciones. La variante de IFABP carente de la región  $\alpha$ -helicoidal, IFABP-HL, fue sobreexpresada en *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el vector pMON-IFABP-HL, por lo que la inducción se realizó con ácido nalidíxico (0.1 mM concentración final) (Corsico et al. 1998). La IFABP-HL es inestable si se congela, por lo que se guarda a  $4^\circ\text{C}$  y tiene una vida útil de no más de 30 días. Por otro lado, la proteína IFABP-D98D se expresó en BL21(DE3) clonada en un vector pET11 y se purificó a partir de cuerpos de inclusión desnaturalizándola primero con urea (Córsico, Liou, and Storch 2004).

#### 2.2.4. Cuantificación de proteínas.

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

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

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

##### 2.2.4.1. Coeficiente de extinción molar.

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

$$Abs_{280} = \epsilon \times C \times l$$

Donde  $l$  es el camino óptico (en cm),  $C$  es la concentración de la muestra (expresada en M) y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la proteína (expresado en  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Por lo general, es necesario realizar una dilución 1/100-1/1000 con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada para obtener un valor confiable de  $Abs_{280}$ , entre 0.5 y 1 unidades de absorbancia.

#### **2.2.4.2. Bradford.**

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

La técnica se desarrolla preparando diluciones de las muestras a analizar y del patrón (solución de concentración conocida de BSA), para armar una curva de calibración. Cada muestra se lleva a 10 µl con H<sub>2</sub>O bidestilada y se le agregan 300 µl de la solución de reacción (0.01% Coomasie Brilliant Blue G250 en 8.5% Ácido fosfórico, 10% Etanol 96°). El color tarda 5 minutos en desarrollarse y es estable por 90 minutos. Se utiliza un lector de placas para la determinación. El rango lineal de detección abarca una concentración en la muestra de 100 a 1500 µg/ml.

#### **2.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales anti-IFABP en conejo.**

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



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

### **2.2.6. Western Blot de proteínas.**

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

En este trabajo se emplearon los anticuerpos previamente obtenidos en nuestro laboratorio según el protocolo detallado en la sección anterior, para detectar la presencia de LFABP e IFABP. Para la detección de  $\beta$ -actina se emplearon anticuerpos comerciales. Los anticuerpos policlonales obtenidos en conejo son reconocidos con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo unido a HRP (peroxidasa de rábano, *HorseRadish Peroxidase*). Los anticuerpos anti- $\beta$ -actina son monoclonales, obtenidos en ratones por lo que requieren de un segundo anticuerpo de burro anti-IgG de ratón unido a HRP. El uso de anticuerpos secundarios unidos a HRP permite el uso de los kits comerciales que acoplan la oxidación del ácido cumarínico y luminol con la reducción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), como el *SuperSignal WestPico* (Pierce).

La separación de las proteínas se realiza por SDS-PAGE, pero empleando el standard de peso molecular *Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker* (GE Healthcare) que contiene bandas de proteínas precoloreadas (250 kDa Azul, 160 kDa Rojo, 105 kDa Verde, 75 kDa, Amarillo, 50 kDa Violeta, 35 kDa Azul, 30 kDa Naranja, 25 kDa Verde, 15 kDa (doblete) Azul, 10 kDa Rojo). Este Standard sirve como referencia del peso molecular de las bandas identificadas y para verificar que la transferencia de las proteínas fue eficiente en todo el rango de pesos moleculares. Las proteínas del gel

de SDS son transferidas a una membrana de PVDF por electroblotting en una celda inmunoblot para cubas MiniProtean III (Bio-Rad). Para este procedimiento se emplea el buffer de Transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM, 20%v/v Metanol pH 8.3), que debe embeber completamente los geles y la membrana (ésta última del lado del ánodo) dispuestos en el medio de un *sandwich* de papel de filtro y esponjas para mantenerlos inmóviles.

La transferencia dura 60 minutos a 100 V, luego de los cual la membrana se bloquea toda la noche a 4°C con 5% leche descremada en polvo resuspendida en buffer PBS suplementado con Tween-20 0.05% (PBST o Buffer de lavado). Al día siguiente, la membrana se incuba 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave con una dilución del primer anticuerpo 1/5000 anti-LFABP ó 1/10000 anti-IFABP o anti- $\beta$ -actina preparada en buffer PBST con 1% leche descremada en polvo. Se lava la membrana 5 veces durante 30 minutos con buffer PBST y luego se incuba 1 hora a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo preparado del mismo modo que el primero (dilución 1/10000). Se vuelve a lavar como antes y se incuba con la solución de revelado, formada por cantidades iguales de ambos reactivos quimioluminiscentes del kit *SuperSignal West Pico*. La membrana se escurre y se revela de 30 segundos a 5 minutos de exposición (de acuerdo la concentración de proteínas) usando el filtro de quimioluminiscencia del equipo Image Quant (GE Healthare).

Las bandas se cuantifican por densitometría utilizando el programa Image J (NIH), y la señal correspondiente a las FABPs se normaliza por la correspondiente a  $\beta$ -actina, que funciona como control interno.

### **2.2.7. Ensayo de determinación de fósforo inorgánico.**

La cuantificación de membranas fosfolipídicas artificiales se realiza por el ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico (Pi) según la técnica de Gomori et al. (Gomori 1942). Se prepara la curva standard empleando una solución de 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Las muestras se preparan en tubos limpios (sin detergente) tomando alícuotas de 5-15  $\mu\text{l}$  por duplicado, al igual que los standards, que abarca el rango de 2 a 60 nmoles de Pi, y el blanco. Se agregan 30  $\mu\text{l}$  de una solución 10%de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)$  en etanol y se carboniza en la llama. Luego se agregan 400  $\mu\text{l}$  de 0.5 N HCl, se agita bien

en vórtex y los tubos se incuban por 30 minutos en baño de agua hirviendo. A continuación, a cada tubo se agrega 930  $\mu$ l de una solución 1:6 (vol/vol) de ácido ascórbico (10% peso/vol): ácido molíbdico, se vortexea y se incuban nuevamente las muestras durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a 820 nm en un espectrofotómetro y se calcula la concentración de las vesículas interpolando su valor desde la curva patrón. La concentración de las vesículas que contienen cardiolipina (CL) en su composición debe ser corregida de acuerdo a la relación de 2 grupos fosfatos por molécula de CL y a su proporción en la mezcla de lípidos, es decir dividiendo por 1.25.

## **2.3. Protocolos de Biofísica**

### **2.3.1. Ensayos de unión a ligandos.**

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

ADIFAB es una sonda fluorescente que permite monitorear la concentración de ácidos grasos (FAs) libres en equilibrio con la proteína cuyo  $K_d$  (constante de disociación) se quiere determinar. La sonda fluorescente ADIFAB es una IFABP modificada químicamente que contiene un grupo fluorescente acrilodan unido covalentemente. La unión de los FAs a la sonda ADIFAB modifica el entorno hidrofóbico del fluoróforo y determina un corrimiento hacia el rojo en el máximo del espectro de emisión del acrilodan de 432 a 505 nm (Richieri, Ogata, and Kleinfeld 1994). De este modo, conociendo el valor de  $K_d$  de ADIFAB por el ligando natural específico, se pueden determinar las afinidades para otras proteínas.

Se prepara una solución stock 25 mM de ácido oleico en una solución 25  $\mu$ M de BHT (pH 9.7). Con la misma se titula una solución 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.4), conteniendo 0.2  $\mu$ M de ADIFAB y 4  $\mu$ M de IFABP o 10  $\mu$ M IFABP-HL o IFABP-D98D. Se incuba por 5 minutos a 37°C y se mide la emisión de fluorescencia a 432 y 505 nm, excitando a 386 nm. Se calcula el cociente R (emisión a 505 nm/emisión a 432 nm) para los 10 pares de medidas para distintos agregados de ácido oleico. El análisis del equilibrio de unión, utilizando un  $R_{\text{max}}$  de 11,5 (Richieri, Ogata, and Kleinfeld 1994), se ajusta para la unión a un sólo ligando en el caso de IFABP y sus mutantes usando el método de Scatchard para obtener los valores respectivos de  $K_d$ .

#### **2.3.1.2. Determinación de la constante de disociación de AOFA.**

La afinidad de un ligando por una proteína puede expresarse como la  $K_d$  del complejo que se forma entre ambos. Se analiza la unión de varios derivados fluorescentes de compuestos hidrofóbicos naturales, como los AOFA (antroiloxi

derivado de ácido graso) que son análogos de los ácidos grasos. La  $K_d$  se calcula mediante una titulación fluorimétrica. Se monitorea el incremento de la fluorescencia del ligando fluorescente como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de proteína. Se registra el espectro de fluorescencia entre 400 y 500 nm excitando con luz de 383 nm a 25°C luego de cada agregado de proteína. Las cantidades de proteína deben abarcar un rango de proporciones proteína/ligando hasta alcanzar la saturación. Se realiza una incubación de 3-5 minutos a 25°C, para alcanzar el equilibrio previamente a la adquisición de los espectros. Los datos fueron analizados utilizando el método de Scatchard.

### **2.3.1.3. Ensayo de Lipidex 1000.**

Las constantes de afinidad de oleato y monooleilglicerol por la LFABP fueron estimadas usando el ensayo de Lipidex 1000 (Glatz & Veerkamp 1983). Brevemente, se utilizó un buffer 10 mM Tris-HCl pH 8 para diluir las soluciones stocks de ácido oleico, monooleilglicerol y LFABP. Diluciones de [ $^{14}\text{C}$ ]ácido oleico desde 1 hasta 10  $\mu\text{M}$  fueron preparadas desde una solución stock en etanol (ácido oleico [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ], 54.4 mCi/mmol, 250  $\mu\text{Ci}$  en etanol, Perkin Elmer). Diluciones de [ $^3\text{H}$ ]monooleilglicerol desde 1 hasta 10  $\mu\text{M}$  fueron preparadas agregando 0.5  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]monooleilglicerol (2-monooleil[9,10- $^3\text{H}$ (N)]glicerol, 60 Ci/mmol, 250  $\mu\text{Ci}$  en acetonitrilo, American RadioChemicals) a 4 ml de una solución 10  $\mu\text{M}$  de 2-monooleilglicerol (C18:1, [cis]-9, Sigma). Para el ensayo de unión, se mezclaron 150  $\mu\text{l}$  de buffer, 50  $\mu\text{l}$  de LFABP (2.72  $\mu\text{M}$ ) y 50  $\mu\text{l}$  de solución de ligando en un eppendorf de 1.5 ml. Luego de una incubación de 15 minutos a 37°C, que permite la unión del ligando a la proteína, los viales fueron centrifugados por 5 segundos y puestos en hielo. 50  $\mu\text{l}$  de cada vial fueron usados para determinar la concentración de ligando en la solución acuosa mediante un contador de centelleo. A los 200  $\mu\text{l}$  restantes se le agregaron 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de Lipidex 1000 agitada en frío, se mezcló 3-4 veces en un vórtex durante un período de incubación de 30 minutos a 0°C. Finalmente, los viales se centrifugaron (2 minutos, 10000 x g a 4°C) y 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se transfirieron a un vial de centelleo y fueron usados para cuantificar la cantidad de ligando libre. La resina Lipidex 1000 sólo remueve los ligandos unidos a la proteína cuando es incubada a 37°C,

incubada a 0°C sólo es capaz de unir el ligando libre en solución. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo Perkin Elmer Wallace 1409 DSA (Perkin Elmer, Santa Clara, California, USA). Se obtuvieron valores del blanco para cada dilución de ligando, midiéndose la radioactividad de incubaciones en las cuales se agregó 50 µl de buffer sin LFABP, cada valor se restó a la dilución correspondiente. Dado que LFABP posee dos sitios de unión tanto para el ácido oleico como para el monooleilglicerol, los datos fueron analizados usando la ecuación de Hill:

$$\frac{X}{n - X} = c \times \log_2 \left( \frac{\text{Ligando}}{\text{LFABP}} \right)^n + \log_2 K^d$$

Donde X= ligando unido/LFABP total, n es el número de sitios de unión y c es el coeficiente de Hill.

### **2.3.2. Ensayos de interacción con membranas artificiales.**

#### **2.3.2.1. Preparación de membranas artificiales.**

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

##### **2.3.2.1.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).**

Las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, de sus siglas en inglés: Small Unilamellar Vesicles) se preparan de acuerdo al protocolo detallado en Storch et al (Storch and Kleinfeld 1986). Los lípidos puros disueltos en CHCl<sub>3</sub> se mezclan, secan bajo una corriente de N<sub>2</sub> y se resuspenden en buffer TBS. La mezcla de fosfolípidos se sonica bajo N<sub>2</sub> en un baño de agua-hielo hasta clarificar la suspensión, lo que lleva unos 45 minutos aproximadamente. Las vesículas son separadas por ultracentrifugación a 45000 rpm durante 45 minutos y se guardan sólo las SUVs del

sobrenadante a 4°C en una atmósfera de N<sub>2</sub>. La concentración de las SUVs obtenidas se calcula empleando el ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico ya descrito.

Para la determinación del K<sub>p</sub> (coeficiente de partición) y los ensayos de transferencia es necesario incorporar un 10% mol/mol de NBD-PC (nitrobenzodiazol-fosfatidilcolina), que contiene el grupo que funciona como quencher de la fluorescencia de los AOFA. Así, se preparan vesículas zwitteriónicas con una composición de 90 mol % fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 10 mol % NBD-PC. Para incrementar la densidad de la carga superficial negativa de las vesículas aceptoras, se incorporan un 25 mol% de CL en las SUV. Para las vesículas que contienen CL se suplementa el buffer TBS con 1 mM EDTA. El EDTA sirve para complejar las impurezas de iones metálicos pesados, que catalizan los procesos de oxidación, ya que la CL es muy sensible al O<sub>2</sub>.

#### **2.3.2.1.2. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs).**

Las vesículas unilamelares grandes (LUVs, en inglés: *Large Unilamellar Vesicles*) se preparan por extrusión según la técnica descrita en Hope et al (Hope et al. 1985). En principio los lípidos puros disueltos en CHCl<sub>3</sub> se mezclan, se secan bajo una corriente de N<sub>2</sub> y se resuspenden en buffer TBS, de la misma manera que se realizó para las SUV. Para las vesículas cargadas con sacarosa, se agregó 180 mM sacarosa durante la preparación. Para las vesículas que contienen CL también se utiliza buffer TBS con 1mM EDTA. Finalmente, las LUVs se obtienen extruyendo 11 veces la suspensión de fosfolípidos empleando un filtro de policarbonato de 0.1 µm de poro y un extrusor Liposofast (Avestin, Canada). Las LUVs se colectan en un vial de vidrio color caramelo y se guardan a 4°C en una atmósfera de N<sub>2</sub>.

#### **2.3.2.2. Cálculo del coeficiente de partición.**

El coeficiente de partición (K<sub>p</sub>) de un ligando nos brinda información de la afinidad relativa que tiene un soluto por dos medios o, en este caso, de un ligando hidrofóbico por una proteína y una membrana fosfolipídica artificial. En este trabajo de

tesis, se obtuvo el Kp del ligando AOFA entre las FABP y vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).

El protocolo se basa en el método propuesto por Massey et al. (Massey, Bick, and Pownall 1997). Brevemente, se mide el espectro de fluorescencia de una solución conteniendo la proteína más el ligando fluorescente en una proporción 10:1 (1.5  $\mu$ M AOFA) en buffer TBS, luego del agregado de cantidades crecientes de SUVs. Las vesículas contienen NBD-PC (una molécula de fosfatidilcolina que tiene unido un derivado de ácido grasos con el grupo NBD en la porción hidrofóbica) que funciona como quencher de la fluorescencia del grupo antroiloxi. Las muestras se incuban por 3-5 minutos, después de lo cual se realiza la medida de fluorescencia a una temperatura de 25°C, excitando con luz de 383 nm y se toman espectros de emisión entre 400-500 nm.

El Kp se define como:

$$K_p = \frac{[SUV \cdot AOFA] \cdot [FABP]}{[FABP \cdot AOFA] \cdot [SUV]}$$

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

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

$$\frac{1}{\Delta F} = K_p \cdot \frac{1}{\Delta F_{max}} \cdot \frac{[FABP]}{[SUV]} + \frac{1}{\Delta F_{max}}$$

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



### 2.3.2.3. Transferencia de antroiloxi-ácidos grasos (AOFAs) desde FABP hacia SUVs.

La técnica de *Stopped-Flow* o Flujo Detenido se emplea para estudiar procesos muy rápidos, menores a unos pocos segundos. Por eso se recurre a la mezcla directa de los componentes del sistema en la cubeta del espectrofluorómetro donde se realiza el ensayo. La transferencia de los AOFA se monitorea por el fenómeno Förster de Transferencia de Energía de Resonancia (FRET, de sus siglas en inglés *Förster Resonance Energy Transfer*), que se evidencia cuando el ligando se transfiere a las membranas aceptoras preparadas con el quencher NBD-PC, fluoróforo aceptor FRET del grupo antroiloxi. Para estudiar la transferencia de AOFA desde las FABPs hacia las SUVs aceptoras se recurre a la técnica descrita por Storch et al. (Storch and Kleinfeld 1986). Brevemente, con la ayuda del módulo de cinética rápida *Stopped-Flow Module RX2000* (Applied Photophysics Limited), se registra la disminución de la fluorescencia del grupo antroiloxi de los AOFAs, a medida que el ligando se transfiere desde las FABPs hacia las SUV.

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

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

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

#### 2.3.2.3.1. Efecto de la concentración de las vesículas aceptoras.

Para analizar el efecto de la concentración de las vesículas zwitteriónicas (90% EPC, 10% NBD-PC), se realiza el experimento a distintas proporciones de proteína:SUV. Así, a mayor concentración de vesículas, aumenta la frecuencia de choque de las

proteínas con las membranas, lo que favorece la transferencia de ligandos a través de un mecanismo colisional, como el que presenta la proteína IFABP nativa.

Para el caso de la IFABP y sus proteínas mutantes, se preparan soluciones 2X en buffer TBS de las proteínas, y se las incuban con el ligando AOFA en una proporción 10:1 (concentración final en el ensayo 1.5  $\mu\text{M}$  ligando) durante aproximadamente 10 minutos para permitir que la formación del complejo proteína-ligando llegue al equilibrio. El AOFA se agrega desde una solución stock concentrada en etanol, quedando una concentración final de etanol en el medio menor al 0.05% (v/v). Basados en el  $K_d$  publicado para IFABP (0.16  $\mu\text{M}$ ) (Hsu and Storch 1996), la proporción 10:1 proteína:ligando asegura que más de un 95% del ligando se halle unido a la proteína. Por otro lado, se preparan las soluciones 2X de las vesículas aceptoras, tal que al diluirlas al medio den concentraciones de 150 a 600  $\mu\text{M}$ . El complejo proteína-AOFA se inyecta junto con las SUVs en la celda del módulo de cinética rápida, termostaticado a 25°C, y se mezclan al mismo tiempo que se monitorea la fluorescencia de la muestra a una velocidad de 1 punto cada 3-10  $\mu\text{seg}$  durante 5-30 segundos de forma de obtener un mínimo de 2000 puntos por ensayo. Debido a sus  $K_d$  mayores, se usó la relación 60:1 proteína:ligando tanto para IFABP-HL como para IFABP-D98D.

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

#### **2.3.2.3.2. Efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras.**

En este caso el ensayo es equivalente al descrito en el inciso anterior, pero con la diferencia de que, para analizar el efecto de la carga superficial de las vesículas aceptoras, se fija la concentración final de las SUV a 150  $\mu\text{M}$  y se emplean SUV de distinta composición. El ensayo se realiza con SUV que poseen un 90% EPC (un 10% siempre corresponde al quencher NBD-PC) con carga neta nula (zwitteriónicas), y SUV que poseen un 65% EPC y un 25% CL y que presentan el dos de cargas negativas por molécula. Las medidas se realizan en un mismo día para un set de condiciones.

### 2.3.3. Quenching de acrilamida en ausencia y presencia de LUVs.

La acrilamida es un quencher efectivo de la emisión del Trp. Dado que la acrilamida es un quenche colisional, su efecto está dado por la concentración de la misma y la accesibilidad al solvente del Trp. El espectro de emisión del Trp fue obtenido entre 300 y 400 nm, excitando a 295 nm para prevenir la excitación de los residuos de tirosina. La concentración de proteína usada fue 5  $\mu$ M y LUVs 40  $\mu$ M. Para los experimentos de quenching, se agregó acrilamida desde un stock 4 M a la solución de proteína. Los agregados fueron desde 0 hasta 400 mM. Luego de cada agregado, las muestras fueron incubadas 3 minutos a 25°C antes de tomarse la medida del espectro de emisión. Los datos obtenidos de los experimentos de quenching con acrilamida fueron analizados usando la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [Q]$$

donde  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de emisión en ausencia o en presencia del quencher  $Q$ , respectivamente, y  $K_{sv}$  es la constant de Stern-Volmer (de Gerónimo et al. 2014).

### 2.3.4. Ensayo con vesículas cargadas con sacarosa.

Se empleó un ensayo con vesículas cargadas con sacarosa para explorar la capacidad de unión a membranas de las FABPs, como se describe en Smith & Storch (Smith and Storch 1999). Brevemente, se realizaron mezclas de reacción de LUVs y FABPs en un buffer 5 mM MOPS, 100 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4. Los tubos fueron centrifugados a 100000 g por 90 minutos a 21°C, y los sobrenadantes fueron transferidos inmediatamente a nuevos tubos. Alícuotas de ambos, sobrenadante y precipitado, se resolvieron por SDS-PAGE.

La densitometría de los geles fue analizada usando el programa Image J (NIH).

## **2.4 Protocolos de Biología Celular**

### **2.4.1. Propagación, mantenimiento y subcultivo de células Caco-2.**

Se emplearon células Caco-2 que son ampliamente usadas como un modelo de células epiteliales del intestino delgado, debido a su similitud fenotípica con los enterocitos, tanto morfológicas como de marcadores bioquímicos. La manipulación de las líneas celulares se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos que se detallan en el manual de cultivo de células animales (Freshney 2000) y la bibliografía disponible para la línea celular Caco-2 (S. Ho and Storch 2001; Sambuy et al. 2005).

Las células Caco-2 y las líneas transfectadas se cultivan rutinariamente en placas o botellas con medio de mantenimiento compuesto por Medio Esencial Mínimo Dulbecco alto en glucosa (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Natocor), 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina, 1% solución de vitaminas para MEM y 1% aminoácidos no esenciales. La incubación se realiza en una estufa gaseada Forma a 37°C y en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. La manipulación de las células se realizó siempre en ambiente estéril de flujo laminar.

Las placas o botellas se mantienen en estas condiciones entre 4 y 7 días y deben ser subcultivadas antes de que alcancen una confluencia mayor al 80%. Los subcultivos o repiques de las células se realizan diluyendo 1/8 el cultivo empleando una solución de Tripsina y 0.25% EDTA (Gibco/Invitrogen) como agente desagregante que suelta las células del soporte y las separa entre sí. El protocolo consiste en descartar el medio de cultivo viejo luego de lo cual se lava la monocapa de células con buffer PBS pH 7.4, esterilizado en autoclave. Las células se aíslan por la acción de 1-2ml de la solución de Tripsina-EDTA sobre la monocapa durante 5-10 minutos a 37°C. La tripsina se neutraliza luego por el agregado de 9 ml de medio fresco suplementado con FBS, y se pipetea varias veces con ayuda de una pipeta automática para disgregar bien la monocapa. El procedimiento se sigue observando la suspensión de células en un microscopio invertido Leica y cuando las células están bien individualizadas se toman 1-2 ml y se subcultivan a una placa o botella con medio de mantenimiento fresco.

Las células transfectadas fueron sometidas a una incubación con Geneticina 1mg/ml que se mantuvo hasta luego del aislamiento de los clones. Se crecieron y criopreservaron varios viales de estas células transfectadas. Al momento de descongelar estos viales o en el caso de cultivos muy prolongados, también se mantuvo la incubación con Geneticina 1mg/ml por al menos 7 días extras a modo de ejercer una presión de selección que no bloquee la expresión del vector.

#### **2.4.2. Congelado y descongelado de células Caco-2.**

Las células Caco-2 y las líneas derivadas de la transfección con el vector pcDNA3.1-ASL se guardan almacenadas en un termo con nitrógeno líquido (-180°C) para asegurar su preservación. Esto se logra tripsinizando las células de una placa o botella como se describió en la sección anterior, pero en lugar de diluir las células, estas se depositan en el fondo de un tubo tipo falcon de 15ml estéril mediante una breve centrifugación a baja velocidad. El medio sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en 4ml de medio de congelamiento con extremo cuidado de no generar burbujas, ya que son muy frágiles en este medio. La suspensión de células se reparte en 2 alícuotas de 1.8 ml en crioviales de 2ml, a -70°C toda la noche (lo ideal es un enfriamiento lento, 1°C/min, de 0 a -70°C). La fracción restante de la suspensión se emplea para sembrar una placa de cultivo fresca que sirve como control de contaminación del procedimiento. Al día siguiente los crioviales se pasan al termo de nitrógeno líquido y se anota en el registro su posición con un rótulo equivalente al del cultivo, más la confluencia aproximada que se alcanzaría si se sembrara íntegramente el stock a congelar en una sola placa, como estimativo del número de células que contiene.

El medio de congelamiento debe prepararse con antelación y resulta de suplementar el medio de mantenimiento primero con 10% DMSO, mezclar bien, y luego con 20% FBS, para evitar la precipitación de las proteínas del suero.

Por otro lado, cuando es necesario descongelar un criovial, una vez lista el área de trabajo, éste se retira del termo de nitrógeno líquido y se mantiene en hielo hasta el momento de su utilización, que debe ser lo antes posible. El descongelado rápido se logra flotando el criovial en un recipiente con agua a 40°C unos instantes. Antes de que

se haya descongelado por completo el contenido del criovial, se retira, se rocía con etanol 70% y se lleva al flujo laminar para abrirlo en un ambiente estéril y repartir distintas cantidades de células en 2 o 3 placas con medio de mantenimiento fresco. Luego de 24 hs se renueva el medio de cultivo para eliminar las células que no se adhirieron, porque eventualmente mueren y liberan compuestos tóxicos para las otras células. Luego se mantiene el cultivo como de costumbre.

#### **2.4.3. Obtención de clones Caco-2 con expresión disminuida de hLFABP.**

El plásmido de expresión pcDNA3.1-ASL y el vector control, pcDNA3.1-Neo(+) vacío, se introdujeron en las células complejándolos con lípidos catiónicos como Lipofectamina (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Los lípidos catiónicos forman liposomas que interaccionan electrostáticamente con el ADN ya que posee carga negativa. Esta es una de las estrategias comúnmente usadas para introducir ácidos nucleicos en células eucariotas; aunque el tráfico intracelular de estos complejos o cómo el ADN llega al núcleo son escasamente comprendidos, pero una vez en él, el ADN plasmídico puede insertarse en el genoma de la célula huésped o quedar en forma epigénica.

En paralelo se transfectan células con el vector pcDNA3.1-GFP. La evidencia de fluorescencia verde luego de 48hs del procedimiento sirve como un rápido control de la eficiencia de transfección de estas células.

Una vez transfectadas las células Caco-2 con el plásmido pcDNA3.1-ASL o el pcDNA3.1-Neo(+) vacío deben obtenerse líneas estables sometiendo a selección con 1 mg/ml de Geneticina en el medio de cultivo durante un mínimo de 14 días. Para obtener poblaciones homogéneas, se aíslan colonias clonales crecidas en forma aislada en una placa de cultivo de 100mm de diámetro hasta que alcanzan un tamaño de 20 a 30 células. Luego, se individualizan y marcan en la placa con la ayuda de un microscopio óptico invertido. Se retira el medio de cultivo de la placa y se lava con PBS para eliminar trazas de suero. Utilizando cilindros de clonado sellados con grasa siliconada estéril se aíslan 5-10 colonias del resto de las células en la placa, y se tripsinizan agregando 100-200  $\mu$ l de Tripsina/EDTA (de acuerdo al tamaño del cilindro empleado). Las células así sueltas se pasan a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con la

ayuda de 250-500  $\mu$ l de medio fresco para enjuagar el interior del cilindro de clonado. El medio de cultivo se completa luego con 5ml de medio fresco.

Los niveles de expresión de LFABP se analizan por Western Blot, empleando el antisuero obtenido en nuestro laboratorio. Los resultados se expresan como Unidades Arbitrarias (UA), normalizadas por la presencia de  $\beta$ -actina. Complementariamente, se analiza la posible compensación por la falta de LFABP con IFABP también por Western Blot.

#### **2.4.4. Determinación de la capacidad de crecimiento.**

Las líneas celulares derivadas de tumores o de células embrionarias tienen comúnmente una capacidad de crecimiento mayor a la que muestran los cultivos primarios o secundarios. Esta característica está íntimamente relacionada al grado de diferenciación celular que presentan, es decir, a la especialización de dicha célula para cumplir una función determinada en el organismo. Es por esto que analizar la capacidad de crecimiento de las líneas celulares modificadas y su comparación con la línea de origen es fundamental para la correcta interpretación de los resultados de los ensayos metabólicos. Los ensayos más frecuentes para estudiar la capacidad de proliferación de las células en cultivo son la determinación del tiempo de duplicación de la línea celular y la capacidad de incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en el ADN.

##### **2.4.4.1. Tiempo de duplicación.**

La forma de estimar el tiempo de duplicación de una línea celular es analizando el crecimiento celular mediante curvas de crecimiento. Estas curvas permiten estudiar la cinética poblacional del cultivo celular bajo las condiciones fijadas para el ensayo. Esto implica determinar la duración de las fases "lag", crecimiento exponencial ("fase log") y estacionaria (si se alcanza), y determinar parámetros como el tiempo de duplicación poblacional.

Para este estudio se tripsiniza una placa o botella con células preconfluentes de cada línea celular a estudiar y se cuentan en una cámara de Neubauer. Luego se siembran  $1.0 \times 10^5$  células en 20 placas de Petri de 60 mm para cada línea celular y se

cambia el medio de mantenimiento por medio fresco cada 48-72 hs. Las células de 3 placas por línea celular son tripsinizadas a distintos tiempos, dentro de los 10 días posteriores al inicio del ensayo (normalmente 24, 48, 72, 120, 168 y 240hs), y se colectan en un tubo de 15 ml tipo falcon. Las células se pelletean y se resuspenden en un volumen conocido de buffer PBS. Se evalúa la viabilidad celular por el método de exclusión de Azul de Tripán (Freshney 2000), por lo que una alícuota de 50  $\mu$ l se mezcla con 50  $\mu$ l de una solución de Azul de Tripán 0.4 % en buffer PBS. Las células vivas (refringentes y no coloreadas) se cuentan en los 5 recuadros de 0.1 mm<sup>3</sup> de una cámara de Neubauer por duplicado.

Se deben contar un mínimo de 100 células, de no ser así debe repetirse la lectura recargando la cámara de Neubauer con nueva muestra. Hay que tener en cuenta que las células se mueren con el tiempo por lo que no se puede tardar más de 30 minutos para la determinación una vez que se mezclaron las células con la solución de Azul de Tripán.

#### **2.4.4.2. Asimilación de <sup>3</sup>H-Timidina.**

El crecimiento celular puede estimarse también midiendo la incorporación de timidina marcada radioactivamente, por un corto período de tiempo, al ADN celular. La incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina al ADN celular se determina según el protocolo descrito en Ogretmen et al (Ogretmen et al. 2001). Brevemente, se siembran alrededor de 1.0 x 10<sup>5</sup> células de cada línea celular en 6 placas de Petri de 60mm. Entre 5 y 7 días después, las células preconfluentes de 3 de las 6 placas se incuban durante 4hs con medio fresco suplementado con 0.5  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]-Timidina. Luego de dos lavados con PBS frío, el ADN celular se precipita con 2 ml/placa de una solución de 0.5% ácido tricloroacético durante 20 minutos en hielo. El precipitado se lava con 2 ml de etanol absoluto frío y luego se disuelve bien en 2 ml de una solución 0.1 M NaOH, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Una alícuota de 400  $\mu$ l se coloca en un vial de centelleo y se neutraliza con 144  $\mu$ l de 1 M HCl y se le agregan 3 ml de líquido de centelleo HiSafe 3 Plus (Perkin Elmer). Luego se mide la radioactividad de la alícuota en un contador de centelleo líquido.



En paralelo se cosechan las células de las otras 3 placas y se resuspenden en 500 µl de buffer de lisis (10 mM tris, 1 mM EDTA, suplementado con una mezcla de Inhibidores de Proteasas (SIGMA)) y se sonicán 2 veces por 30 segundos a potencia 1 en un sonicador de punta Branson. La concentración de proteínas de estas muestras se determina por el método de Bradford. Este valor se emplea para normalizar los resultados de marcación total con  $^3\text{H}$ -Timidina, que se expresan como dpm  $^3\text{H}$ /mg proteína.

#### **2.4.5. Diferenciación de células Caco-2.**

La línea celular Caco-2, cómo ya se mencionó anteriormente, provienen de un carcinoma de colon humano y presentan muchas de las características de las células del epitelio intestinal. En particular, estas células expresan marcadores típicos de los enterocitos como por ejemplo la LFABP, disacaridasas, fosfatasa alcalina, etc. Pero más notable es aún la capacidad que presentan de secretar complejos lipoprotéicos similares a las VLDL y los quilomicrones. Los estudios morfológicos además muestran una distribución asimétrica de los componentes celulares, típica de una célula polarizada, con un ribete en cepillo en la región apical. Los cultivos confluentes también muestran la formación de prolongaciones de células apiladas como si fueran microvellosidades intestinales. Por último cabe destacar que estas células también forman uniones intercelulares estrechas o impermeables, lo que les permite formar una monocapa de permeabilidad selectiva sobre una superficie porosa.

Las características antes descritas no son permanentes y para que sean expresadas en todo su potencial es necesario permitir que las células atraviesen un proceso de diferenciación celular, similar al que sufren los enterocitos en su camino desde el fondo de las criptas intestinales hasta la cima de las microvellosidades. Este fenómeno puede ser estimulado *in cultivo* por el mantenimiento de las células a una confluencia mayor al 100%. Sin embargo, para el mantenimiento de la línea celular, es aconsejable no permitir que las células alcancen la confluencia.

El protocolo general para inducir la diferenciación de las células Caco-2 consiste en tripsinizar placas o botellas con células preconfluentes y mezclarlas en un pool común. Las células se pelletean por centrifugación, se resuspenden en un volumen

conocido y se determina su concentración como se explicó en la sección anterior. Las células se siembran a una densidad de 300% (aproximadamente unas 300000 células por  $\text{cm}^2$ ) en filtros transwell, a fin de promover su diferenciación. Al día siguiente se lavan con PBS las células que no se adhirieron y se cambia el medio estrictamente cada 48 hs para evitar que se sobreacidifique. El proceso de diferenciación celular lleva aproximadamente unos 15-18 días y los experimentos deben realizarse dentro de la semana siguiente (entre los 18 y 21 días). Este proceso de diferenciación se lleva a cabo en celdas transwell, filtros sobre los que se crecen las células permitiendo el acceso independiente a la cara apical y basal de la monocapa y la medición de la resistividad eléctrica de la misma. De este modo, también se evita la formación de “domos” que aparecen en las placas comunes de cultivo por desprendimiento de una región de la monocapa debido a la acumulación de secreciones por la cara basolateral.

El proceso de diferenciación puede seguirse por varios métodos. El método enzimático más frecuente es la medición de disacaridasas, pero el más práctico y preciso consiste en la medición de la resistividad de la monocapa con un potenciómetro (ELS Voltimeter, Millipore), por lo que se empleó en cada experimento metabólico aquí descripto. Así, se observa un aumento de la resistividad medida con un electrodo a cada lado del filtro transwell cuando las células alcanzan una monocapa diferenciada. Las celdas se lavan dos veces con PBS y se mide la resistividad que presenta cada monocapa. Se considera que las células se han diferenciado si se superan los 250  $\text{Ohm.cm}^2$ , y sólo estas resultan aceptables para realizar el experimento.

#### **2.4.6. Asimilación de ácidos grasos.**

Para analizar el rol de la LFABP en la asimilación de FA, se realizaron incubaciones de monocapas diferenciadas para cada línea celular derivada de Caco-2 modificadas con cantidades crecientes de ácido oleico (OA). Las células se incuban con FAs marcados radioactivamente solubilizándolos en buffer PBS suplementado con 10 mM taurocolato de sodio y aplicándolo sólo en el compartimiento apical de los transwell, para simular la llegada de nutrientes de la dieta desde la luz intestinal.

El seguimiento del OA se lleva a cabo gracias a la incorporación de un 1-10% de FA marcado radioactivamente con  $^{14}\text{C}$ , dependiendo del ensayo, en el medio de cultivo. Los compuestos marcados radioactivamente permiten el estudio dinámico de los procesos biológicos con un mínimo de perturbación del sistema. Por otra parte, la sensibilidad de los métodos de detección de radiotrazadores es mucho mayor que la de la mayoría de los otros procedimientos físicos y químicos, por lo que moléculas poco abundantes pueden ser detectadas con alto grado de confianza.

Luego de 20 segundos de incubación, los filtros se pasan a una placa prelavada y que reposa en un baño de hielo. Las células se lavan dos veces con PBS con 1% albúmina deslipidizada (SIGMA) en frío y 2 veces más con PBS solamente, para eliminar los restos de FAs unidos a la monocapa pero no internalizados a la célula. Luego las células se cosechan raspando el filtro con un tip de punta roma con PBS frío suplementado con inhibidores de proteasas, 3 veces con 150  $\mu\text{l}$  (total 450  $\mu\text{l}$ ) para los filtros de 0.33  $\text{cm}^2$ . Las muestras se homogenizan por pipeteo y se separan 2 alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  para determinar la concentración de proteínas por duplicado. Una tercera alícuota de 250  $\mu\text{l}$  se utiliza para medir la radioactividad presente en el homogenato agregándole 3 ml de líquido de centelleo en un contador Wallac (modelo 1214 Rackbeta).

Los resultados se expresan como dpm/mg/20 seg o nmol oleato/mg/20 seg, y se grafica una curva de velocidad de asimilación en función de la concentración de FAs.

#### **2.4.7. Distribución y metabolismo de FA.**

Una vez asimilados desde la cara apical, los FAs pueden tener varios destinos metabólicos distintos, ya sea ser degradados en la mitocondria o incorporados a glicéridos para formar parte de membranas o almacenarse como reserva energética. Para analizar el rol de la LFABP en esta distribución de los FA entre sus posibles destinos se repite el ensayo de asimilación pero en celdas transwell de 35 mm de diámetro (9.6 $\text{cm}^2$ ) para obtener suficiente masa para el ensayo. En este caso, a partir del homogenato (3x500  $\mu\text{l}$ , 1.5ml total en este caso), se toma una fracción de 1 ml para realizar la extracción de lípidos totales. Los 500  $\mu\text{l}$  restantes se emplean para cuantificar proteínas y el resto se reserva para Western Blots o mediciones

enzimáticas. Los lípidos extraídos se resuelven por Cromatografía en Capa Fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) y se analiza la radioactividad de cada familia de lípidos para estudiar el metabolismo que sufre el FA.

#### **2.4.8. Extracción de lípidos totales.**

La extracción de los lípidos totales de las células se realiza siguiendo el método descrito originalmente en Bligh & Dyer (Bligh and Dyer 1959); con pequeñas modificaciones. Esencialmente, las monocapas de células se lavan con buffer PBS frío con 1% Albúmina deslipidizada dos veces y dos veces más sólo con PBS frío, para eliminar los FAs marcados que pudieran quedar adsorbidos a la superficie celular. Las células se cosechan raspando, pero obteniendo un volumen final de 1.5ml de homogenato.

Una alícuota de 1 ml de homogenato se coloca en un tubo de vidrio con tapa de teflón en hielo. La mezcla de solventes para la extracción se completa con el agregado de 4ml de Metanol frío (-20°C) y 2ml de Cloroformo (Solución de Bligh & Dyer Metanol:Cloroformo:H<sub>2</sub>O 2:1:0,5 por volúmenes), se mezcla bien y se realiza la extracción toda la noche a -20°C. Este sistema de solventes asegura una buena extracción de los lípidos celulares debido a que es lo suficientemente apolar como para que los lípidos se disuelvan y, al mismo tiempo, tan polar como para vencer las fuertes fuerzas de asociación entre los lípidos y otros constituyentes celulares como las proteínas. A continuación, al extracto se le agregan 1 ml de Cloroformo y 1 ml de agua bidestilada para particionar el sistema y poder eliminar los contaminantes no lipídicos junto con la fase acuosa. El sistema turbio debe ser clarificado previamente por centrifugación durante 5 min a 3000 rpm, y luego se aspira la fase acuosa (superior) en una trampa de vacío. La fase clorofórmica (inferior), que contiene los lípidos purificados, se reserva a -20°C. Se realiza una nueva extracción a la fase acuosa del mismo modo que se detalló anteriormente. Finalmente, se juntan ambas fases clorofórmicas provenientes de las dos extracciones sucesivas, y se pasa a un tubo de vidrio con tapa de teflón limpio y se lleva a sequedad por evaporación en una centrífuga concentradora con trampa de vapores Speed Vac SC110 (Savant). Los lípidos luego son resuspendidos en un volumen conocido de Cloroformo (normalmente 500

$\mu\text{l}$ ) y una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  se seca en un vial de centelleo para contar la incorporación de marca en la fracción de lípidos totales.

#### **2.4.9. Cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica simple que sirve para separar lípidos de acuerdo a su afinidad relativa por un adsorbente polar (fase estacionaria) y un sistema de solventes (fase móvil). Tanto el adsorbente como el sistema de solventes utilizados son escogidos de acuerdo al tipo de lípidos que se desea separar. En este trabajo de tesis sólo se recurrió a la separación de las distintas familias de lípidos neutros que denotan los posibles destinos anabólicos que pueden sufrir los FA incorporados desde la dieta. Así, los distintos lípidos neutros se separan de la fracción original de lípidos polares totales mediante el sistema de solventes hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:2, en volúmenes).

Para ello, se concentran los 450  $\mu\text{l}$  restantes de la muestra clorofórmica de lípidos totales a 50-100  $\mu\text{l}$  y se siembran puntualmente, gota a gota, en la línea de siembra (a 2-3 cm del borde inferior) de una placa de TLC 51250 (J.T.Baker Cat# 7000-04) activada durante 30-60 min en estufa. Mientras tanto, se satura la cuba en los vapores de la mezcla de corrida (no más de 60 ml). Las cromatografías se realizan de modo unidireccional permitiendo a la mezcla de solventes ascender por capilaridad hasta 1 ó 2 cm del borde superior.

La detección de las especies lipídicas se realiza por tinción en una cámara con vapores de yodo y se detectan por comparación con una mezcla de estándares puros corridos en paralelo. Las manchas de Yodo se refieren a una de las cinco familias de lípidos, Fosfolípidos (PL), Ácidos Grasos (FA), Diacilglicerol (DG), Triacilglicéridos (TG) o Ésteres de Colesterol (EC). Vale la pena mencionar que el Diacilglicerol corre casi a la misma altura que Colesterol libre, pero en los tiempos cortos de los ensayos antes mencionados no se observa marca significativa proveniente del metabolismo de los FA en el Colesterol.

Para medir la radioactividad presente en cada familia de lípidos se pueden emplear dos técnicas de acuerdo al radioisótopo empleado. Por un lado, algunos de los ensayos con  $^{14}\text{C}$  se leyeron en un equipo PhosphorImager Storm 840 (Amersham/GE) impresionando un *screen* con la placa de TLC (envuelta en parafilm) por 24hs y obteniendo una imagen del perfil de radioactividad de la placa completa. La imagen luego es analizada por el software provisto con el equipo. Además, las manchas de yodo se rasparon de la placa de TLC, se resuspendieron y se agregón 3 ml de líquido de centelleo HiSafe3 Plus (Perkim Elmer) y se contaron en un contador de centelleo. Los PL se recuperan de la sílica gel por extracción con 2 volúmenes de 1 ml cloroformo:metanol:agua (5:5:1 por vol.) y los lípidos neutros con metanol:cloroformo:hexano (1:1:2 por vol.).

Los resultados se expresan como porcentajes de la radioactividad total en la muestra para cada grupo de lípidos. Por otro lado, con el dato de la actividad específica del medio de incubación y los datos de radioactividad en lípidos totales y de mg por proteína es posible calcular los pmoles de FA incorporados en cada familia por mg de proteína en el tiempo del ensayo.

### **2.5. Análisis estadísticos.**

Los experimentos se realizaron cómo mínimo por triplicado en forma independiente, cambiando al menos la preparación o stock de algún componente en cada caso. En el caso de no haberse realizado tres medidas independientes, se lo ha indicado convenientemente. Los resultados se expresan como las medias con sus respectivas desviaciones estándar (SD). Las diferencias entre las mismas son analizadas estadísticamente empleando el test “*t*” de Student para comparar dos condiciones puntuales. En las regresiones lineales, las tendencias se evalúan por el coeficiente de correlación. En los casos en que se necesita comparar tendencias se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Los límites de confianza utilizados se señalan para cada experimento, pero nunca fueron menores al 95%.

# Resultados y Discusión.



## *Estudios biofísicos.*

### **3. Caracterización de la unión a ligandos e interacción con membranas de la variante estructural de IFABP, IFABP-D98D.**

#### **3.1. Introducción e hipótesis de trabajo.**

IFABP pertenece a una familia de proteínas intracelulares que unen lípidos con la función aparente de participar en el tráfico de ligandos hidrofóbicos (Storch and Corsico 2008). Las funciones fisiológicas específicas de estas proteínas aún no son precisas, aunque se hipotetiza que tendrían un rol central en el transporte y direccionamiento de ácidos grasos (FAs) hacia organelas membranosas específicas y vías metabólicas (Furuhashi and Hotamisligil 2008). Como se detalló en la introducción, IFABP es abundantemente producida en el enterocito, junto con otra FABP, LFABP (Bass 1985; Poirier et al. 1997). Numerosas diferencias entre estas dos FABPs de enterocito han sido descritas, incluyendo la especificidad de unión a ligandos, estequiometría, modo de transporte del ligando y propiedades de interacción con membranas, que sugieren propiedades funcionales únicas (Hsu and Storch 1996; De Gerónimo et al. 2010; Falomir-Lockhart et al. 2011; Gajda et al. 2013). La estructura terciaria de esta familia de proteínas se encuentra altamente conservada. Consiste en un barril  $\beta$  formado por 10 hojas  $\beta$  antiparalelas que forma la cavidad donde se alojan los ligandos hidrofóbicos, y un motivo hélice-giro-hélice entre las hojas  $\beta$ A y  $\beta$ B (Fig. 3.1) (Thompson et al. 1999; Muga, Cistola, and Mantsch 1993). El subdominio helicoidal ha sido descrito como la “*región portal*” junto con los residuos que conectan los loops de  $\beta$  C-D y  $\beta$  E-F, y se hipotetiza que regularía la entrada del ligando

a la cavidad (Hodsdon and Cistola 1997). Esta estructura terciaria característica difiere de la mayoría de las proteínas globulares dado que la cavidad es ocupada mayormente por el solvente, mientras que el *core* hidrofóbico es pequeño y está desplazado del centro de la proteína. La clave para comprender mejor las funciones únicas llevadas a cabo por las FABPs depende fuertemente de su caracterización estructural, y en consecuencia, de un análisis detallado de la estructura-función de los subdominios presentes en las proteínas.

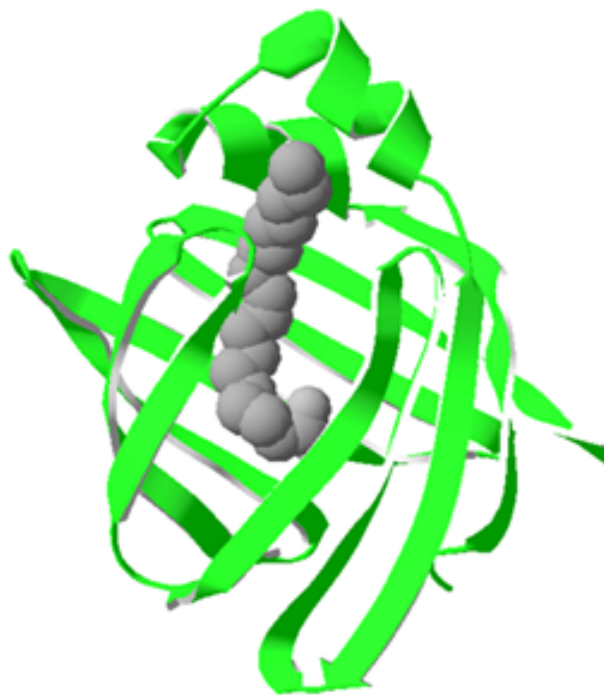


Fig. 3.1. IFABP de *Rattus norvegicus* unida a palmitato, PDB 1URE.

Con el fin de abordar el estudio de las funciones de unión y transporte de ligandos de IFABP a nivel estructural, trabajos previos se han focalizado en variantes estructurales de esta proteína así como en las de otros miembros de la familia de FABPs. A través de los años, estos trabajos han destacado la importancia de diferentes regiones de las FABPs involucradas en estos procesos. Particularmente, el motivo  $\alpha$ -helicoidal ha recibido especial atención (Corsico et al. 1998; Córscico, Liou, and Storch 2004).

Dos variantes consecutivas de IFABP carentes de la región  $\alpha$ -helicoidal (D17-SG y D27-GG) fueron diseñadas, construídas y analizadas, mostrando que el dominio

$\alpha$ -helicoidal no es necesario para preservar la topología general de IFABP (Steele et al. 1998; Ogbay, Dekoster, and Cistola 2004). Estas proteínas retienen la capacidad de unir FAs, aunque con menos afinidad que IFABP (Corsico et al. 1998). Recientemente, una nueva variante abreviada de IFABP, también carente de la región  $\alpha$ -helicoidal, fue obtenida como el producto estable de la proteólisis limitada de IFABP con clostripaína (Arg-C) en presencia de oleato (Curto, Caramelo, & Delfino, 2005). El producto principal generado luego de la proteólisis es altamente resistente a la degradación. Se postuló que la estabilidad de este fragmento (aminoácidos 29-126 de IFABP) de 11 kDa, al que se denominó D98D, se debe a su capacidad de unir el ligando, esta característica lo ayudaría a permanecer estructurado. Por consiguiente, D98D es la primer variante estructural de IFABP carente de la región  $\alpha$ -helicoidal que no ha sido diseñada racionalmente, sino obtenida mediante un proceso de “selección proteolítica”. D98D ha perdido  $\beta$ A y la mayoría de la región  $\alpha$ -helicoidal, así como los últimos cuatro residuos de  $\beta$ J (Fig. 3.2). Estudios estructurales y análisis de unión a ligando han demostrado que D98D se pliega correctamente, adopta la estructura clásica de barril  $\beta$ , y mantiene la capacidad de unir ligandos (Curto, Caramelo, & Delfino, 2005).

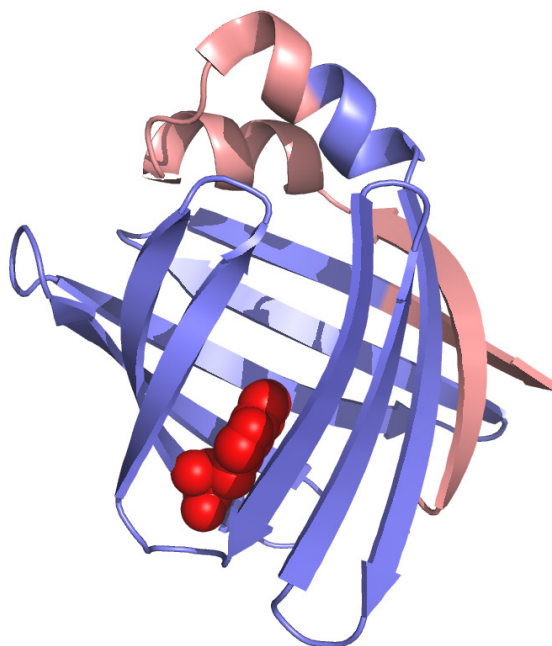


Fig. 3.2. IFABP (PDB 2IFB) donde se indica el fragmento D98D. Los extremos N- y C- terminal escindidos se muestran en rosa, D98D en celeste y el único triptofano presente en D98D en rojo.

D98D fue clonada y sobrexpresada en *E.coli* obteniendo así su versión recombinante (Curto et al., 2005). La proteína expresada aparece casi exclusivamente en cuerpos de inclusión, probablemente debido a la gran cantidad de proteína producida. Por tal motivo, para purificarla, el material fue disuelto en buffer conteniendo 2 M de urea, una concentración menor que la que se necesita para desnaturalizar la proteína (Curto et al., 2005).

Curto et al. han realizado múltiples estudios abocados al análisis de la estabilidad y plegado de esta variante estructural de IFABP, la cual carece de un 25% de la proteína original. Entre los estudios realizados, se encuentran espectros de dicroísmo circular (CD). Como se muestra en la Fig. 3.3 tomada de Curto et al. 2005, el espectro de CD lejano de D98D (A) es típico de una proteína con alto contenido de hojas  $\beta$ , aunque muestra una disminución del 35% de intensidad respecto a IFABP. Este cambio se debe mayoritariamente a la ausencia de la fracción  $\alpha$ - helicoidal y a la pérdida de residuos aromáticos, principalmente el triptófano W6 (Curto et al., 2005). Luego de la unión del ligando, D98D se estabiliza, hecho que se observa debido al aumento de la elipticidad tanto en los espectros de UV lejano como cercano (Curto et al., 2005).

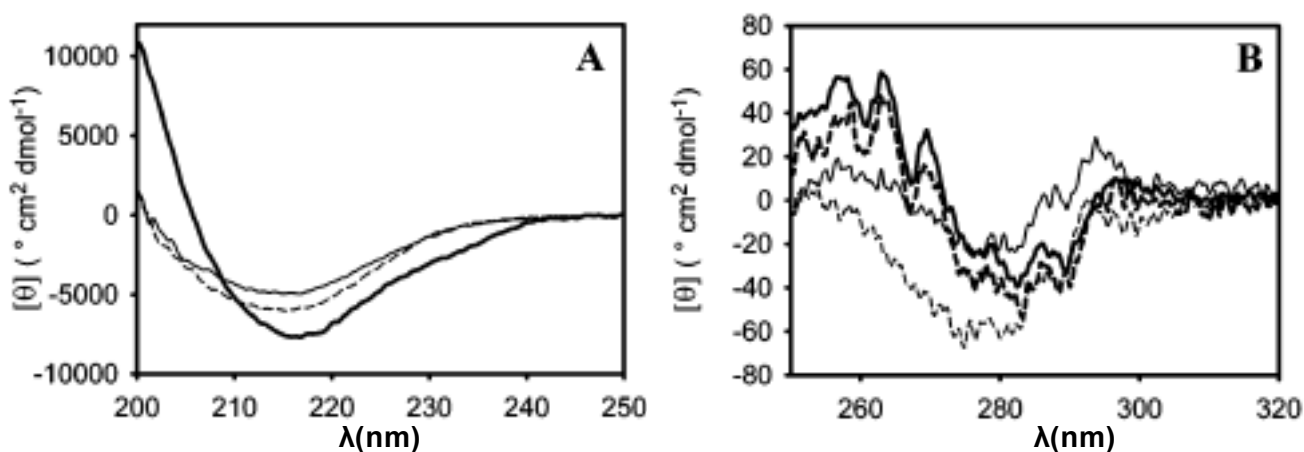


Fig. 3.3. Espectros de dicroísmo circular de D98D e IFABP. Los espectros de CD (A) UV- lejano y (B) UV- cercano muestran: (—) apo-IFABP, (---) holo-IFABP, (—) apo-D98D, (---) holo-D98D.  $[\theta]$  se refiere a elipticidad molar y  $\lambda$  es longitud de onda. Tomado de (Curto et al., 2005).

Los resultados mostrados por la Dra. Curto et al. (Curto et al., 2005; Curto, Caramelo, Franchini, & Delfino, 2009) afirman que D98D es una proteína estable, correctamente plegada, monomérica y funcional. Esto se explica debido a que D98D mantiene todos los residuos críticos del *core* hidrofóbico, es decir, todos los residuos involucrados en el evento de nucleación que llevan al estado plegado. La capacidad de D98D de unir ácidos grasos con afinidades similares a IFABP o las variantes carentes de la región  $\alpha$ -helicoidal sugiere una estructura conservada capaz de proveer el entorno adecuado para la unión (Curto et al., 2005).

Con el fin de obtener mayor información sobre las capacidades funcionales de D98D, en esta sección de la tesis doctoral se purificó la proteína recombinante D98D así como las proteínas usadas como control, IFABP, LFABP y D17-SG (variante carente de la región  $\alpha$ -helicoidal), de acuerdo a los protocolos descritos en Materiales y Métodos. Se estudiaron en profundidad las afinidades de unión de esta proteína por FAs marcados fluorescentemente así como FAs naturales. Asimismo se analizaron velocidades y mecanismos de transferencia y de FAs marcados fluorescentemente hacia membranas de diferente composición. Adicionalmente, se estudió la habilidad de D98D de interactuar físicamente con membranas usando diferentes enfoques. A continuación se detallan los resultados obtenidos del análisis funcional exhaustivo de la variante estructural D98D.

### **3.2. Determinación de la unión a ligandos.**

#### **3.2.1. ADIFAB.**

D98D es la variante monomérica más pequeña de IFABPP actualmente descrita que mantiene una estructura de tipo barril  $\beta$  y retiene su capacidad de unir FAs. Con el objetivo de estudiar la constante de disociación ( $K_d$ ) de D98D por el oleato y compararla con la obtenida para la IFABP nativa (wtIFABP) y la variante estructural D17SG, se utilizó la sonda fluorescente ADIFAB. ADIFAB es una versión químicamente modificada de la IFABP nativa de rata con un grupo acrilodán fluorescente unido covalentemente, que sirve para estudiar la unión de FAs, por la inducción de un cambio hacia el rojo en el espectro del acrilodán (Richieri et al., 1994). La relación entre la intensidad de fluorescencia emitida a 505 nm respecto a la intensidad de fluorescencia emitida a 432 nm refleja la fracción de ADIFAB unido al ligando, este dato es usado para obtener una medida de FA libre en solución en equilibrio con la proteína investigada. Conociendo la  $K_d$  de ADIFAB para el ácido oleico (OA), puede determinarse la afinidad para el equilibrio de unión de otra proteína. La Fig. 3.4 muestra un experimento modelo a partir del cual se calcula la  $K_d$ . La  $K_d$  obtenida para wtIFABP fue  $0.03 \pm 0.02 \mu\text{M}$ . Tanto D98D como D17-SG unen oleato, aunque con una afinidad menor que wtIFABP ( $0.57 \pm 0.39 \mu\text{M}$  y  $4.26 \pm 0.23 \mu\text{M}$ , respectivamente). Es importante destacar que D98D muestra una mayor afinidad por el ligando que D17-SG.

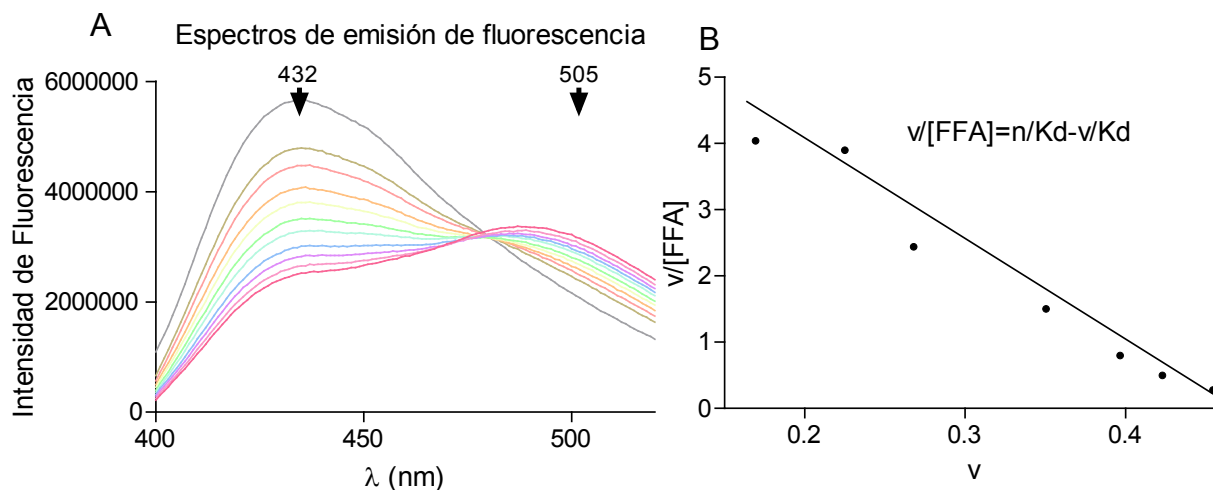


Fig. 3.4. Determinación de la afinidad de IFABP por OA empleando la sonda ADIFAB. El panel A muestra los espectros de ADIFAB a largo de una titulación de IFABP con OA. Cada espectro corresponde a un agregado de OA, a medida que se agrega OA, disminuye la intensidad de fluorescencia a 432nm y aumenta a 505nm. El panel B muestra una serie de datos procesados utilizando un análisis de tipo Scatchard para un único sitio de unión utilizado para el cálculo de la  $K_d$ , en el cual se define  $v = [FABP_b]/[FABP_t]$  ( $b = \text{unido}$ ,  $t = \text{total}$ ), FFA (FA libre),  $n$  (estequiometría).

### 3.2.2. Antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA).

Complementariamente al ensayo anterior, se analizó la unión a análogos fluorescentes de ácidos grasos (AOFA). Los AOFA empleados fueron los antroiloxi derivados del ácido oleico (12AO) y del ácido esteárico (12AS). Las propiedades espectrales de las sondas antroiloxi son sensible a su medioambiente inmediato, por esto son útiles indicadores de las características del sitio de unión. Estas sondas usualmente muestran muy baja intensidad de fluorescencia en el buffer acuoso, la cual aumenta dramáticamente cuando interacciona con el subdominio de unión hidrofóbico de una FABP (Storch, Bass, and Kleinfeld 1989). Este aumento en la fluorescencia es una medida directa de la unión del ligando a la proteína y permite el seguimiento de la formación del complejo FABP-ligando y obtener, de este modo, el valor de  $K_d$ . Como se muestran en la Fig. 3.5, ambos, 12AO y 12AS, muestran un gran aumento en la emisión de fluorescencia cuando se unen a D98D. La Fig. 3.6 A muestra el corrimiento al azul del espectro de emisión del 12 AO al unirse a D98D. Los cambios observados son indicativos de un ambiente considerablemente más estrecho para el

grupo antroiloxi cuando se une a la proteína (Storch, Bass, and Kleinfeld 1989), sugiriendo que la sonda fluorescente se encuentra en el bolsillo hidrofóbico. El corrimiento al azul del espectro es más importante para 12AO que para 12AS, esta diferencia puede deberse a un microambiente distinto sentido por el grupo fluorescente de cada ligando. Dado que la cadena de carbonos del 12AO presenta un doble enlace (Fig. 3.5), el cual introduce un quiebre en la misma, el grupo antroiloxi puede estar acomodado de modo diferente dentro de la cavidad de la proteína. En ambos casos (12AO y 12AS), los ligandos se unen a la proteína de un modo saturable (Fig. 3.6 C y D) y con una estequiometría 1:1. Usando el análisis de Scatchard, se obtuvieron los siguientes  $K_d$  para D98D:  $K_d$  (12AO) =  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  y  $K_d$  (12AS) =  $0.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , ambos en el mismo orden de magnitud, sin evidenciar preferencias por ligandos saturados o insaturados.

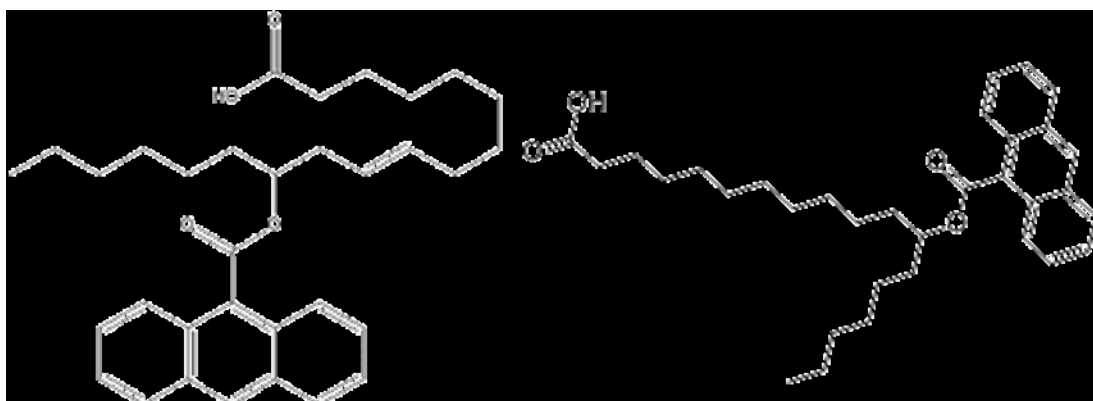


Fig. 3.5. Estructura química del antroiloxi derivado del ácido oleico (12AO) y antroiloxi derivado del ácido esteárico (12AS).



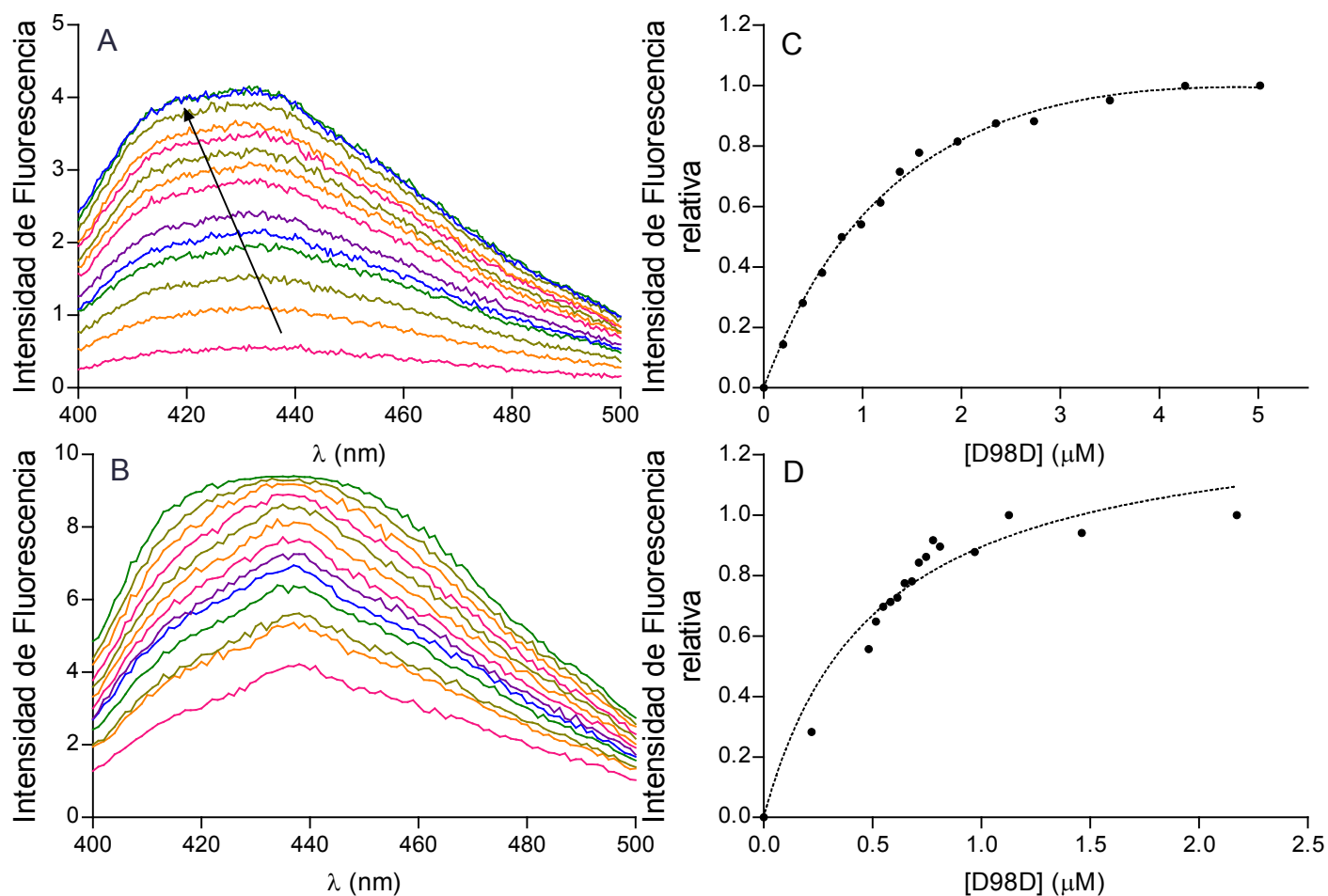


Fig. 3.6. Cambios en la fluorescencia relativa de 12AO (A) y 12AS (B), se excitó a 383nm y se colectó la emisión desde 400 a 500nm. Se muestran la isothermas de unión de los complejos D98D -12AO (C) y D98D -12AS (D) obtenidas por titulación fluorométrica. Los cambios en la fluorescencia relativa fueron obtenidos a 440 nm luego de excitar a 383nm.

### 3.3. Coeficiente de partición de equilibrio de antroiloxi-derivados de ácidos grasos.

Se obtuvieron valores de coeficiente de partición de equilibrio ( $K_p$ ) para D98D así como wtIFABP y D17-SG, de modo de describir la distribución relativa de cada ligando entre la proteína y las vesículas (EPC-SUVs). Los  $K_p$  obtenidos se muestran en la Tabla 3.1. El análisis de estos resultados indican un particionamiento preferencial del 12AO hacia las SUVs relativo a wtIFABP, mientras que el ligando saturado 12AS se particiona hacia la proteína, en concordancia con resultados previamente publicados (Falomir-Lockhart et al. 2006; A. E. A. Thumser and Storch 2000). Asimismo, se observa

una buena correlación con las constantes de disociación obtenidas para los ligandos naturales que indican que wtIFABP posee mayor afinidad por el ácido esteárico respecto al ácido oleico (Richieri, Ogata, and Kleinfeld 1994).

D98D muestra valores similares de  $K_p$  para ambos ligandos, 12AO y 12AS. Los resultados obtenidos muestran una distribución casi equivalente de ambos AOFAs entre la proteína y vesículas, de modo tal que no existe diferencia en la afinidad por los ligandos usados. Esto concuerda con lo observado para los valores de  $K_d$  obtenidos para estos AOFAs. Por otro lado, la partición de ambos ligandos entre D17-SG y las vesículas muestra una clara tendencia de los AOFAs de particionar hacia la fracción membranosa. Estos valores de  $K_p$  fueron notablemente mayores que los observados para wtIFABP y D98D. Esto está de acuerdo con los resultados de  $K_d$  obtenidos previamente donde se observa que D17-SG presenta menor afinidad por los ligandos en comparación con D98D (Corsico et al. 1998).

Tabla 3.1. Coeficiente de partición de 12AO y 12AS. Unidades de  $K_p$  ( $\mu\text{M FABP} / \mu\text{M SUV}$ ).

	$K_p$ 12AO <sup>a</sup>	$K_p$ 12AS <sup>a</sup>
wtIFABP	$8 \pm 2$	$0.53 \pm 0.04$
D98D	$1.03 \pm 0.09$	$1.1 \pm 0.1$
D17-SG	$11 \pm 4$	$21 \pm 6$

<sup>a</sup> Los resultados de  $K_p$  son un promedio de 3 medidas independientes  $\pm$  SEM.

Los estudios a continuación fueron realizados en condiciones tales que la relación de dador hacia aceptor (FABP:SUV) estuviera por encima de los  $K_p$  determinados (Tabla 3.1) de modo de asegurar la transferencia uniforme y unidireccional en los experimentos de cinética (Hsu and Storch 1996).

### 3.4. Transferencia de 12 AO y 12AS desde D98D hacia membranas artificiales.

El efecto de la concentración de membrana aceptora en la velocidad de transferencia del ligando desde la proteína ha sido utilizado para caracterizar el mecanismo de transferencia. En un *mecanismo mediado por colisión*, la velocidad de transferencia del ligando estaría directamente relacionada con la frecuencia de colisión entre el dador y el aceptor, por ende, la concentración de vesículas (Córsico, Liou, and Storch 2004). Por otra parte en un *mecanismo mediado por difusión acuosa*, donde la velocidad limitante de la transferencia es la liberación del ligando desde la proteína, no se observaría cambios en la misma al modificar la concentración de las vesículas aceptoras. wtIFABP es un ejemplo bien caracterizado de una FABP con un mecanismo de transferencia de ligando colisional. Con la finalidad de investigar el mecanismo de transferencia de FAs de D98D, se examinó la transferencia de AOFA desde D98D hacia membranas zwitteriónicas en función de la concentración creciente de SUV y se comparó con el comportamiento que muestra la wtIFABP.

En la Fig. 3.7 se esquematiza el ensayo de FRET usado, donde se analiza la transferencia de AOFA (dador) hacia vesículas fosfolipídicas, las cuales contienen el aceptor FRET NBD-PC.

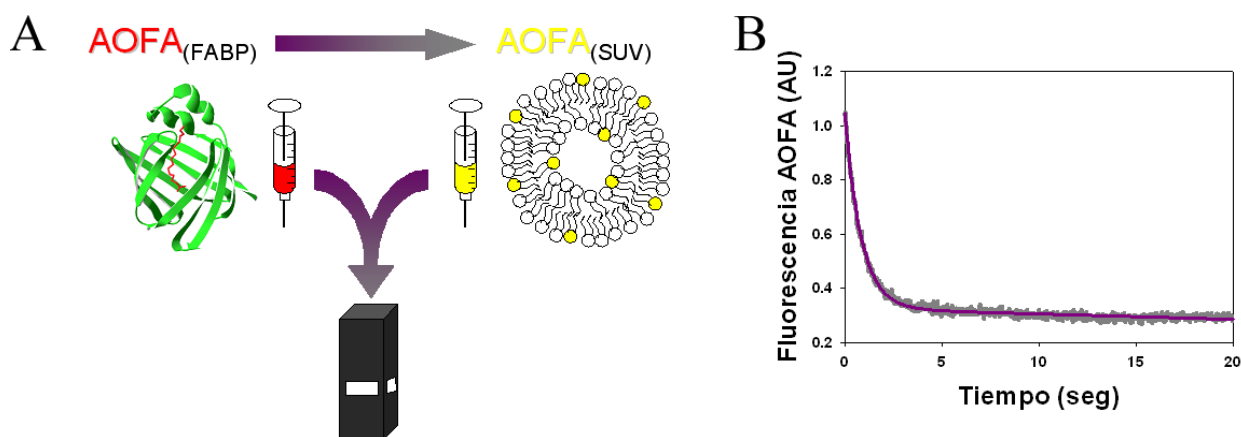


Fig. 3.7. Ensayo de transferencia de AOFA. En el panel A se muestra un esquema del ensayo cinético de transferencia de energía de resonancia que permite analizar la transferencia de derivados fluorescentes de FA (AOFA) entre FABP y membranas modelo que contienen NBD-PC. El panel B muestra los datos de fluorescencia en función del tiempo, y su ajuste a una exponencial simple de 3 parámetros a partir del cual se obtiene la velocidad de transferencia de los AOFA (ver Materiales y Métodos).

Los resultados de la Fig. 3.8 A y B muestran que la velocidad relativa de transferencia de 12AO y 12AS desde D98D no se ve afectada por la concentración de vesículas aceptoras. Contrariamente, la velocidad relativa de transferencia de ambos ligandos desde wtIFABP hacia NBD-PC aumenta proporcionalmente como función de la concentración de vesícula, en concordancia con un mecanismo de transferencia colisional. Trabajos previos han puntualizado en la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal como determinante del mecanismo de transferencia del ligando en las FABPs “colisionales” (Corsico et al. 1998; Córscico, Liou, and Storch 2004; Franchini, Storch, and Corsico 2008). Queda claramente evidenciado que la falta de los segmentos de aminoácidos 1-28 y 127-131 afecta el mecanismo de transferencia desde D98D hacia membranas modelo.

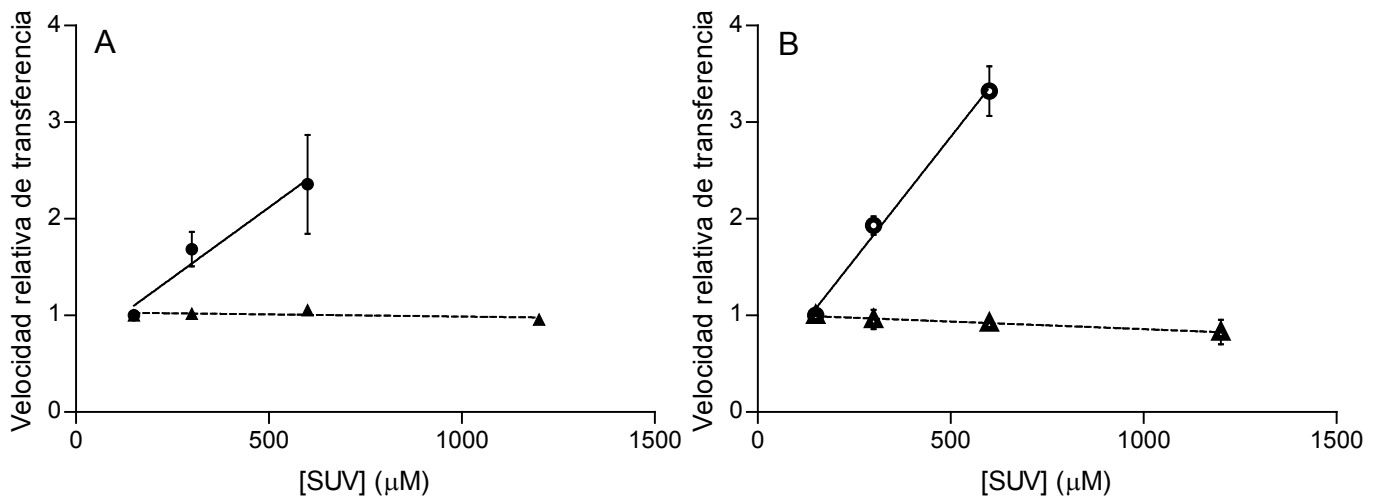


Fig. 3.8. Efecto de la concentración de membranas aceptoras en la transferencia de AOFA desde FABP. (A) Transferencia de (●)12AO desde wtIFABP hacia EPC/NBD-PC SUVs y (▲) 12AO desde D98D hacia EPC/NBD-PC SUVs. (B) Transferencia de (○) 12AS desde wtIFABP hacia EPC/NBD-PC SUVs y (△) 12AS desde D98D hacia EPC/NBD-PC SUVs. Promedio de las velocidades de transferencia de 2 o 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

### 3.5. Efecto de la carga en la transferencia de AOFA desde FABP hacia membranas.

La hipótesis que sostiene que la transferencia de FAs desde wtIFABP ocurre mediante un contacto colisional con una membrana aceptora implica que las propiedades de la membrana podrían potencialmente modular la velocidad de transferencia. En contraste, en el caso de una difusión acuosa, las características de la membrana aceptora no deberían regular la velocidad de transferencia, dado que el paso limitante en el proceso de transferencia – la disociación del ligando de la proteína hacia la fase acuosa- es un evento temporalmente distinto del proceso que involucra a la membrana aceptora. La Fig. 3.9 muestra que, como se esperaba de estudios previos, la velocidad de transferencia relativa de 12AO desde wtIFABP está incrementada sustancialmente ante la incorporación de un 25% de CL en las membranasceptoras de NBD-EPC, mientras que la transferencia de 12AO desde D17-SG no fue afectada por la presencia de fosfolípidos cargados negativamente (Corsico et al. 1998; Córscico, Liou, and Storch 2004). Los resultados obtenidos para la proteína D98D se parecen a los de D17-SG, de modo que podríamos inferir que el mecanismo de transferencia de FAs desde D98D hacia membrana es un proceso de tipo difusional.

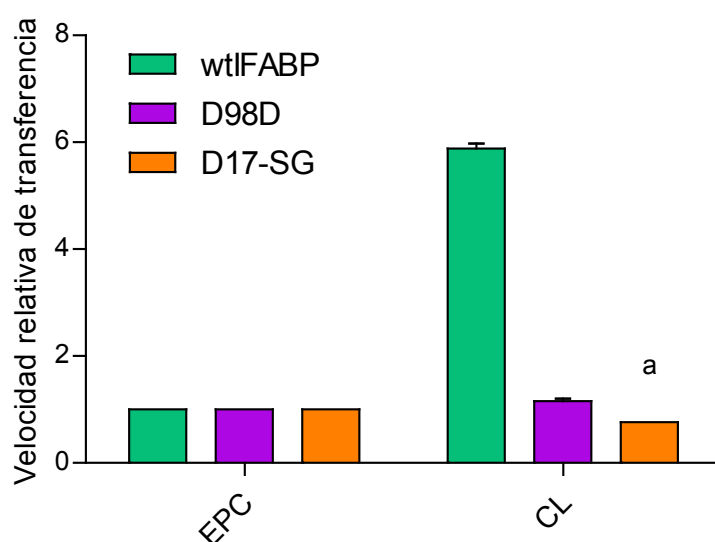


Fig. 3.9. Efecto de la carga de la vesícula en la transferencia de AOFA desde FABP. Los resultados están expresados en velocidad de transferencia relativa de 12AO hacia membranas zwitterónicas (EPC) o membranas con carga negativa (CL). Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. *a* indica que un único experimento fue realizado en ese caso.

### 3.6. Ensayo de interacción con vesículas cargadas con sacarosa.

Se empleó un método de centrifugación diferencial con el fin de estudiar la unión interfacial entre membrana y FABP usando LUVs cargadas con sacarosa de diferente composición fosfolipídica. La interacción proteína-membrana se monitoreó mediante el análisis de la cantidad de proteína no unida al incorporarse las LUVs. La Fig. 3.10 A muestra un experimento en el cual se estudiaron las proteínas nativas IFABP y LFABP (wtIFABP y wtLFABP, respectivamente) y D98D en sus formas apo; antes y después de la incubación con LUVs 100% EPC. wtLFABP y D98D presentaron una muy escasa disminución en la intensidad de la banda mientras que wtIFABP no mostró cambio en presencia de las vesículas con EPC. De acuerdo con la cuantificación realizada por densitometría, D98D mostró el menor porcentaje de proteína remanente en el sobrenadante (Tabla 3.2), sugiriendo que hay diferentes grados de interacción para estas proteínas. La Fig. 3.10 B muestra la incubación del mismo set de proteínas con LUVs conteniendo un 25% de CL. En este caso, se observó un claro descenso en la intensidad de las bandas en presencia de vesículas cargadas negativamente (Tabla 3.2). Dado que este ensayo se realiza en el equilibrio, estos resultados están de acuerdo con la formación de complejos de las proteínas incubadas con LUVs zwitteriónicas. En el caso de wtIFABP en presencia de vesículas de EPC, la interacción estaría dada por complejos transientes, como se reportó previamente (Falomir-Lockhart et al. 2006). En particular, cuando se incorporan cargas negativas en la membrana el equilibrio es desplazado hacia una adsorción más estable de la proteína en las LUVs. Notablemente, D98D interactúa con ambos tipos de LUVs y esta interacción parece estar marcadamente aumentada por la presencia de cargas negativas en la superficie.

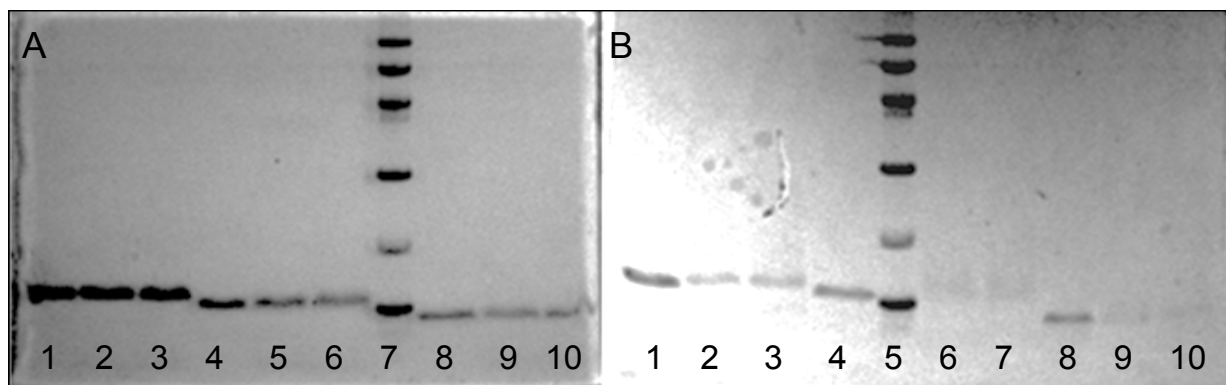


Fig. 3.10. Unión de FABPs a LUVs cargadas con sacarosa. La unión estable de apo-FABP a LUVs de 100 % EPC (A) o 25 % CL (B) fue analizada por ultracentrifugación diferencial. Las calles 1, 4 y 8 de cada gel son proteína pura: wtIFABP, wtLFABP y  $\Delta 98\Delta$ , respectivamente, incubada en ausencia de LUVs. (A) Las dos calles consecutivas luego de cada proteína pura son replicados del mismo experimento, muestran proteína en el sobrenadante luego de la ultracentrifugación en presencia de LUVs 100% EPC (es decir, proteína no unida). (B) Las calles 2y 3, 6 y 7, y 9 y 10 son replicados de un mismo experimento, proteína no unida luego de la ultracentrifugación en presencia de LUVs 25% CL de wtIFABP, wtLFABP y D98D respectivamente.

Tabla 3.2. Porcentaje de FABP en el sobrenadante luego de la centrifugación  $\pm$  desviación estándar.

	EPC	EPC-CL
wtIFABP	93.50 $\pm$ 7.15	23.60 $\pm$ 4.77
wtLFABP	74.27 $\pm$ 9.75	22.92 $\pm$ 4.83
$\Delta 98\Delta$	58.16 $\pm$ 0.11	15.43 $\pm$ 2.88

### 3.7. Ensayo de quenching de acrilamida.

Para obtener más información acerca de la interacción D98D-membrana, se analizaron los cambios en la fluorescencia del triptófano en ausencia y presencia de EPC-LUVs. El quenching de residuos de triptófanos con acrilamida es un ensayo muy utilizado para analizar el grado de exposición de estos residuos al solvente en la proteína (van Rooijen et al. 2009). Dado que la acrilamida es soluble en un medio acuoso, la efectividad del quenching es muy sensible al grado de exposición del triptófano al solvente. Por ende, aquellos triptófanos ubicados en matrices hidrofóbicas serán menos accesibles a las moléculas de acrilamida y, por consiguiente,

quencheados con una menor eficiencia que aquellos triptófanos expuestos al medio acuoso. Los resultados se analizaron mediante el método de Stern-Volmer en el cual la relación de la fluorescencia del Trp en ausencia y presencia de acrilamida ( $F_0/F$ ) se grafica en función de la concentración de acrilamida creciente, de la pendiente se obtiene la constante de quenching ( $K_{sv}$ ). A mayor  $K_{sv}$  observada, más expuesto al solvente, y por ende a la acrilamida, está el triptófano analizado.

D98D conserva un único Trp y este corresponde al Trp82 de wtIFABP, el cual está ubicado en el fondo del barril- $\beta$  y es parte del *core* hidrofóbico (Fig. 3.2). Los resultados presentados en esta sección fueron realizados en simultáneo y comparados con otros reportes de nuestro grupo. Particularmente se usó W6F, un mutante puntual de IFABP donde el Trp6 fue intercambiado por una Phe y únicamente mantiene el Trp82; y W82F, un mutante puntual de IFABP donde el Trp82 fue intercambiado por una Phe y únicamente mantiene el Trp6 (de Gerónimo et al. 2014). Las  $K_{sv}$  obtenidas se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Quenching de acrilamida de proteínas en presencia y ausencia de EPC-LUVs.

	$K_{sv \text{ buffer}}^a$	$K_{sv \text{ LUVs}}^a$
wtIFABP	$4.35 \pm 0.41$	$4.67 \pm 0.34$
D98D	$8.51 \pm 0.51$	$4.38 \pm 0.43$
W6F	$7.68 \pm 1.13$	$5.09 \pm 1.27$
W82F	$3.28 \pm 0.14$	$3.34 \pm 0.55$

<sup>a</sup> Los resultados de  $K_{sv}$  son promedio de al menos 3 medidas independientes  $\pm$  desviación estándar. Las unidades están en  $\mu\text{M}^{-1}$ .

En ausencia de LUVs, los valores de  $K_{sv}$  para D98D y W6F son indistinguibles, indicando que el Trp82 se encuentra expuesto de igual modo en ambas proteínas. Estos resultados dan evidencia de un barril- $\beta$  bien preservado en D98D. Por otro lado, el quenching en solución acuosa muestra que el Trp6 nativo de IFABP (mutante W82F) está considerablemente más protegido del medioambiente en comparación con el Trp82. La mayor exposición del Trp82 comparado con el Trp6 probablemente se deba al acceso a la cavidad de unión vacía por parte del quencher soluble. Una comparación directa con wtIFABP es más complicada dado que están presentes los Trp6 y Trp82 y



ambos contribuyen al espectro de emisión (aunque el rendimiento cuántico de la emisión de fluorescencia del Trp6 es significativamente menor).

En presencia de LUVs, los valores de Ksv para D98D y W6F disminuyen, mostrando un ambiente más protegido para el Trp82 en esta situación. Estos resultados indicarían que, a pesar de la pérdida del subdomino  $\alpha$ -helicoidal, D98D podría aún estar interactuando a través de elementos del barril- $\beta$  y de este modo restringir el acceso de la acrilamida a la cavidad de unión. El Trp6 (W82F) parece no estar afectado por la presencia de LUVs. La Ksv para wtIFABP es un promedio de las contribuciones de Trp6 y Trp82 en presencia o en ausencia de LUVs, y no se observa un cambio en presencia de las membranas modelo.

### 3.8. Discusión.

Como se describió previamente, D98D carece del fragmento N-terminal 1-28 y los últimos 5 aminoácidos pertenecientes al C-terminal, sin embargo retiene su estructura de barril  $\beta$ , se mantiene monomérica y es capaz de unir FAs (Curto et al., 2005). Esta variante truncada de IFABP retiene todos los residuos críticos del *core* hidrofóbico que se supone están implicados en los eventos de nucleación que llevan al estado plegado. Pero la característica más “atractiva” de D98D es que, a diferencia de D17-SG y D27-GG, no es una variante carente de la región  $\alpha$ -helicoidal diseñada racionalmente. Además, ha sido propuesta como un modelo minimalista potencialmente capaz de poblar intermediarios discretos escasamente representados en el conjunto conformacional de la proteína nativa (Curto et al., 2009). En este sentido, consideramos el uso de D98D como un modelo más preciso para probar el rol de los diferentes sudomínios de IFABP.

En estos experimentos se ha demostrado que D98D une tanto ácido oleico como análogos fluorescentes de FAs, aunque con menor afinidad que la observada para wtIFABP, en concordancia con reportes previos (Curto et al., 2005; Curto et al., 2009). Se determinaron los valores de  $K_d$  para wtIFABP, D98D y D17SG para OA usando la sonda ADIFAB. Como se esperaba, wtIFBAP mostró la mayor afinidad por el ligando en comparación con las variantes estructurales. Es interesante notar que D98D muestra un valor de  $K_d$  considerablemente menor que D17-SG, demostrando una mayor afinidad por el OA. Por otro lado, se determinaron  $K_d$  para análogos fluorescentes de FAs. Los resultados obtenidos para ambos ligandos, 12AS y 12AO, se encuentran en el mismo orden de magnitud, indicando una afinidad similar de la proteína D98D por los mismos. Resultados previamente publicados de  $K_d$  para wtIFABP y D17-SG ( $0.17\mu\text{M}$  y  $1.7\mu\text{M}$ , respectivamente) (Corsico et al. 1998), sitúan la afinidad de D98D por este ligando en un lugar intermedio, al igual que lo observado para el OA. Estos resultados podrían explicarse debido al hecho de que D98D fue inicialmente identificada como un fragmento proteolítico de holo-IFABP, sugiriendo que este constructo preserva todas las interacciones críticas con el ligando. El evento de unión al ligando podría ser crucial para la estabilización de los contactos de las cadenas laterales provocando un último reajuste en la estructura terciaria,

estabilizándola aún más como se observa en los espectros de CD (Fig. 3.3 A y B). Este hecho podría ser la clave que determina las afinidades comparables demostradas por D98D respecto a wtIFABP.

La caracterización funcional de las FABPs involucra el estudio de su mecanismo de transferencia de ácidos grasos y de su interacción con membranas. Trabajos previos usando un ensayo *in vitro* de transferencia de energía resonante de Förster (FRET) han determinado que algunos miembros de esta familia muestran un mecanismo de transferencia colisional y otros un mecanismo difusional (Hsu and Storch 1996). En el caso de D98D, la ausencia de los segmentos 1-28 y 127-131 altera dramáticamente la regulación de la transferencia de AOFA desde D98D. Como se observa en la Fig. 3.8, la respuesta de D98D a la concentración creciente de SUVs está disminuida aproximadamente un 90% cuando se compara con wtIFABP, para la cual la velocidad de transferencia es directamente proporcional a la concentración de vesículas, una característica central de los procesos de transferencia mediados por colisión (Hsu and Storch 1996; Córscico, Liou, and Storch 2004). Asimismo, la ausencia de estas regiones da como resultado la pérdida total de la sensibilidad de D98D a membranas aceptoras con carga superficial neta. En contraste, y como se esperaba de resultados previos, wtIFABP muestra un aumento marcado de la velocidad de transferencia de ácidos grasos hacia vesículas cargadas negativamente (Hsu and Storch 1996). Estos resultados describen un mecanismo de transferencia de FAs de tipo difusional para D98D; este comportamiento se puede asociar a la ausencia del dominio  $\alpha$ -helicoidal el cual ha sido postulado como el subdominio que guía el mecanismo de transferencia de FAs de tipo colisional (Corsico et al. 1998; Falomir-Lockhart et al. 2006; Franchini, Storch, and Corsico 2008). Además estos resultados se encuentran totalmente de acuerdo con aquellos observados para la variante D17-SG (Corsico et al. 1998), aportando aún mayor evidencia en la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal en dirigir y determinar el mecanismo de transferencia de FAs. Esta es la primera vez que la transferencia de FAs se mide en ausencia completa de la hoja  $\beta$ A de IFABP. La comparación del comportamiento de transferencia para ambas variantes parece indicar que  $\beta$ A no es determinante para el mecanismo de transferencia colisional.

Otro aspecto importante de la función de IFABP es su habilidad de interactuar con membranas. A lo largo de este capítulo se han mostrado experimentos -ensayo de

unión a vesículas cargadas con sacarosa y quenching de acrilamida de los residuos de Trp- que fueron empleados para analizar desde distintas perspectivas la unión de D98D a membranas modelo fosfolipídicas. Los métodos de sedimentación así como los ensayos de quenching de acrilamida pueden ser considerados como técnicas que monitorean eventos “promedio” o “largo-plazo” dado que los resultados observados se registran luego de llegar al equilibrio de los componentes presentes en el ensayo. En ambos tipos de experimentos la formación de un complejo proteína-membrana relativamente estable nos permite observar las interacciones proteína-membrana. En el caso del ensayo con las vesículas cargadas con sacarosa, las tres proteínas ensayadas mostraron una interacción débil con membranas de EPC. Interesantemente, las tres proteínas mostraron una clara interacción con vesículas con CL sugiriendo que la formación de estos complejos está favorecida por interacciones de tipo electrostáticas, de acuerdo con datos previamente publicados (Falomir-Lockhart et al. 2011). Además el experimento de quenching de acrilamida de los residuos de Trp mostró un efecto protector de las vesículas en la emisión del Trp remanente, agregando aún más evidencia de la interacción de D98D con membranas. Como se muestra en la Tabla 3, el efecto de las vesículas en el comportamiento de D98D fue similar al obtenido para el mutante de Trp único de IFABP (W6F) el cual tiene un dominio hélice-giro-hélice intacto. El hecho de que estas dos variantes se comporten de modo similar aporta evidencias que apoyan la hipótesis que indica que los cambios observados para D98D en presencia de vesículas se deben probablemente a la interacción física con membranas la cual previene el acceso de la acrilamida a la cavidad de unión, y no debido a cambios conformacionales de D98D cuando se encuentra interaccionando con membranas. Adicionalmente, trabajos previos demuestran que el barril  $\beta$  de wtIFABP está involucrado en la interacción con membranas (Falomir-Lockhart et al. 2006; de Gerónimo et al. 2014), sugiriendo la existencia de elementos en este subdominio para la interacción proteína-membrana que podrían estar preservados en D98D. Todos estos resultados juntos muestran que D98D interactúa físicamente con membranas y que su interacción puede estar modulada por fosfolípidos cargados negativamente. El hecho de que D98D parezca ser un intermediario en el proceso de plegamiento (Curto et al., 2009) puede explicar que retenga varios de los elementos estructurales que están involucrados en la función de la proteína.

Como ya se explicó antes, existen muchas evidencias que sugieren que la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP es crítica para el mecanismo de transferencia del ligando, definiendo el comportamiento colisional o difusional para ambas FABPs expresadas en el intestino, así como para la interacción física con membranas fosfolipídicas (Corsico et al. 1998; Córscico, Liou, and Storch 2004; Franchini, Storch, and Corsico 2008). El hecho que D98D posee un mecanismo de transferencia de FAs de tipo difusional y además es capaz de interactuar con membranas podría no ser una noción intuitiva. Sin embargo, en la interpretación de un mecanismo de transferencia “difusional”, como el observado para D98D, no deben excluirse las interacciones proteína-membrana dado que este mecanismo indica que el paso limitante sería la liberación del ligando al medio acuoso, en vez de la interacción con la membrana. Recientemente se ha demostrado que proteínas con comportamiento difusional como LFABP son capaces de interactuar físicamente con membranas y que esta interacción está claramente modulada por la presencia del ligando (Falomir-Lockhart et al. 2011).

En el presente trabajo, el comportamiento de D98D parece correlacionar bien con la función propuesta para la región  $\alpha$ -helicoidal de IFABP como el motivo principal de interacción en un mecanismo de transferencia del ligando secuencial. Brevemente, un paso inicial de interacciones electrostáticas entre la región  $\alpha$ -helicoidal y la membrana estaría seguido de un cambio conformacional que promovería la salida del ligando desde el sitio de unión hacia la membrana (Falomir-Lockhart et al. 2006). En este sentido, los resultados de interacción proteína-membrana sugieren que, en el contexto de este modelo de mecanismo, la interacción de la región  $\alpha$ -helicoidal debería ser precedida por el contacto del barril  $\beta$  con la membrana, y la relevancia de este paso podría depender de la composición lipídica de la membrana aceptora, dando lugar a un mecanismo molecular que explicara un transporte directo de ácidos grasos entre estructuras subcelulares.

## *Estudios biofísicos.*

# **4. Estudio de la capacidad de unión de monoacilglicéridos a LFABP.**

### **4.1. Introducción e hipótesis de trabajo.**

La proteína que une ácidos grasos de hígado (LFABP, FABP1) se expresa tanto en hígado como en la mucosa intestinal, así como en riñón. Como ya se ha mencionado anteriormente, posee características particulares dentro de la familia de las FABPs. Posee dos sitios de unión para ácidos grasos (Thompson et al. 1997; He et al. 2007), es capaz de unir una gran variedad de ligandos hidrofóbicos además de ácidos grasos de cadena larga como, por ejemplo, acil-CoAs y sales biliares (De Gerónimo et al. 2010; Thumser and Wilton 1996; Wilkinson and Wilton 1987) y es uno de los pocos miembros de esta familia de proteínas que presenta un mecanismo “difusional” de transferencia de ligandos desde la proteína hacia membranas (Hsu and Storch 1996; Córscico, Liou, and Storch 2004; Franchini, Storch, and Corsico 2008). Estas características convierten a la LFABP en un objeto de estudio particularmente interesante.

En el intestino, la digestión de los triacilglicéridos (TG) dietarios generan grandes cantidades de ácidos grasos (FAs) y 2-monoacilglicéridos (MGs) los cuales son luego absorbidos por los enterocitos del epitelio intestinal y usados principalmente para la resíntesis de triacilglicerol en el retículo endoplásmico (Phan and Tso 2001; Tso and Crissinger 2006). En los últimos años se ha comenzado a apreciar la importancia de los MGs no sólo como intermediario en la síntesis y degradación de triacilglicéridos, sino por otras razones, algunas de las cuales se detallan a continuación. Recientemente, algunas FABPs han sido identificadas como transportadoras de

anandamida (araquidonoiletanolamida -AEA-) (Kaczocha, Glaser, and Deutsch 2009). AEA es una n-aciletanolamina (NAE), un grupo de lípidos formado por la hidrólisis de n-acilfosfatidiletanolaminas (NAPEs) por la NAPE-fosfolipasa D, y se ha demostrado que regula la ingesta de alimentos (Piomelli 2014). AEA fue el primer endocanabinoide identificado en la familia de moléculas de señalización lipídicas NAE. Inicialmente fue descubierto en el cerebro de cerdos y se descubrió que posee propiedades similares al  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, el compuesto activo en el cannabis (Devane et al. 1992). AEA regula la ingesta de alimentos a través de su acción como agonista de los receptores canabinoides 1 y 2 (CB1 y CB2) en la membrana plasmática. Similar a lo que sucede con el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, altas concentraciones de AEA resultan en un aumento de la ingesta de alimentos (Kaczocha, Glaser, and Deutsch 2009). Adicionalmente, el 2-araquidonilglicérido (2-AG), un MG, ha sido identificado como un endocanabinoide, y los altos niveles de este compuesto en el cerebro se asocian a un aumento en la ingesta de alimentos (Jung et al. 2012). Además, el 2-AG en el intestino jugaría un rol en la regulación de la movilidad y la secreción de las hormonas incretinas (Izzo et al. 2009; DiPatrizio et al. 2011; Storr and Sharkey 2007; Chon et al. 2012), las cuales son secretadas por el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos y estimulan la secreción de insulina por parte del páncreas.

El grupo de la Dra. Storch ha reportado que los MGs y FAs son incorporados en el enterocito, al menos en parte, por una vía común mediada por una proteína (S. Ho and Storch 2001; Murota and Storch 2005). Una vez dentro de la célula, ambos lípidos deben movilizarse hacia organelas intracelulares para su procesamiento metabólico. Está claro que LFABP une FAs de cadena larga y serviría como una proteína intracelular de transporte de FAs (Storch and Thumser 2000; Storch and Corsico 2008), el transporte intracelular de MGs no se ha considerado en profundidad. En ratones *knockout* de LFABP (LFABP<sup>-/-</sup>), se ha demostrado que el metabolismo intestinal de MGs está significativamente perturbado, aunque estos cambios no están dados por cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de MG y TG (Lagakos et al. 2011). Estos resultados sugieren un defecto en el tráfico de MGs en los ratones LFABP<sup>-/-</sup>, aunque existe controversia sobre si LFABP une MG. Mediante el uso de un ensayo de desplazamiento de fluorescencia, se reportó que MG no se uniría a LFABP (Thumser and Wilton 1996), mientras otros estudios también basados en

técnicas de fluorescencia sugieren que LFABP es capaz de unir MG (Storch 1993). Para entender las bases del mecanismo de transporte intracelular, así como el mecanismo subyacente en los efectos observados en el metabolismo de MG en los ratones LFABP  $-/-$ , es importante determinar unequivocamente si MG es o no un ligando para LFABP.

A continuación se detallarán estudios realizados en colaboración con el laboratorio de la Dra. Storch en la Universidad de Rutgers durante una estadía de trabajo en el marco de mi formación doctoral, con una beca Fulbright-Ministerio de Educación.

Con la finalidad de resolver la controversia sobre la unión de MG a LFABP, se utilizó un análisis cromatográfico de citosol de hígado proveniente de ratones *wild type* (WT) y ratones nulos para LFABP así como un ensayo de Lipidex 1000 (resina de interacción hidrofóbica) con el fin de determinar la afinidad del ligando por la proteína. Asimismo, estos estudios fueron complementados con el análisis de la perturbación estructural de LFABP monitoreada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) realizado por el grupo de la Dra. Stark y la transferencia cinética de un análogo fluorescente de monooleína llevado a cabo por el grupo de la Dra. Murota. Estos dos últimos estudios serán comentados brevemente de modo de exponer toda la evidencia obtenida en el análisis de la unión de MG a LFABP.



#### 4.2. Análisis cromatográfico de citosol de hígado de ratones wild type y ratones nulos para LFABP.

Se estudiaron los perfiles de elución en una columna Superdex G75 de los ligandos [ $^{14}\text{C}$ ]oleato y [ $^3\text{H}$ ]monooleína incubados con citosol de hígado de ratones WT y LFABP  $-/-$ . En la Fig. 4.1.A se muestra el perfil de elución del citosol WT con el ligando oleato, las fracciones de eluato que contienen gran cantidad de [ $^{14}\text{C}$ ]oleato también contienen LFABP, como se muestra en el *western blot* de la Fig. 4.1.E WT y está de acuerdo con los resultados previamente publicados por Martin et al (Martin, Huang, et al. 2003). En contraste, el pico de [ $^{14}\text{C}$ ]oleato desaparece completamente de las fracciones correspondientes en el citosol de LFABP  $-/-$  (Fig. 4.1.B), mientras que el *western blot* no muestra LFABP en esas fracciones, tal como se esperaba (Fig. 4.1.E KO). Estos resultados confirman que LFABP es la proteína mayoritaria de unión a oleato en el citosol de hígado. Los pequeños picos de radioactividad a pesos moleculares mayores (fracciones de elución menores) pueden deberse a la presencia de albúmina, la cual no fue removida por perfusión del hígado. Aunque es interesante destacar que en el hepatocito intacto, la albúmina se encuentra presente en el sistema de vesículas secretorias, no como una proteína citosólica.

En la Fig. 4.1.C, el ligando [ $^3\text{H}$ ]monooleína incubado con citosol WT eluye en fracciones que, como se muestra en el *western blot*, contienen LFABP (Fig. 4.1.F WT), mientras que ni el pico de radioactividad (Fig 4.1.D) ni LFABP (Fig. 4.1.F KO) están presentes en las fracciones correspondientes para el citosol de LFABP  $-/-$ . En el perfil de elución del citosol de LFABP  $-/-$ , se observa un pico de [ $^3\text{H}$ ]monooleína en las fracciones que contienen péptidos de peso molecular  $<6.5$  kDa. Es probable que en ausencia de una proteína de unión, MG forme micelas que eluyen a un bajo peso molecular. En general, los resultados demuestran que en el hígado, LFABP es la proteína que mayoritariamente une MG.

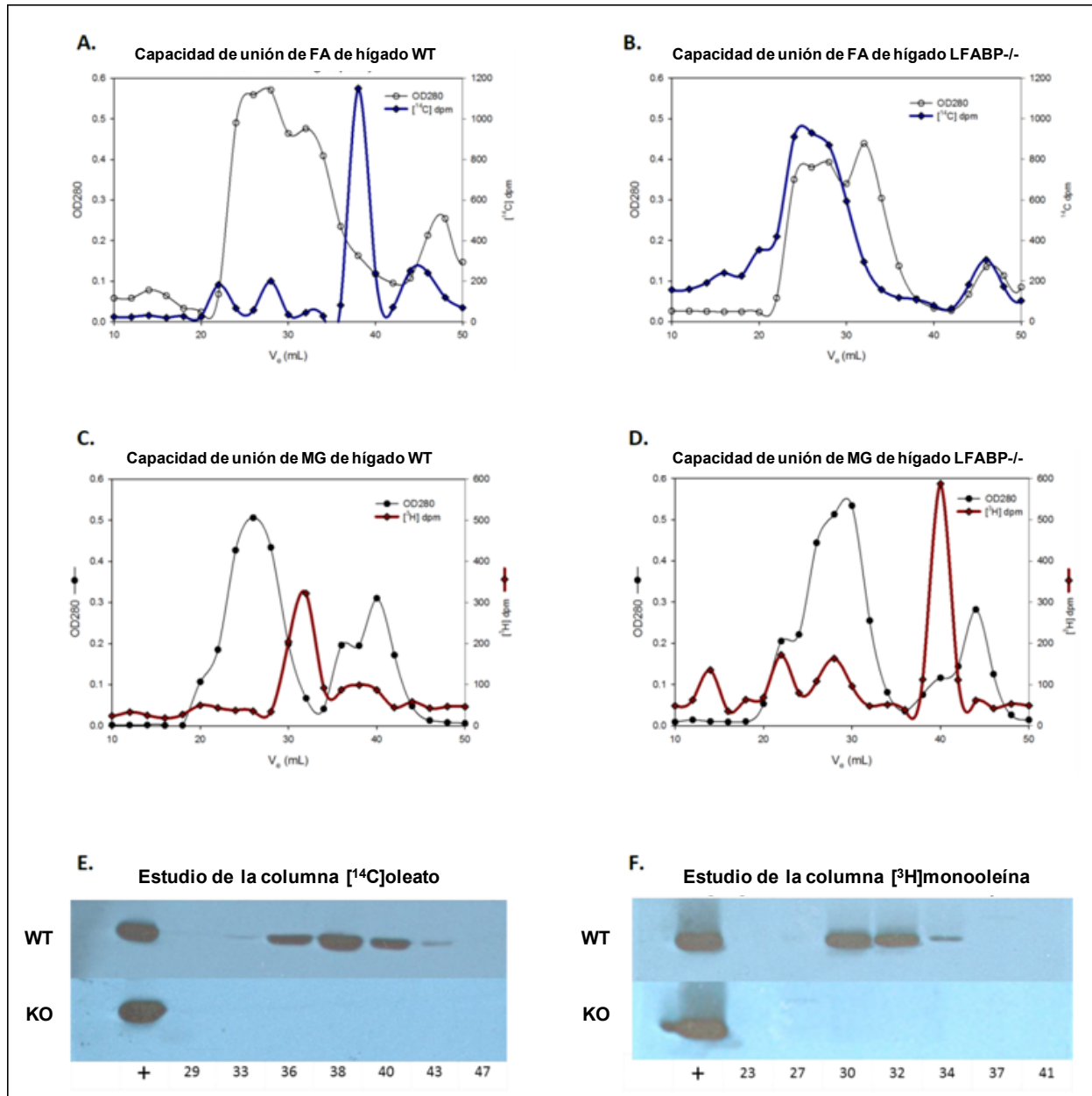


Fig. 4.1. Retención de los ligandos  $[^{14}\text{C}]$ oleato y  $[^3\text{H}]$ monooleína incubados con citosol de hígado de ratones WT y LFABP  $-/-$ . Cromatogramas representativos de 10 mg de citosol de WT y LFABP  $-/-$ , en el eje y se muestran la OD280 (densidad óptica a 280 nm) y la radioactividad (dpm)  $[^{14}\text{C}]$ oleato (A y B) y  $[^3\text{H}]$ monooleína (C y D) vs. el volumen de elución (ml) en el eje x. Columnas separadas fueron empaquetadas para los dos fraccionamientos de  $[^{14}\text{C}]$ oleato y los dos de  $[^3\text{H}]$ monooleína. Se determina la presencia de LFABP en múltiples fracciones de cada corrida (50  $\mu\text{l}$  de fracción concentrada); los *western blots* de LFABP se muestran en E y F, la primera fila de cada *western blot* corresponde a citosol WT, la segunda fila corresponde a citosol de ratones LFABP  $-/-$ , indicados como KO. Las fracciones están indicadas de acuerdo a sus volúmenes de elución, la primera línea de cada *western blot* es el control positivo, 3  $\mu\text{g}$  de LFABP purificada.

### 4.3. Análisis de equilibrio de unión. Ensayo de Lipidex 1000.

El ensayo de Lipidex 1000 (Glatz and Veerkamp 1983) fue utilizado para estimar las afinidades de unión de los ligandos monooleína y oleato por LFABP. Se utiliza la propiedad de la resina Lipidex 1000, la cual sólo remueve los ligandos unidos a la proteína cuando es incubada a 37°C, incubada a 0°C sólo es capaz de unir el ligando libre en solución. Teniendo en cuenta esto, se incubó proteína junto con ligando radioactivo a 37°C en un buffer adecuado, se toma una alícuota para cuantificar la radioactividad de la solución, equivalente a la cantidad total de ligando. Luego se agrega Lipidex 1000 a 0°C, y se incubó por 30 minutos a 0°C en agitación. La resina removerá el ligando que no está unido a la proteína. Se centrifuga para precipitar la resina con ligando, y se cuantifica una alícuota del sobrenadante, el cual contiene la proteína soluble. De este modo se obtiene una medida del ligando unido a la proteína. La titulación de la proteína con estos ligandos da como resultado curvas sigmoideales con un coeficiente de Hill (pendiente del gráfico de Hill en la ecuación  $\log[x/(n-x)] = 0$ ) cercano a 2, sugiriendo una unión con cooperatividad positiva, resultado consistente con estudios previos de la unión secuencial de FAs a dos sitios de unión (He et al. 2007; Thompson et al. 1999).

Las constantes aparentes de disociación  $K'$  obtenidas para ambos ligandos usando la ecuación de Hill son  $34.1 \pm 4.7$  nM para oleato y  $63.4 \pm 3.2$  nM para monooleína ( $p < 0.005$ ). Dado que la estructura terciaria de LFABP muestra que los dos sitios de unión para el ligando no son equivalentes, hemos aproximado las constantes de disociación para cada sitio. Para obtener un valor de  $K_{d1}$ , se realizó una extrapolación de la curva a bajas concentraciones de ligando, y para obtener un valor de  $K_{d2}$  la extrapolación se realizó usando las concentraciones de ligando altas. Para la unión de oleato, los valores de  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  obtenidos son  $0.8 \pm 0.2$  y  $42.2 \pm 10.2$  nM, respectivamente; para la unión del monooleína, los valores de  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  son  $2.7 \pm 1.1$  nM ( $p < 0.001$  comparado con oleato) y  $96.7 \pm 21.4$  nM ( $p < 0.05$  comparado con oleato), respectivamente. Análisis representativos para cada ligando se muestran en la Fig. 4.2.

Estos resultados muestran que LFABP posee dos sitios de unión para ambos ligandos, aunque la afinidad por el oleato parece ser al menos dos veces mayor que

para monooleína. Asimismo, estos dos sitios de unión poseen cooperatividad positiva para ambos ligandos, como se observa del coeficiente de Hill y las dos constantes de disociación obtenidas para cada ligando, siendo  $K_{d1}$  en los dos casos de mayor afinidad que  $K_{d2}$ .

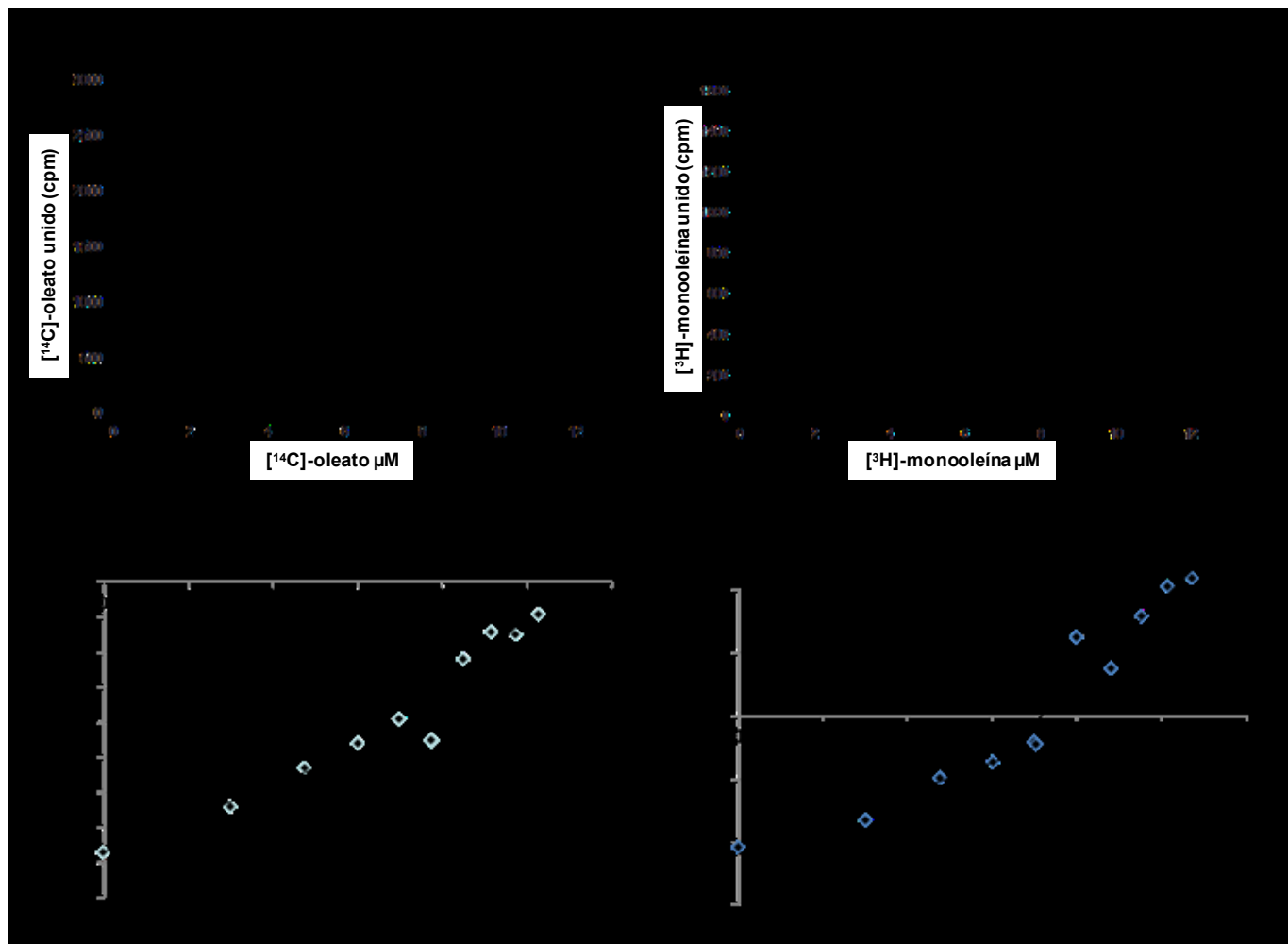


Fig 4.2. Unión de FA y MG a LFABP. El ensayo de Lipidex fue utilizado para estimar las afinidades de unión en el equilibrio, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran gráficos representativos de curvas sigmoidales de concentración de ligando ( $\mu\text{M}$ ) vs. ligando unido (cpm) en los paneles A y B. Las constantes de disociación para cada sitio de unión fueron obtenidas mediante extrapolación en un gráfico de Hill.  $K_{d1}$  fue extrapolada de la curva a bajas concentraciones de ligando,  $K_{d2}$  fue extrapolada de la curva a altas concentraciones de ligando.

#### **4.4. Localización del ligando monooleína en el complejo formado con LFABP obtenida por RMN en solución (estudios realizados por el grupo de la Dra. Stark en colaboración con la Dra Storch).**

La unión de dos moléculas de MG a la proteína LFABP afecta los mismos residuos perturbados durante una titulación con el ligando OA (He et al. 2011), lo cual sugiere que la ubicación del ligando MG en la proteína concuerda con las estructuras resueltas para el complejo proteína-FA en cristales (Thompson et al. 1997) y en solución (He et al. 2007). Específicamente, la unión del primer ligando, MG o OA, altera el ambiente magnético de los residuos G106, K121 y E72/T73, mientras que la unión del segundo MG o OA afecta los residuos I29, K33, I35 y Y120. Aún más, el primer ligando MG perturba los entornos de los residuos S11 y F18, una observación que puede atribuirse al mayor tamaño del grupo glicerol comparado con el carboxilo del OA y a una conformación parcialmente extendida en vez de forma de U del primer ligando (Fig. 4.3).

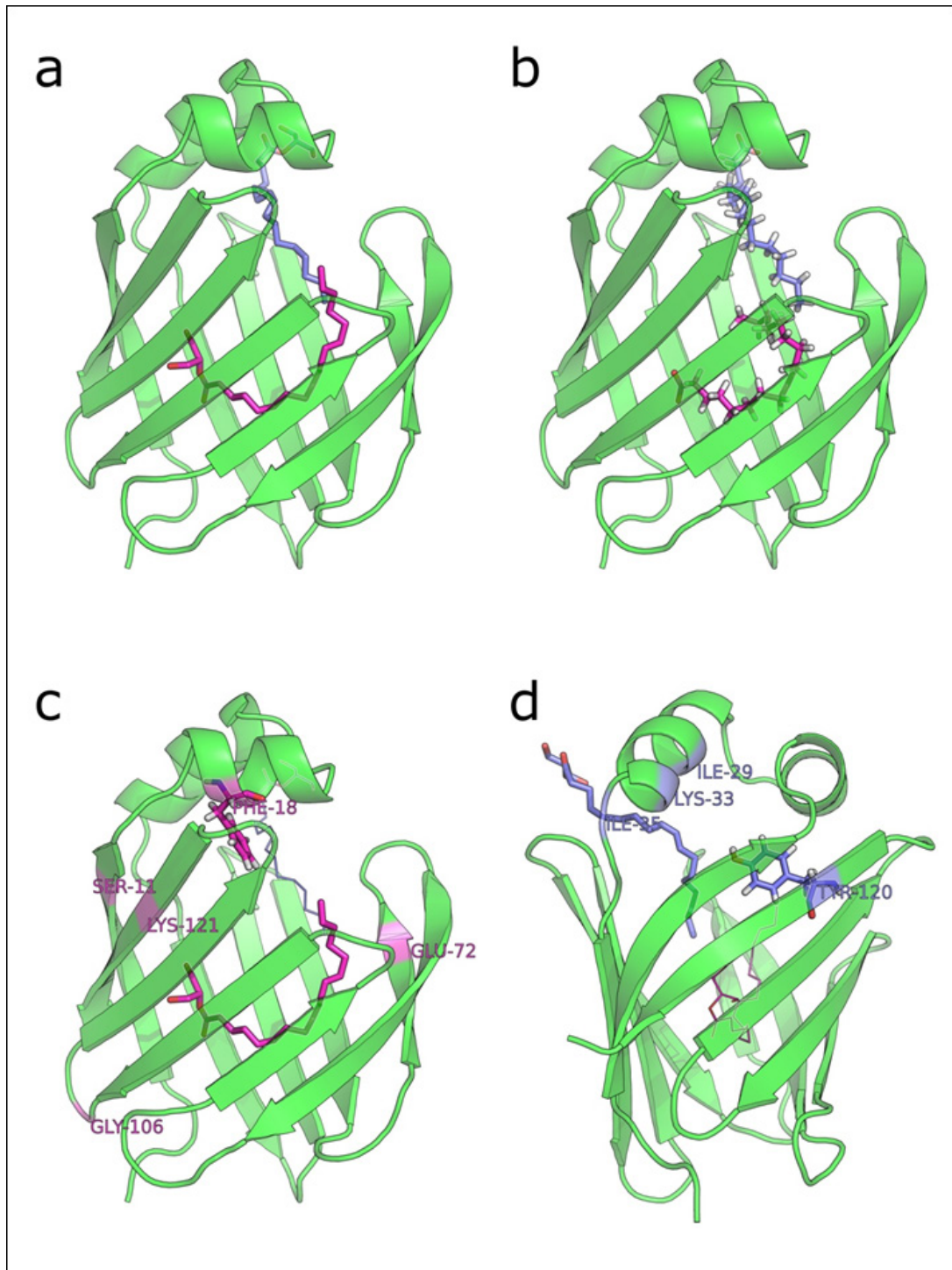


Fig. 4.3. Localización de los ligandos monooleína y oleato en la cavidad de la proteína wt-LFABP. A) Localización de monooleína consistente con las perturbaciones en los desplazamientos químicos observados al titular LFABP con dos equivalentes de ligando. B) Localización de oleato determinada de las estructuras de menor energía del complejo LFABP:OA (relación 1:2) en solución (He et al. 2007). C) Residuos perturbados por la entrada del primer ligando MG. D) Residuos perturbados por la entrada del segundo ligando MG.

#### 4.5. Transferencia de 12AO y MG12AO desde LFABP hacia SUVs (estudios realizados por el grupo de la Dra. Murota en colaboración con la Dra. Storch).

Estudios previos han demostrado que el proceso de transferencia de una FA marcado fluorescentemente desde LFABP hacia SUV ocurre vía difusión a través de la fase acuosa (Hsu and Storch 1996). Usando un análogo fluorescente de MG, MG12AO, obtenido mediante síntesis química por condensación del 12AO con glicerol, se examinó el mecanismo de transferencia del mismo desde LFABP hacia SUVs. La velocidad de transferencia se determina para una concentración fija del donador LFABP y concentraciones crecientes de vesículas aceptoras. En la Fig 4.4. se puede observar que a medida que se aumenta la concentración de vesículas aceptoras, no hay cambio en la velocidad de transferencia para el ligando 12AO o el ligando MG12AO desde LFABP hacia SUVs. Esto sugiere que la transferencia de ambos, los análogos de FA y MG, desde LFABP hacia SUVs ocurre de modo similar, a través de un mecanismo de difusión acuosa.

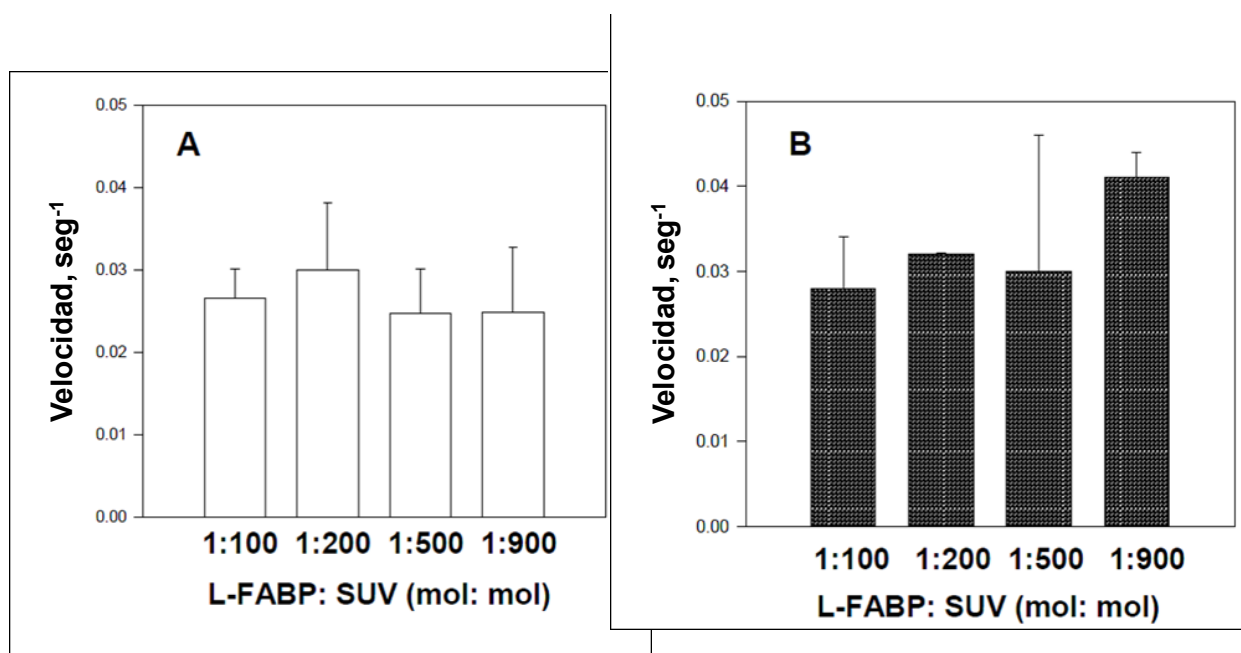


Fig. 4.4. Efecto de la concentración de vesículas aceptoras (SUV-EPC) en la transferencia de (A) 12AO y (B) MG12AO desde LFABP.

#### 4.6. Discusión.

Recientemente ha sido demostrado que el metabolismo intestinal de monoacilgliceroles se encuentra perturbado en los ratones nulos para LFABP, con menor incorporación de MG en TG y mayor cantidad usado para la biosíntesis de PL. Dado que no se encontraron cambios concomitantes en la expresión de genes relevantes en la síntesis de lípidos, se ha hipotetizado que LFABP podría participar en el tráfico de MG hacia la síntesis de TG (Lagakos et al. 2011). Asimismo, en ratones nulos para LFABP alimentados con dietas altas en ácidos grasos de cadena larga, se observó un aumento en el peso y grasa corporal, en particular, debido a alteraciones en la ingesta de alimento. Los niveles en la mucosa intestinal de los endocannabinoides 2-AG y araquidonoiletanolamina estaban elevados en estos ratones, lo cual podría contribuir a un aumento en la ingesta alimenticia (Gajda et al. 2013). Esta evidencia nos lleva a pensar que LFABP participaría en la unión, transporte y direccionamiento de MG en el intestino. Aunque, como se mencionó en la introducción, existen reportes conflictivos sobre la unión de LFABP a MG (Thumser and Wilton 1996; Storch 1993). A lo largo de este capítulo se mostraron estudios realizados con el fin de determinar si LFABP une MG.

En un trabajo en conjunto con el grupo de la Dra. Storch, se utilizó citosol de hígado de ratones WT y LFABP<sup>-/-</sup> con el fin de analizar si LFABP une MG en un contexto fisiológico. Como había sido demostrado por Martin et al (Martin, Danneberg, et al. 2003), se confirmó que los FAs marcados radioactivamente en el homogenato de hígado de animales WT se encuentran comprometidos entre dos compartimentos: una región de alto peso molecular de alrededor de 66kDa y una región de bajo peso molecular de aproximadamente 14kDa. Dado que en el presente experimento se perfundió el hígado con el fin de remover la sangre, la albúmina remanente se encontró en baja proporción, razón por la cual el pico a alto pesos moleculares no fue sustancial. El *western blot* mostró la presencia de LFABP en la fracción de peso molecular de ~14kDa, confirmando que LFABP está uniendo FAs en el citosol de hígado (Martin, Danneberg, et al. 2003). Resultados idénticos se encontraron usando MG radioactivamente marcado, donde las fracciones conteniendo proteínas de ~14kDa de citosol de hígado WT pero no de LFABP<sup>-/-</sup> retuvieron el ligando [<sup>3</sup>H]monooleína. Estos



resultados no sólo aportan evidencias que indican que LFABP une MG, sino que además lo hace *in vivo*, y es probable que sea la proteína intracelular de unión a MG mayoritaria en el hígado, así como en el intestino y riñón, donde LFABP también se expresa.

El análisis de equilibrio de unión usando la resina de interacción hidrofóbica Lipidex mostró que las afinidades de unión de LFABP por los ligandos FA y MG se encuentran dentro de rangos similares, aunque la afinidad por MG es aproximadamente 2 veces menor. Previamente, se reportó la estructura de la LFABP, confirmando la estequiometría 2:1 (FA:proteína), demostrando las diferencias estructurales entre las formas apo y holo de esta proteína (He et al. 2007). Asimismo, el grupo de la Dra. Stark continuó con el estudio de la estructura de LFABP unida a monooleína en solución por RMN, aportando evidencias de que esta unión es muy similar a la de la proteína unida a FAs, con 2 equivalentes de MG en posiciones similares a las adoptadas por 2 moléculas de FAs. En estadíos tempranos de la titulación de MG con LFABP (0.6-0.8 equivalentes de MG) o estadíos más tardíos (1.0-1.2 equivalentes de MG) se observan los principales cambios en la estructura de la proteína. La localización y el proceso de unión MG-LFABP se puede comparar con reportes previos del proceso de unión OA-LFABP, donde el primer ligando se ubica profundamente en la cavidad y el segundo se une posteriormente cercano a la superficie acuosa, y en el equilibrio en solución se observa proteína apo y holo (2 ligandos) (He et al. 2007). Las perturbaciones del esqueleto de la proteína durante la titulación MG-LFABP sugieren que el intercambio apo - holo (1 ligando) es más fácil que para el caso de OA-LFABP, sugiriendo interacciones más débiles de LFABP y el ligando MG, de acuerdo con lo exhibido por los estudios de equilibrio de unión.

Habiendo establecido claramente que LFABP une *in vivo* e *in vitro* MG, junto con el grupo de la Dra. Murota se estudió si LFABP podría servir como una proteína de transporte intracelular para MG. Con este fin se determinó la velocidad y el mecanismo de transferencia de MG desde LFABP hacia membranas en comparación con los resultados de transferencia de FAs. Se utilizaron los análogos fluorescentes 12AO y MG-12AO. Se demostró que el mecanismo de transferencia de MG12AO desde LFABP hacia SUVs involucra la difusión acuosa del lípido desde la proteína hacia la membrana, al igual que lo observado para 12AO (Storch 1993).

En resumen, LFABP es capaz de unir MG tanto *in vivo* como *in vitro*. Los altos niveles de expresión de LFABP en el intestino delgado (Ockner 1990) sugieren que sería capaz de transportar tanto FA como MG. Asimismo, IFABP no es capaz de unir MG (Storch 1993), además de que no han sido observadas alteraciones en el metabolismo de MG en ratones nulos para IFABP, en contraste con lo observado en ratones nulos para LFABP (Lagakos et al. 2011; Gajda et al. 2013). Queda por determinar cual/es proteína/s unen MGs en otros tipos celulares con altas tasas de síntesis de TG y lipólisis y que, por ende, generen grandes cantidades de MGs, tales como el adipocito. Actualmente no hay estudios que aclaren si la FABP de adipocito, u otros miembros de la familia de FABP, son capaces de unir MGs.

## *Estudios con células en cultivo.*

# **5. Análisis de la proliferación celular y metabolismo lipídico en una línea celular con la expresión de LFABP disminuida.**

### **5.1. Introducción e hipótesis de trabajo.**

Los estudios con los ratones nulos para LFABP (LFABP<sup>-/-</sup>) e IFABP (IFABP<sup>-/-</sup>) son modelos muy valiosos para analizar la importancia de estas proteínas en un contexto fisiológico completo. Pero, mientras que los resultados para IFABP<sup>-/-</sup> son bien definidos (Vassileva et al. 2000), los cambios observados en los ratones LFABP<sup>-/-</sup> no son del todo concluyentes, en particular debido a que la expresión de LFABP se da en varios tejidos y no se ha podido discernir si los cambios en el metabolismo lipídico se deben a la falta de la LFABP en hígado o en intestino (Vassileva et al. 2000; Newberry et al. 2010; Lagakos et al. 2011; Gajda et al. 2013). El análisis del comportamiento de estas proteínas en un entorno fisiológico más limitado, como el que ofrecen las células en cultivo, permitirá aportar aún más información sobre sus funciones específicas.

Los ensayos en cultivo representan un estadio intermedio de complejidad del sistema, y, en el caso de células del epitelio intestinal, la línea celular más ampliamente utilizada es la línea Caco-2, que deriva de un carcinoma de colon humano (Fogh, Fogh, and Orfeo 1977). Cuando son cultivadas a un 100% de confluencia se polarizan y comienzan a desarrollar espontáneamente características de las células maduras del las vellosidades epiteliales del intestino delgado. Las células forman una monocapa como la de un epitelio en columna con uniones intercelulares estrechas y una membrana apical diferenciada con microvellosidades y organizada tipo “ribete en

cepillo". Cuando se crecen sobre una membrana permeable puede accederse independientemente a los compartimentos basal y apical. Esto se vuelve relevante para estudiar los lípidos y las lipoproteínas que secretan estas células por la cara basolateral, quilomicrones principalmente (Luchoomun 1999). Las células Caco-2 expresan mayor cantidad de LFABP que IFABP, como sucede en los enterocitos humanos normales (Levy et al. 2009). Particularmente la expresión de IFABP puede ser regulada por factores nutricionales así como por componentes de la matriz extracelular (Darimont and Gradoux 1998; Dubé et al. 2001). Sin embargo, las células Caco-2 tienen algunas características distintas a los enterocitos normales. Por un lado sintetizan principalmente Apolipoproteína B100 (Apo B100), en lugar de Apo B48, expresan bajos niveles de Monoacilglicerol-Acil-Transferasa (MGAT) y menor cantidad de IFABP que los enterocitos normales (Trotter and Storch 1993; Reisher et al. 1993; Darimont and Gradoux 1998). A pesar de estas diferencias, las células Caco-2 son el modelo celular más fiel y mejor caracterizado en cuanto a la absorción, el metabolismo y el transporte de nutrientes en epitelio intestinal (Sambuy et al., 2005).

La hipótesis de que las FABPs funcionan como transportadores intracelulares de ácidos grasos (FAs) es apoyada por la abundante evidencia que indica que, tanto en intestino como en hígado, la modulación de las velocidades de asimilación de FAs o de su utilización en respuesta a variaciones nutricionales, hormonales o farmacológicas correlacionan con los niveles de FABP en el citosol (Bass 1985; Mishkin, Yalovsky, and Kessler 1975). El estudio de las velocidades de transferencia de FAs entre FABP y membranas demostró las diferencias en el mecanismo y las velocidades absolutas de transferencia de FAs desde las FABP intestinales (Hsu and Storch 1996), sugiriendo que ambas proteínas desempeñan funciones diferentes en las células intestinales epiteliales en la regulación del transporte y utilización de FAs. LFABP podría funcionar como un buffer citosólico, IFABP podría estar involucrada en el direccionamiento de los FAs desde y/o hacia estructuras subcelulares membranosos o vías metabólicas específicas.

Como se describió en el capítulo anterior, LFABP presenta algunas características únicas dentro de las FABPs como por ejemplo la capacidad de unir una amplia diversidad de ligandos, así como la posibilidad de acomodar en su cavidad dos FAs a la vez. El análisis *in vitro* de transferencia de ácidos grasos desde LFABP hacia

membranas artificiales ha demostrado que presenta un mecanismo de transferencia de ligandos mediado por difusión acuosa (Hsu and Storch 1996), aunque los estudios de interacción con membranas han evidenciado que es capaz de interaccionar con las mismas (Falomir-Lockhart et al. 2011). Esto podría indicar que en realidad, el mecanismo “difusional” es un sustituto por la falta de proteínas en un sistema tan simplificado, y que los verdaderos aceptores de FAs dentro de la célula podrían ser componentes proteicos y no membranas fosfolipídicas. Por tal motivo es importante analizar el comportamiento de la LFABP en un entorno más cercano a un organismo vivo, como son las células en cultivo. De hecho se ha comprobado la interacción de LFABP en el núcleo con los Receptores Activadores de la Proliferación Peroxisomal tipo  $\alpha$  y tipo  $\beta$  (PPAR $\alpha$  y PPAR  $\beta$ ), cediéndoles sus FAs y ligandos hidrofóbicos en células de hígado (Huang et al., 2004; McIntosh et al., 2009), apoyando la intervención de las FABPs en la regulación génica llevando señales lipídicas hacia el núcleo. Más recientemente, se describió la interacción de LFABP con HNF4 $\alpha$ , un receptor de hormona esteroidea conocido por la transcripción de genes involucrados en el crecimiento, diferenciación e inflamación tanto en hígado como intestino (Babeu and Boudreau 2014; McIntosh et al. 2013).

El intestino delgado no sólo es capaz de asimilar y procesar las grandes cantidades de lípidos que se incorporan con la dieta, sino también adapta su metabolismo a distintas condiciones de disponibilidad de nutrientes. Los triacilglicéridos (TG) provenientes de la dieta son hidrolizados en la luz intestinal para ser asimilados por el enterocito como FAs libres y MGs que luego son reesterificados y secretados formando parte de los quilomicrones por la cara basolateral. Se supone que las FABPs que se expresan en enterocitos favorecerían el transporte intracelular de lípidos así como también participarían de la regulación del metabolismo lipídico. En particular, se hipotetiza que las posibles funciones de LFABP en el epitelio intestinal serían como buffer citosólico y/o de transportador de ligandos hidrofóbicos. Mediante técnicas de bioquímica, biología molecular y biología celular se desea estudiar la participación de LFABP en el metabolismo lipídico, proliferación y diferenciación celular de células Caco-2, y así contribuir a la identificación del rol específico de las FABP intestinales.

En este caso se planea emplear la técnica del anti-ARNm para lograr disminuir la expresión de LFABP de modo estable en células Caco-2, las cuales expresan bajos niveles de IFABP. De este modo se podrá evaluar el funcionamiento celular prácticamente en ausencia de FABP intestinales que actúen como transportadores de lípidos. Así, la comparación con las células control nos brindará información valiosa acerca de las funciones que cumple la LFABP en los enterocitos.

Los estudios propuestos a continuación complementarán los resultados obtenidos con los animales nulos y ayudarán a dilucidar el rol que LFABP cumpliría en los enterocitos. La generación y caracterización de un modelo de células Caco-2 carente de LFABP representa la obtención de una herramienta muy importante que permitirá estudios posteriores, que podrían consistir en modificar niveles de IFABP o variantes estructurales de la misma. Esto expandiría aún más nuestra comprensión sobre el rol de estas proteínas y de sus dominios específicos, en un contexto más próximo al fisiológico que los clásicos ensayos *in vitro*.

## 5.2. Obtención de poblaciones con la expresión disminuida de LFABP.

Con el fin de analizar el rol de la LFABP en el metabolismo lipídico del enterocito intestinal, se construyó el plásmido pcDNA3.1-ASL (Fig. 5.1), basado en el vector pcDNA3.1-Neo(+) (Invitrogen) donde se insertó el ADNc de la proteína LFABP humana en “antisentido”, a partir del cual se transcribe el anti-ARNm de la misma. Cuando este plásmido es introducido dentro de las células Caco-2, se silencia la expresión de LFABP para así poder comparar los cambios en el metabolismo de FAs en comparación con la línea control que porta el vector vacío.

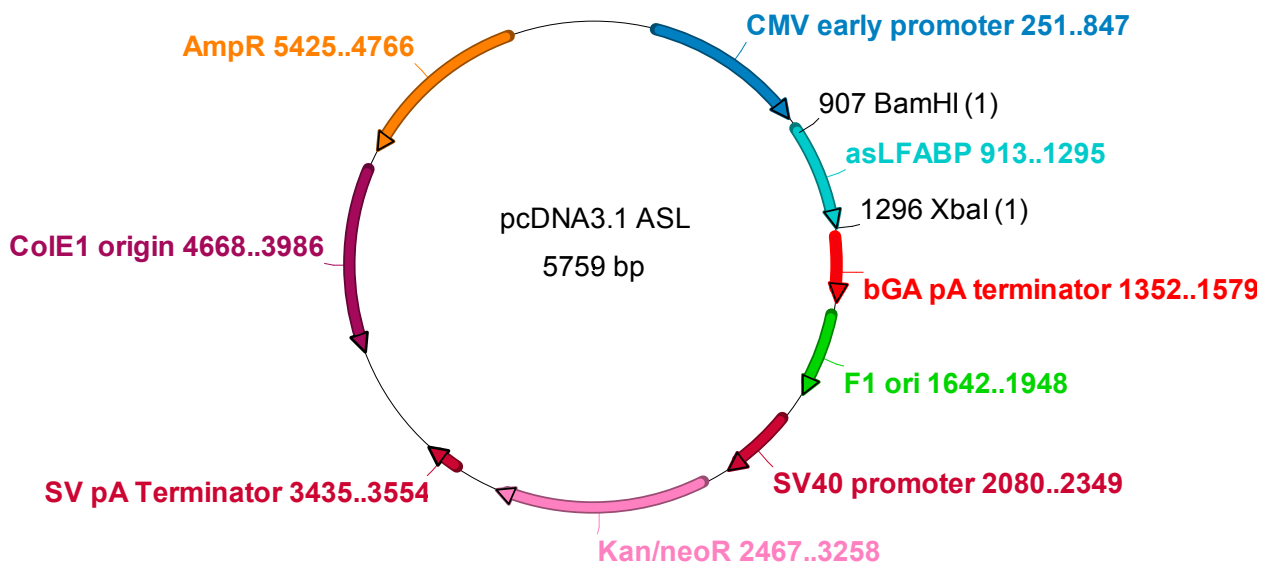


Fig.5.1. Mapa del plásmido pcDNA3.1-ASL. Se muestran los sitios de corte de las enzimas BamHI y XbaI, el inserto de cDNA de LFABP antisentido, el promotor CMV, los terminadores poliA bGA y SV, los promotores de E. Coli y SV40, y los genes de resistencia a antibiótico, Ampicilina y Kan/Neo. En cada caso se indica la localización en pares de base.

Se realizó el chequeo de la especificidad del anti-ARNm mediante el uso de un *nucleotide* BLAST. Se alineó la secuencia del ADNc de la LFABP humana, usada como *query* –interrogante-, con una base de datos de ADN genómico humano. Se usaron los programas *megablast* (busca secuencias altamente similares) y *blastn* (busca secuencias parcialmente similares), obteniéndose sólo como resultado la secuencia de LFABP, corroborando la especificidad del ARNm antisentido.

El correcto ensamble del constructo pcDNA3.1-ASL fue chequeado mediante el corte con las respectivas enzimas de restricción, BamHI y XbaI, así como por su secuenciación.

Las células Caco-2 fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-ASL empleando el reactivo Lipofectamina (Invitrogen). Se realizó la transfección en paralelo con un vector pcDNA3.1 vacío, de modo de obtener una línea control, y con un vector pcDNA3.1-GFP, como control de transfección. A las 48 hs, se tomaron imágenes usando un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71 con un filtro verde. Como se observa en la Fig. 5.2, el plásmido posee una eficiencia de transfección de aproximadamente un 25%. Las células transfectadas se incubaron durante 15 días en un medio suplementado con 1 mg/ml Geneticina (G418) para seleccionar exclusivamente a las células que incorporaron el plásmido. Luego fueron tripsinizadas y diluídas para poder aislar distintas poblaciones clonales y no clonales. Las poblaciones clonales se obtuvieron mediante selección usando anillos de clonación.

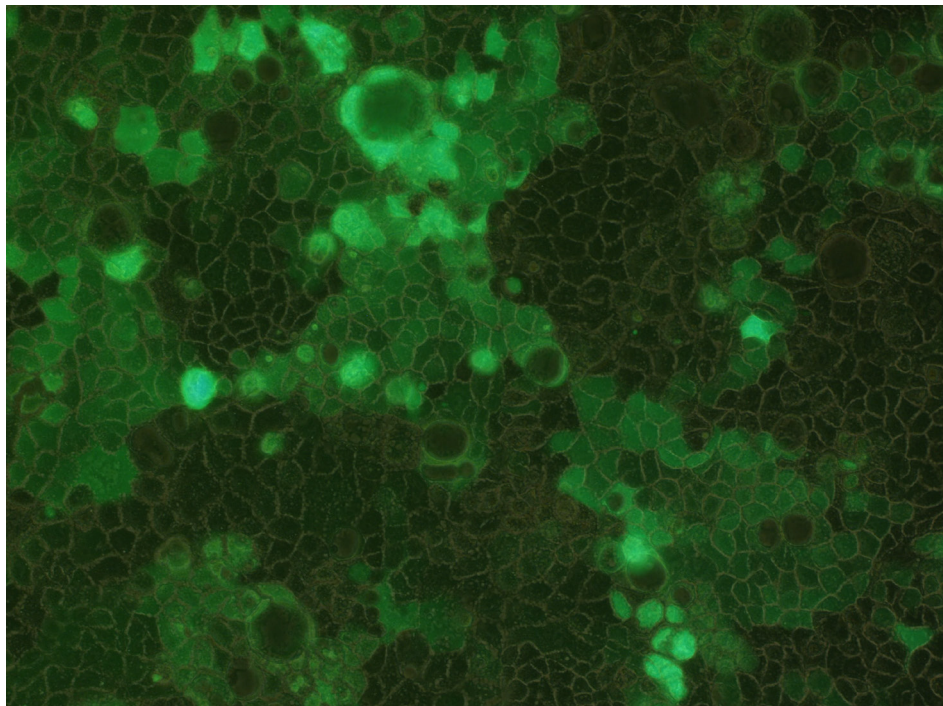


Fig.5.2. Imagen tomada a las 48hs de realizada la transfección con el plásmido pcDNA3.1-GFP como control de transfección. Superposición del mismo campo tomado con contraste de fase y filtro de fluorescencia verde, 40X.



Se obtuvieron dos poblaciones clonales, N1 y N3, una población no clonal, aL, y una población control, C. La disminución de la expresión de la proteína LFABP fue chequeada mediante un ensayo de Western Blot. En la Fig. 5.3, se muestra un Western Blot de las poblaciones seleccionadas y crecidas durante una semana para obtener masa celular suficiente. Se observa una clara disminución de la expresión de la proteína respecto a la línea control. Se realizó el análisis por densitometría para cuantificar el porcentaje de LFABP remanente en cada línea (Tabla 5.1).

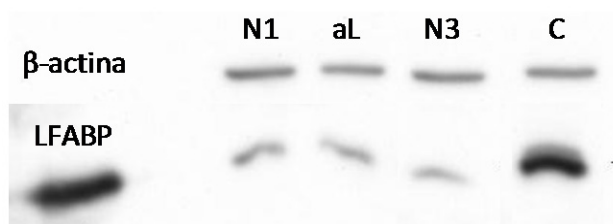


Fig. 5.3. Análisis por Western Blot de la expresión de LFABP y  $\beta$ -Actina, de células Caco-2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-ASL y células control (C) transfectadas con el plásmido vacío. N1 y N3 son poblaciones clonales, aL es una población no clonal. La banda indicada debajo de LFABP, es LFABP purificada 0.5  $\mu$ g.

Tabla 5.1. %LFABP remanente respecto a las células control.

			<b>N1</b>	<b>N3</b>	<b>aL</b>
<b>%LFABP</b>	<b>respecto</b>	<b>al</b>	12.8	10	16.4
		<b>control</b>			

Asimismo se chequeó si existe algún tipo de compensación de la expresión de IFABP (Fig. 5.4), sin encontrarse diferencia entre las líneas con la expresión de LFABP disminuída y la línea control, apoyando la hipótesis de funciones diferenciales para estas dos proteínas.

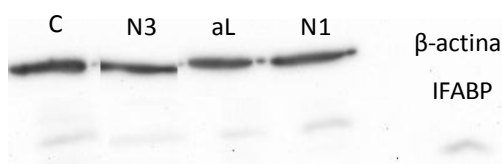


Fig. 5.4. Análisis por Western Blot de la expresión de IFABP y  $\beta$ -Actina, de células Caco-2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-ASL y células control (C) transfectadas con el plásmido vacío. N1 y N3 son poblaciones clonales, aL es una población no clonal. La banda indicada debajo de IFABP, es IFABP purificada 0.5  $\mu$ g.

### 5.3. Proliferación y diferenciación celular.

Las poblaciones N1, N3 y aL fueron evaluadas comparándolas con la población control en cuanto a su capacidad de crecimiento. Primero se evaluó su capacidad de proliferación por recuento en cámara de Neubauer a distintos tiempos. Las células control mostraron un tiempo de duplicación ( $t_D$ ) cercano al que generalmente muestran las células Caco-2 en cultivo que es alrededor de 32-40 hs (Sambuy et al. 2005). Sin embargo, las poblaciones N1 y aL mostraron una significativa disminución de la velocidad de crecimiento, unas 47 hs aproximadamente, en comparación a las 39 hs de las células control. La población N3 fue la que mostró una mayor diferencia en su  $t_D$ , siendo el mismo de 59 hs. La Fig. 5.5 muestra las curvas de crecimiento de los cuatro cultivos y en la Tabla 5.2 se indican los valores de  $t_D$ .

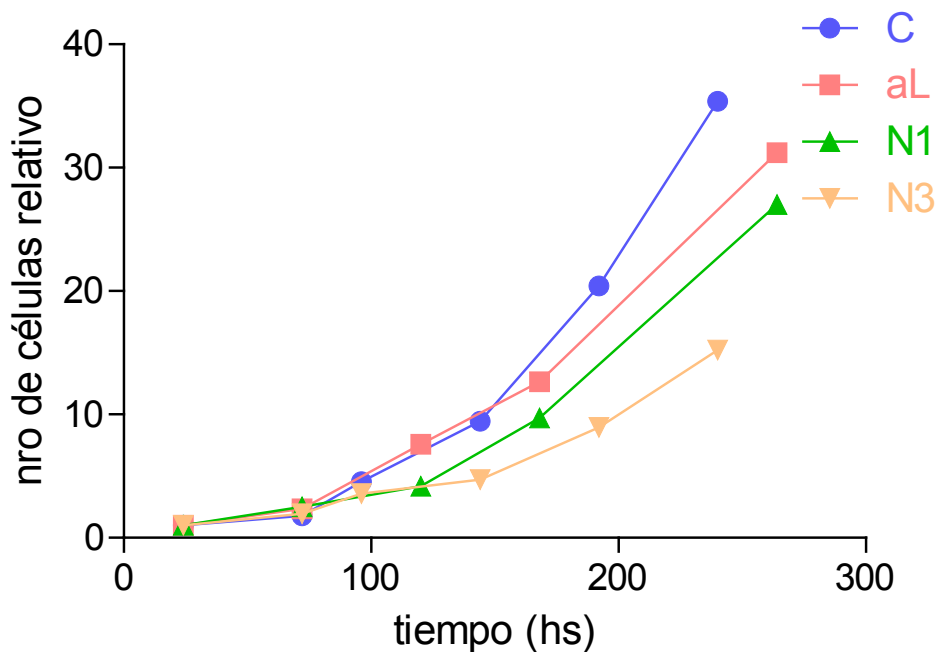


Fig. 5.5. Curvas de crecimiento. Las poblaciones N1, N3 y aL se crecieron en placas de 60 mm desde un inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  células/placa en comparación con las células control. El recuento de células a distintos días se empleó para calcular el tiempo de duplicación (Tabla 5.2) ajustando la curva a una exponencial de crecimiento simple.

Tabla 5.2. Tiempo de duplicación. Promedio de la menos tres determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

	Tiempo de duplicación $t_D$ (hs)
<b>control</b>	39 $\pm$ 2
<b>aL</b>	47 $\pm$ 1
<b>N1</b>	47 $\pm$ 1
<b>N3</b>	59 $\pm$ 2

Los resultados anteriores se corresponden con los obtenidos al medir la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina durante 4hs. Las poblaciones N1, N3 y aL mostraron una disminución significativa de la incorporación de este metabolito en el DNA respecto a las células control (Fig. 5.6). Estos resultados en conjunto demuestran una disminución en la capacidad de proliferación en las poblaciones con una disminución de la expresión de LFABP.

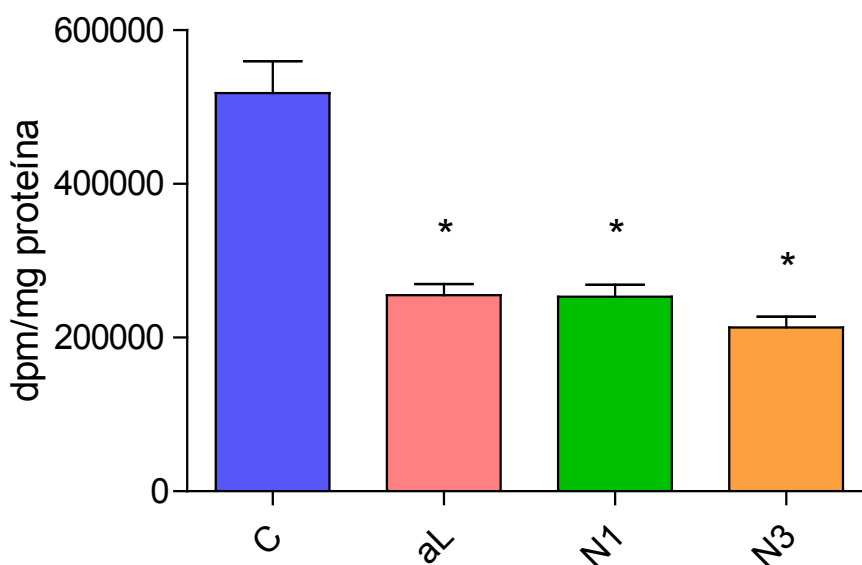


Fig.5.6. Incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina en células Caco-2 con la expresión de LFABP disminuida. \*  $p < 0.05$  respecto a la línea control.

Las Células Caco-2 se diferencian adquiriendo muchas de las características de los enterocitos normales cuando se crecen a una confluencia superior al 100% (Sambuy et al. 2005). Si este procedimiento se desarrolla en filtros de cultivo transwell (Corning Costar) es posible acceder en forma independiente al espacio apical, análogo a la luz intestinal, y al basal, equivalente al espacio intersticial o la linfa (Fig. 5.7). Durante esta diferenciación, que lleva unos 15-21 días, se forma una monocapa de células impermeable al pasaje de nutrientes entre la cara apical y basal, y este proceso puede seguirse por el aumento de la resistencia eléctrica de la monocapa con un potenciómetro ELS Voltimeter (Millipore). A partir del décimo día también comienzan a aumentar la expresión de enzimas marcadoras propias del epitelio del intestino absorptivo, como las disacaridasas, pero la diferenciación completa se considera una vez que la monocapa ha alcanzado una resistencia eléctrica de  $250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

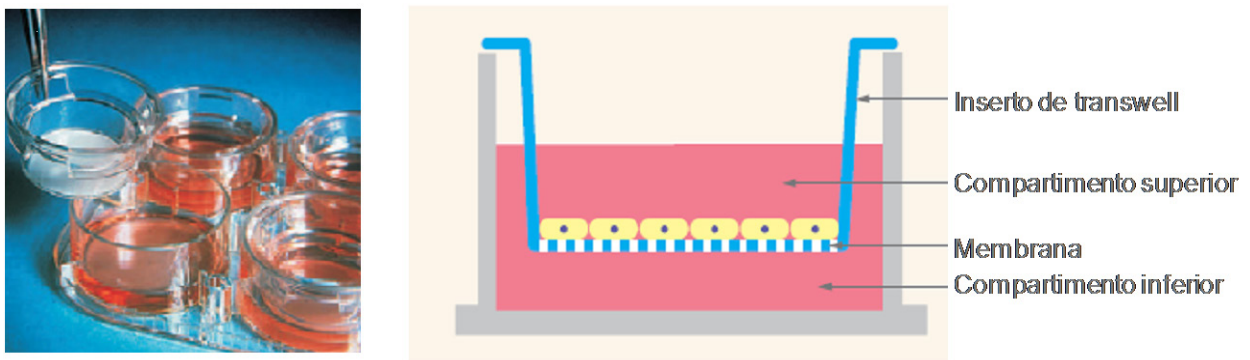


Fig. 5.7. Esquema y fotografía de insertos transwell, tomado de la guía de transwell de Corning Costar.

Se decidió evaluar el proceso de diferenciación en las poblaciones con la expresión de LFABP disminuida. Se midió la resistencia transmembrana (TEER) en filtros transwell de 6.5mm de diámetro (sup.  $0.33 \text{cm}^2$ ) hasta alcanzada la diferenciación de las tres líneas celulares evaluadas. aL y N1 mostraron un retraso en la formación de la monocapa impermeable, evidenciado por los menores valores de TEER en comparación con la línea control (C) (Fig. 5.8). En el lapso de los 21 días las tres poblaciones llegaron a su diferenciación total, superando los  $250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . En este caso se observa nuevamente la tendencia observada al analizar la proliferación celular, donde las poblaciones N1 y aL mostraron valores menores de TEER en los primeros días (hasta el día 10) del proceso de diferenciación.

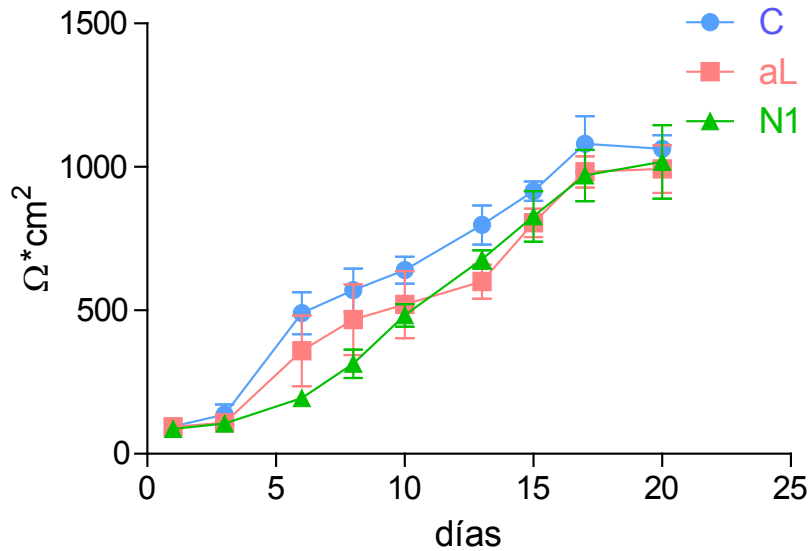


Fig. 5.8. Medida de la resistencia transmembrana a lo largo del proceso de diferenciación celular de las líneas C, aL y N1.

Como se estableció en el capítulo introductorio, los FAs son fundamentales para el crecimiento celular, tanto como componentes estructural de membranas, como por su gran aporte energético. Los parámetros de viabilidad aquí analizados son necesarios para el mantenimiento de las células en cultivo y el diseño de los experimentos metabólicos; pero también pueden estar revelando un vínculo entre la expresión de LFABP con la proliferación celular. Generalmente se acepta que el grado de diferenciación celular viene acompañado de una disminución de la velocidad de crecimiento celular. En este caso las poblaciones con menor velocidad de crecimiento también mostraron un retraso en la diferenciación celular. Al parecer, la disminución de la expresión de LFABP disminuye la capacidad de proliferación celular y afecta la diferenciación de las células Caco-2. Esto podría estar vinculado al rol de transporte de esta proteína hacia una ruta de síntesis de componentes esenciales para la duplicación o la diferenciación de la célula, o hacia el núcleo para la regulación génica del proceso mitótico o de diferenciación celular. Por otro lado, se ha asociado a la LFABP con la oxidación de FAs a nivel mitocondrial; por lo que la falta de LFABP podría comprometer la obtención de energía o el censado de una reserva de TG suficiente para completar el proceso de división celular. En definitiva, experimentos específicos serán necesarios para analizar las razones por las cuales la ablación de LFABP prolonga el  $t_D$  y disminuye

la velocidad de asimilación de  $^3\text{H}$ -Timidina al tiempo que enlentece la diferenciación celular.

Por razones prácticas referidas al crecimiento más lento del clon N3, los experimentos que se describen a continuación se realizaron exclusivamente con la línea N1 y aL y las células control.

#### **5.4. Asimilación de ácido oleico.**

Para simular la asimilación de FAs por los enterocitos desde la luz del intestino, las distintas líneas de células Caco-2 se crecieron y diferenciaron en filtros transwell durante 21 días. Luego de chequear con el voltímetro que las células se han diferenciado (resistencia  $>250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), se incubaron con una suspensión de ácido oleico (OA) 100  $\mu\text{M}$  y 10 mM taurocolato de sodio en buffer fosfato salino (PBS), tal que la concentración de OA libre es 1.6  $\mu\text{M}$ , apenas por debajo de los niveles postprandiales (Murota & Storch, 2005). Se analizó la asimilación de OA a distintos tiempos, en filtros transwell de 4.5  $\text{cm}^2$ . El ensayo se realizó a los 2 min y 6.5 hs (390 minutos). Como se puede apreciar en la Fig. 5.9, se observó una disminución de la capacidad de asimilación total de OA tanto por las células N1 y aL respecto a las células control. Esta diferencia se mantiene al repetir el análisis en un tiempo más prolongado (6.5hs). Es importante tener en cuenta que los niveles de OA en el citoplasma a las 6.5 hs no son proporcionales al tiempo de incubación en comparación con los resultados observados a 2 min. Esto se debe a que parte del OA asimilado durante 6.5 hs ha sido secretados por la cara basolateral, por lo cual no se observa entre el pool de lípidos citoplasmáticos aquí analizado.

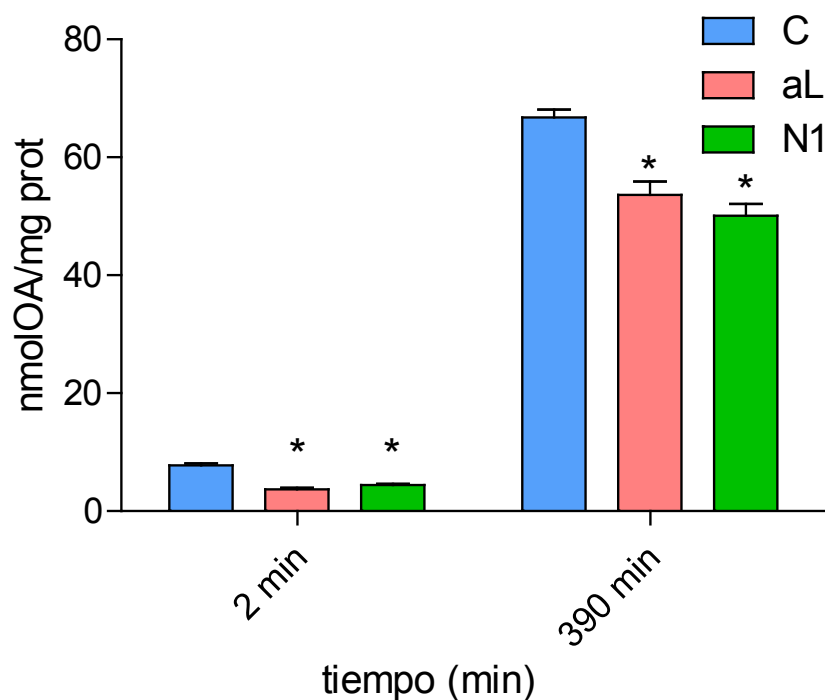


Fig. 5.9. Asimilación de OA a distintos tiempos. Células Caco-2 con la expresión de LFABP disminuida y células control diferenciadas fueron incubadas en filtros transwell con la suspensión de 100  $\mu$ M OA (10%  $^{14}$ C-OA) y 10 mM taurocolato de sodio en PBS por 2 min o 390 min (6.5 hs). \*  $p < 0,05$  respecto a la línea control.

Con el fin de caracterizar las líneas obtenidas, se realizó el mismo ensayo de captación, pero en 20 seg, tiempo en el cual el OA es captado sin ser metabolizado aún (Murota & Storch, 2005), variando la concentración de OA desde 2 hasta 200  $\mu$ M, manteniendo siempre un 1%  $^{14}$ C-OA en cada solución usada. Cuando se grafican estos resultados (Fig. 5.10) en función de la concentración de monómero de FA libre, estimada como el 1.5% de la concentración total de FA en la solución de 10 mM taurocolato de sodio en PBS (Murota & Storch, 2005), se observa un comportamiento de tipo saturable. Esto remarca la importancia de la LFABP en el proceso de captación de OA a través de la cara apical en las células Caco-2. Esto nos indica que el proceso es mediado por transportadores de membrana dentro del rango de concentraciones analizadas.

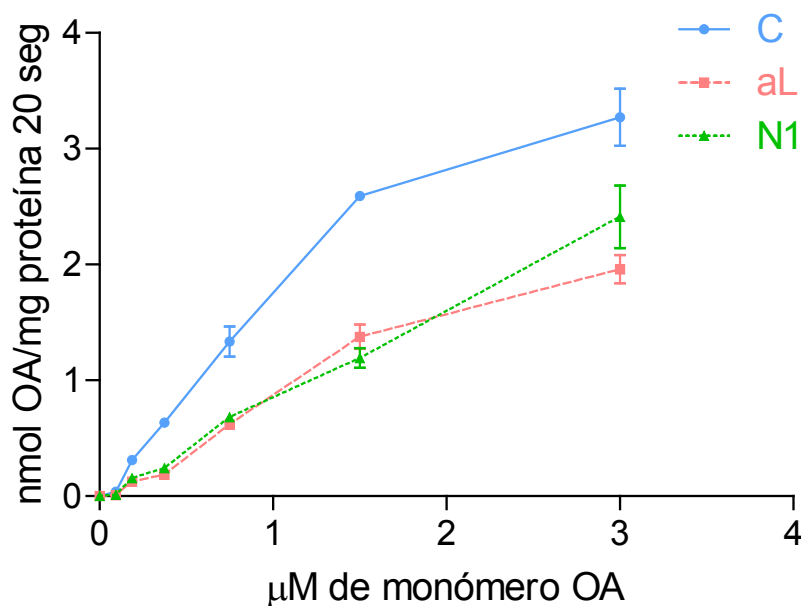


Fig. 5.10. Determinación de la captación de OA células Caco-2 con la expresión de LFABP disminuida. Las células se incubaron durante 20 seg con concentraciones de OA entre 2 y 200 mM. La cantidad de OA asimilado se normaliza por el contenido de proteína y los resultados se expresan en función de la concentración de monómero libre, aquí estimados como el 1,5% de la concentración total en la solución de taurocolato de sodio 10 mM en PBS.

Los resultados de la asimilación de las células control están dentro del rango publicado para las células de la línea Caco-2 original (Murota & Storch, 2005). Esto nos permite referir los cambios observados en las poblaciones N1 y aL a la eliminación de la expresión de LFABP. Este sistema puede ser analizado usando la ecuación de Michaelis-Menten (Murota and Storch 2005). En la tabla 5.3 se muestran las  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) y  $V_{max}$  (velocidad máxima). La  $V_{max}$  no cambia entre la línea control y las líneas con la expresión disminuida de LFABP, pero si se observa una disminución del OA asimilado por N1 y aL a bajas concentraciones, como se refleja en el aumento en la  $K_m$  de N1 y aL. De este modo, los resultados hasta aquí presentados muestran que, a pesar de que LFABP es una proteína intracelular, y que se sabe que los FAs ingresan desde la cara apical del enterocito mediante difusión pasiva o usando un transportador (FATP4 o CD36), la disminución de su expresión produjo una reducción en la captación de ácido oleico. LFABP no parece ser indispensable para la asimilación de FAs, pero si tener un notorio efecto favorecedor sobre la velocidad de



asimilación de OA, como se ve por el aumento en la Km de las líneas aL y N1. La expresión de LFABP modularía la capacidad de la célula de captar ácidos grasos debido a su función en el transporte y direccionamiento de los mismos, posiblemente aceptando los FAs de la membrana plasmática apical.

Tabla 5.3. Km y Vmax.

	<b>Km (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>Vmax (<math>\mu\text{mol/mg prot}</math>)</b>
<b>C</b>	2.70 $\pm$ 0.69	6.43 $\pm$ 0.97
<b>aL</b>	6.25 $\pm$ 2.84	6.02 $\pm$ 2.07
<b>N1</b>	5.65 $\pm$ 1.47	6.22 $\pm$ 0.96

Promedio de al menos tres determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

### 5.5. Metabolismo de ácido oleico.

En la sección anterior comprobamos que LFABP participa de la asimilación de FAs a través de la cara apical, pero para analizar el metabolismo interno y la secreción de lípidos es necesario analizar la incorporación de los FAs en los distintos grupos de lípidos intracelulares. La asimilación durante 10 ó 20 seg es demasiado corta para ver un metabolismo significativo, por lo que los ensayos se realizaron a 2 min y 6.5 hs (390 minutos) en filtros de 4.5 cm<sup>2</sup> con 1ml de suspensión de 100  $\mu\text{M}$  OA y 10 mM taurocolato de sodio en PBS (10% <sup>14</sup>C-OA). Las células fueron cosechadas como en los ensayos anteriores y se separó una fracción para el aislamiento de lípidos que luego son separados por cromatografía en capa fina (TLC). La Fig. 5.11 muestra la distribución de marca en fosfolípidos (PL), monoacilglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG), FA libres (FFA), triacilglicéridos (TG) y ésteres de colesterol (EC) en una placa de TLC modelo.

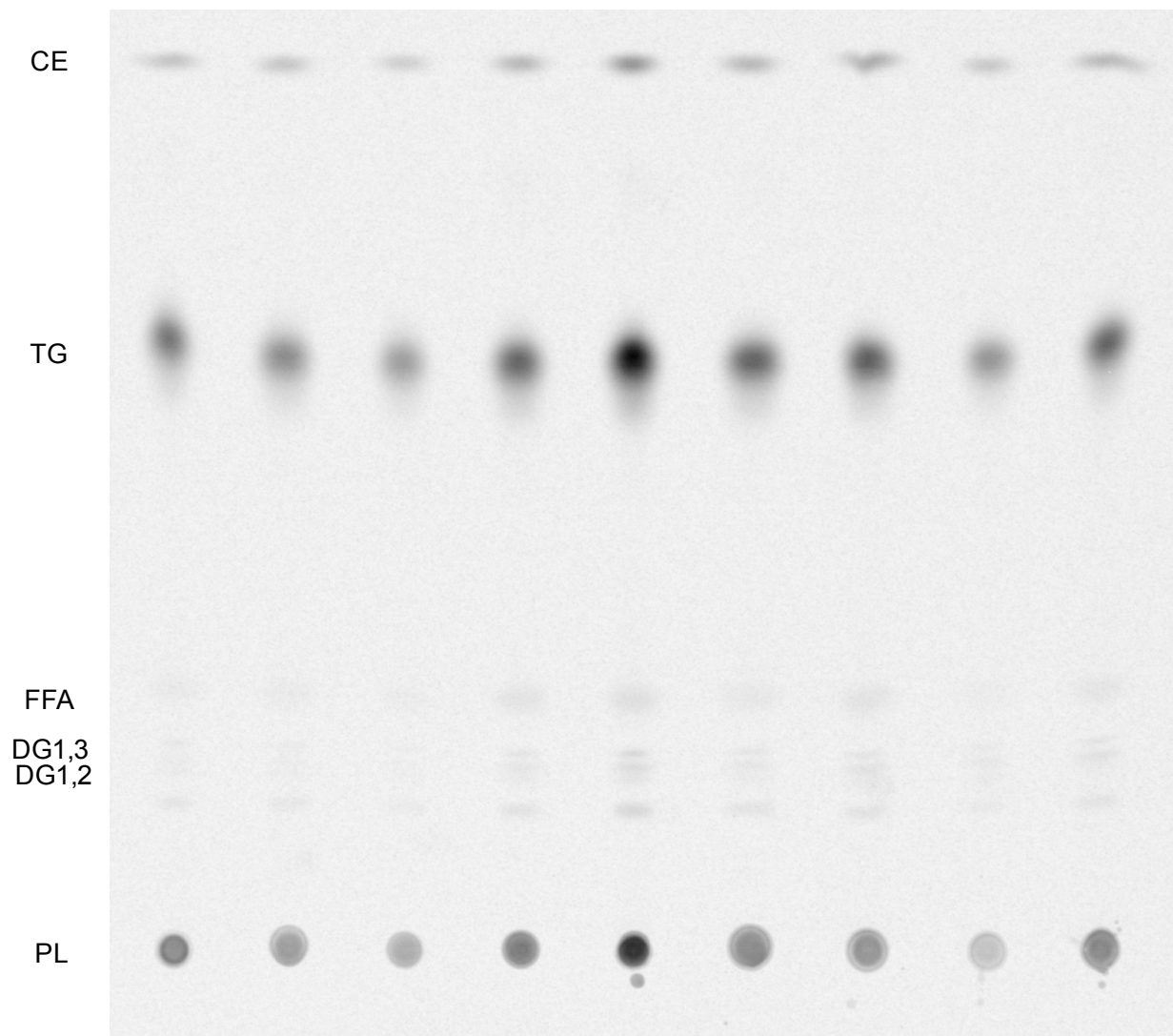


Fig. 5.11. Placa de TLC donde se indican las distintas fracciones de lípidos neutros separados. Se corrió un estándar de homogenato de hígado con cada pool de muestras con el fin de identificar los distintos lípidos.

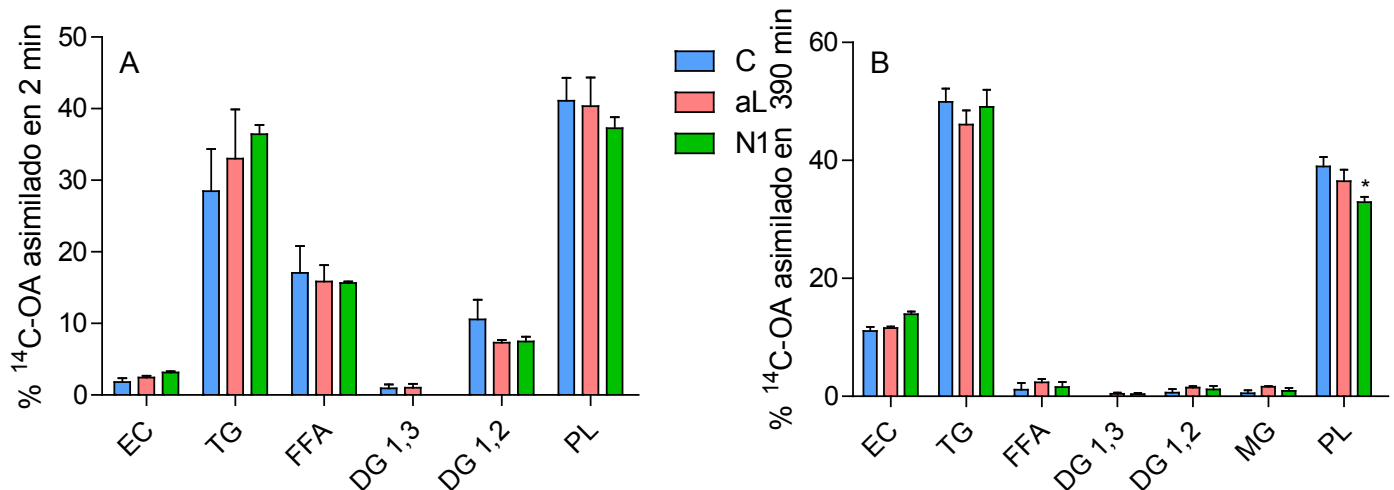


Fig. 5.12. Distribución del OA asimilado a través de la membrana apical en distintas fracciones lipídicas separadas por TLC. Análisis de la distribución de OA asimilado luego de 2 min (A) y 6,5 hs (B) en N1, aL y células control. \*  $p < 0,05$  respecto a la línea control.

Como se observa en la Fig. 5.12, a 2 min (A), la distribución porcentual del OA asimilado en los principales grupos de lípidos no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las líneas control y N1 y aL, aunque si se observan tendencias. Particularmente, en las líneas con la expresión de LFABP disminuida se observa una mayor incorporación de OA en TG a los 2 min y una pequeña disminución de la marca incorporada en PL. A las 6.5 hs N1 evidencia una disminución de la incorporación de marca en la fracción de PL. Esto mismo se observa también para la línea aL, aunque no llega a haber diferencia estadísticamente significativa. El resto de las fracciones lipídicas no evidencian cambios respecto al control.

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

Asimismo se analizaron los lípidos totales secretados a distintos tiempos. Se puede observar en la Fig. 5.13 que tanto a los 2 min como a las 6.5 hs, la cantidad total de OA secretado es significativamente menor en las líneas aL y N1.

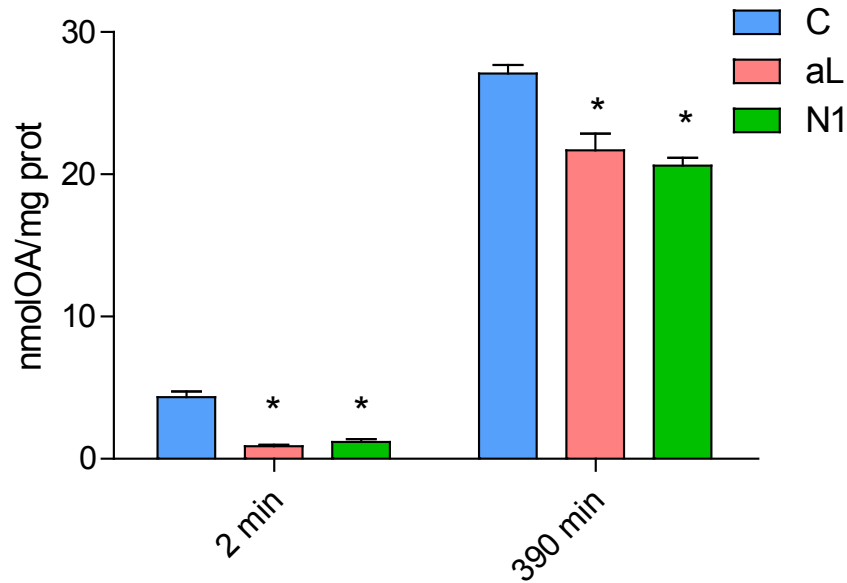


Fig. 5.13.  $^{14}\text{C}$ -OA en lípidos totales secretados a distintos tiempos. Los lípidos secretados por la cara basal de las células Caco-2 incubadas por 2 min y 6.5 hs con  $100\ \mu\text{M}$  OA y  $10\ \text{mM}$  taurocolato de sodio en PBS en la cara apical, se aislaron y se cuantificó la radioactividad. \*  $p < 0,05$  respecto a la línea control.

También se analizó la distribución en las distintas fracciones lipídicas del OA secretado mediante una TLC. En la Fig 5.14 A, no se observan cambios entre la distribución de OA en la línea control y las líneas con la expresión de LFABP disminuida. Por otro lado, en la Fig. 5.14 B, se muestra la distribución de OA en las distintas fracciones lipídicas luego de una incubación de 6.5 hs. Se observa una disminución de la fracción de TG mientras que aumenta la fracción de FFA, ambas estadísticamente significativas, en las líneas aL y N1. También se observa una tendencia en la disminución de PL en las líneas con la expresión de LFABP disminuida.

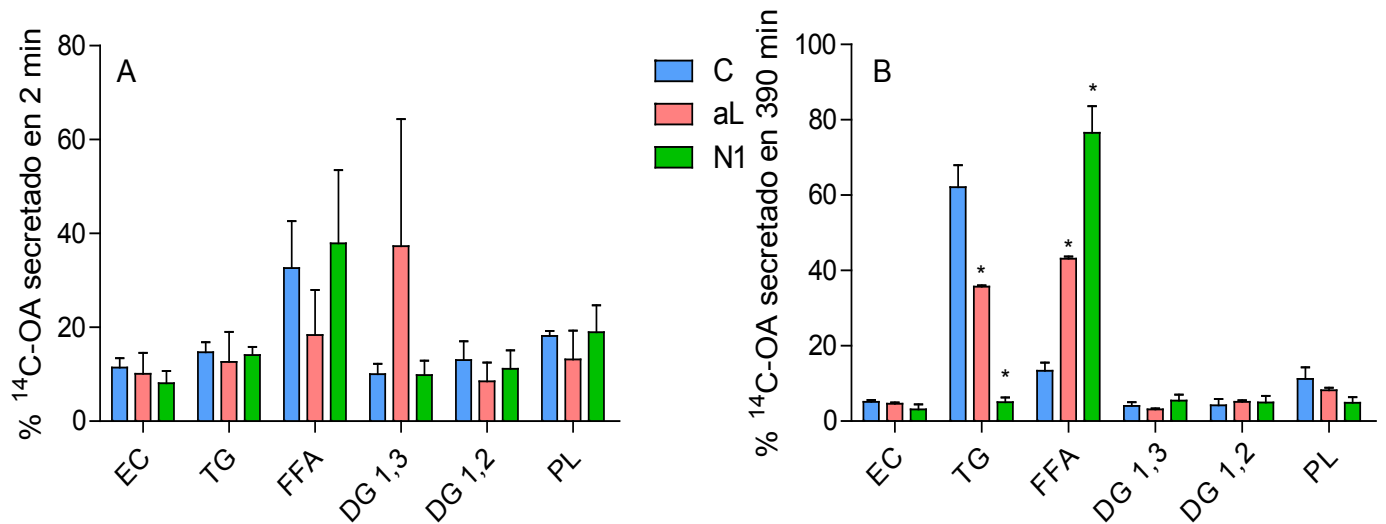


Fig. 5.14. Distribución del OA secretado a través de la membrana basolateral en distintas fracciones lipídicas separadas por TLC. Análisis de la distribución de OA asimilado luego de 2 min (A) y 6,5 hs (B) en N1, aL y células control. \*  $p < 0,05$  respecto a la línea control.

Estos resultados muestran que LFABP podría ser importante para los pasos iniciales de la metabolización del OA. Asimismo, la disminución de LFABP provoca una disminución en la secreción de lípidos por la cara basolateral, apoyando la hipótesis que LFABP forma parte de la vesícula prequilomicronica que se ensambla en el enterocito previa a la secreción de quilomicrones (Neeli et al. 2007). El cambio en la distribución de marca radioactiva en las fracciones lipídicas secretadas indicaría un defecto en la reesterificación de los TG que serán secretados basolateralmente, aumentando la fracción de FFA. La disminución de LFABP nos permite hipotetizar que LFABP podría estar interactuando con las enzimas que catalizan la síntesis de TG para formar el complejo lípido-proteína que finalmente será secretado como quilomicron a la linfa.

## 5.6. Discusión.

Los ensayos *in vitro* permiten obtener gran cantidad de información sobre las FABPs, pero para avanzar sobre el rol específico que estas proteínas cumplen *in vivo* es necesaria una aproximación más cercana al funcionamiento real de las mismas. Los ensayos con células Caco-2 en cultivo representan un estadio de complejidad intermedio y fundamental, en el cual podemos analizar el efecto que tiene la expresión de las FABPs intestinales en el entorno celular.

Aunque más experimentos son necesarios para comprobar la participación específica de LFABP, pudimos demostrar que LFABP participa de varios procesos celulares: el crecimiento celular, la diferenciación de las células Caco-2, la asimilación de FAs y su metabolismo posterior. La disminución de los niveles de esta proteína retrasan el crecimiento y la diferenciación celular tanto en las poblaciones clonales N1 y N3, como en la población no clonal aL. Este retraso en la proliferación celular puede relacionarse con la capacidad de captación de FAs disminuida que presentan estas líneas celulares, que podría llevar a una disminución en la síntesis de PL. Además se ha asociado a la LFABP con la oxidación de FAs a nivel mitocondrial (Erol et al. 2003); por lo que la falta de LFABP podría comprometer la obtención de energía o el censado de una reserva de TG suficiente para completar el proceso de división celular. LFABP podría participar en la regulación de la expresión de genes relacionados con el crecimiento y diferenciación celular, y una disminución de la expresión de la proteína podría interferir con estos procesos. Recientemente se ha descrito la interacción entre LFABP y el receptor nuclear HNF4 $\alpha$  (McIntosh et al. 2013). En el intestino, HNF4 $\alpha$  es importante para mantener la diferenciación celular del epitelio (Lussier et al. 2008), el metabolismo lipídico (Marcil et al. 2010) y las uniones célula-célula (J.-P. Babeu et al. 2009). El estudio de esta interacción proteica en este modelo celular con la expresión de LFABP disminuida podría aportar información valiosa y ayudar a dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos en el crecimiento y diferenciación observados.

LFABP es una proteína intracelular, sorprendentemente, la disminución de su expresión produjo una reducción en la captación de ácido oleico, como se observa en la Fig 5.9. La cantidad de LFABP presente en el enterocito modularía la capacidad de la

célula de captar FAs debido a su función en el transporte y direccionamiento de los mismos. La asimilación de OA estudiada en 2 min y 6.5 hs muestra una marcada disminución en las líneas N1 y aL. El estudio del metabolismo del OA, muestra un aumento del OA en la fracción de TG y una disminución en la fracción de PL a los 2 min, tendencia que se acentúa a las 6.5hs.

El uso de fitros transwell para el cultivo de Caco-2 permite recuperar el medio basolateral, donde se encuentran los productos de secreción de estas células. El enterocito se encuentra altamente especializado para la captación de nutrientes desde la superficie apical, en contacto con la luz intestinal. Los nutrientes son metabolizados, en el caso de los FAs y MGs, son reesterificados para formar TG que serán parte de los quilomicrones secretados basolateralmente, de modo de redistribuir a todo el organismo los lípidos absorbidos. La secreción de lípidos por parte de N1 y aL se vio disminuida, tanto a 2 min como a 6.5 hs. Cuando se estudia la distribución del OA en las distintas fracciones lipídicas, a 2 min no se observan diferencias con la línea control, mientras que a las 6.5 hs se ve una disminución de la fracción de TG y un aumento de los FFA.

Estos resultados nos podrían indicar que LFABP actúa como buffer citosólico, sensando la cantidad de FAs disponible, y su disminución produce una consecuente disminución del FAs disponible y captado por el enterocito. Asimismo, en ratones nulos para IFABP se observó una disminución del FA incorporado en TG relativo a PL, en ratones nulos para LFABP se observó una disminución del MG incorporado en TG relativo a PL (Gajda et al. 2013). Previamente se reportó que en fibroblastos transfectados para obtener una alta expresión de LFABP se observó un aumento de la esterificación del OA captado tanto en la fracción de lípidos neutros, principalmente TG, así como en PL en comparación con las células control (Murphy et al. 1996). La tendencia observada de un aumento de TG y disminución de PL en el OA asimilado indicaría que LFABP direcciona los FAs hacia la síntesis de PL, como se observó en modelos anteriores. Pero hay que tener en cuenta que el enterocito es una célula altamente diferenciada y especializada en su rol de captación de nutrientes y redistribución al resto del organismo. El aumento de la relación TG/PL también podría estar indicando un intento de esta célula por compensar la disminución de LFABP, además de los niveles de IFABP de por sí bajos en este modelo, por llevar a cabo su

función específica. Por otro lado, la disminución en la cantidad de lípidos secretados se podría explicar considerando que se ha demostrado que LFABP forma la vesícula prequilomicroónica (Neeli et al. 2007). La baja expresión de esta proteína afectaría el correcto ensamblaje de la vesícula prequilomicroónica, así como la composición de la misma (Fig 5.13 B), dando como resultado defectos en la secreción de quilomicrones por parte de N1 y aL. Se observa una disminución de TG correlacionada con un aumento de FFA en los lípidos secretados. La disminución de LFABP nos permitiría hipotetizar que LFABP estaría interactuando con las enzimas que catalizan la síntesis de TG para formar el complejo lípido-proteína que finalmente será secretado como quilomicrón a la linfa.

Se ha demostrado que LFABP aumenta su interacción con membranas en su forma apo (Falomir-Lockhart et al. 2011), podríamos pensar entonces que esta proteína toma FAs desde la membrana apical durante su asimilación. Además, empleando un ensayo de FRET para analizar la transferencia de AOFAs desde membranas artificiales hacia FABPs, se ha comprobado la capacidad tanto de LFABP como de IFABP de remover el ligando de membranas dadoras (Thumser, J.Lipid Res. 2000). Aquí también demostramos que la LFABP participaría del proceso de asimilación de OA mediado por transportadores proteicos, ya que en las condiciones empleadas el mecanismo de difusión simple sería minoritario. Sin embargo, los estudios de sobreexpresión de IFABP en células Caco-2 muestran que la capacidad de asimilación de OA disminuye en lugar de promoverse (Darimont et al. 2000). Pero también podríamos reinterpretar los resultados pensando que, la disminución en la asimilación en este último caso, se debe a una competencia de los ligandos entre IFABP y LFABP, y no necesariamente a un efecto inhibitorio de la IFABP, sino a una menor acción de la LFABP. Nuestros ensayos junto con la bibliografía proveen evidencia que en el mismo sistema celular IFABP y LFABP cumplirían funciones específicas. Sin embargo, los procesos moleculares responsables de estas diferencias son aún poco claros y más estudios serán necesarios para dilucidarlos.



# Conclusiones.

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

Los resultados presentados en el presente trabajo de tesis apoyan la idea de que las distintas isoformas de FABPs que se coexpresan en el epitelio intestinal cumplirían funciones diferentes, en concordancia con la gran cantidad de información previa. Los ensayos con variantes estructurales (mutantes puntuales, quimeras y variantes truncadas) son un importante aporte para reconocer los determinantes estructurales responsables de sus características funcionales, y comprender cómo es que éstos actúan. El presente trabajo ha analizado las características de unión a ligandos e interacción con membranas de una variante estructural de IFABP. Esta variante estructural de IFABP, llamada IFABP-D98D, surgió como producto de la proteólisis limitada de la forma holo de la proteína. Esta metodología ha permitido seleccionar y mantener todos los componentes estructurales de IFABP que hacen a su capacidad unir ligandos hidrofóbicos. Como se ha demostrado previamente, la pérdida de la región  $\alpha$ -helicoidal es clave para la determinación del mecanismo de transferencia de FAs. Este es el caso de IFABP-D98D, la cual muestra un mecanismo de tipo difusional, corroborándose la importancia de la región  $\alpha$ -helicoidal. Sorpresivamente, esta variante estructural ha demostrado ser capaz de interactuar con membranas. Esto indicaría que la formación del complejo proteína-membrana se lleva a cabo a través de un proceso secuencial en el que no sólo participa la región  $\alpha$ -helicoidal, sino también otras regiones de la proteína.

Otro aspecto de nuestro trabajo ha permitido demostrar que LFABP es capaz de unir MGS, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los altos niveles de expresión de LFABP en el intestino delgado sugieren que LFABP sería capaz de transportar ambos ligandos, tanto

FAs como MGs. Asimismo, IFABP no es capaz de unir MG, además de que no han sido observadas alteraciones en el metabolismo de MGS en ratones nulos para IFABP (IFABP<sup>-/-</sup>), en contraste con lo observado en ratones nulos para LFABP (LFABP<sup>-/-</sup>). Los ratones LFABP<sup>-/-</sup> mostraron un aumento de peso corporal que se correlaciona con un aumento en la ingesta de alimentos. Interesantemente, se encontraron niveles elevados de 2-AG (2-araquidonilglicérido) en el intestino de los ratones LFABP<sup>-/-</sup>, un MG que es un endocanabinoide endógeno. Aunque los roles de los endocannabinoides intestinales en la regulación de la ingesta de alimentos no están del todo claros, debido a su capacidad de transportar MGs, LFABP podría ser clave en la regulación de estos lípidos señalizadores para mantener la homeostasis energética en el cuerpo.

Los resultados obtenidos con las líneas celulares con la expresión de LFABP disminuida, muestran una participación de esta proteína en la proliferación y diferenciación celular. Esto podría deberse a la disminución en la captación de ácidos grasos y, consecuentemente, una menor fuente de energía así como una disminución en la síntesis de fosfolípidos. Por otro lado, podrían existir mecanismos moleculares de señalización por los cuales la LFABP afecta la velocidad de proliferación y la diferenciación de estas células, tales como su interacción con factores de transcripción como los PPAR o receptores nucleares como HNF4 $\alpha$ . Actualmente son necesarios más estudios para entender y dilucidar el rol de la proteína LFABP en el crecimiento y diferenciación celular.

Aunque LFABP es una proteína intracelular, la disminución de su expresión produjo una reducción en la velocidad de captación de ácido oleico. La expresión de LFABP modularía la capacidad de la célula de captar ácidos grasos debido a su función como buffer citosólico, transportadora y direccionadora de los mismos. Asimismo el destino metabólico del ácido oleico se vio alterado respecto a las células control. La tendencia observada de un aumento de triacilglicéridos (TG) y disminución de fosfolípidos (PL) en el OA asimilado indicaría que LFABP direcciona los FAs hacia la síntesis de PL. El enterocito es una célula altamente diferenciada y especializada en su rol de captación de nutrientes y redistribución de los mismos al resto del organismo. El aumento de la relación TG/PL también podría estar indicando un intento de esta célula por compensar la disminución de LFABP, además de los niveles de por sí bajos de IFABP en este modelo, por llevar a cabo su función específica. Por otro lado, se

detectó una disminución en la cantidad total de lípidos secretados por la célula. Se ha demostrado que LFABP forma parte de la vesícula prequilomicroónica, la baja expresión de esta proteína podría afectar el correcto ensamblaje de la vesícula prequilomicroónica, así como la composición de la misma, dando como resultado defectos en la secreción de quilomicrones.

Los resultados de esta tesis junto con otros trabajos realizados por nuestro grupo nos permiten comenzar a dilucidar las funciones específicas de las FABPs expresadas en el intestino. Hemos demostrado que las diferencias observadas en cuanto a las propiedades de unión de ligandos así como su mecanismo de transferencia de FAs hacia membranas y su interacción con las mismas subyacen en las características estructurales de I- y LFABP, las cuales determinan sus propiedades funcionales. Para sus funciones, la región  $\alpha$ -helicoidal de ambas FABPs intestinales sería de gran importancia, sentando así las bases moleculares para un modelo de transporte vectorial de ligandos desde y hacia compartimentos intracelulares membranosos de distinta composición. También es necesario tener en cuenta que la caracterización *in vitro* de la interacción con membranas podrían estar funcionando como un suplente de las estructuras reales presentes en las células. Por tal motivo también es necesario considerar la presencia de otras proteínas, en particular enzimas que participan del metabolismo lipídico (ácido graso sintasa, CD36, ACS, FATP4, sólo para nombrar algunas) y que serían los verdaderos dadores/receptores de los FAs que transportan las FABP.

En un entorno celular, I- y LFABP tomarían FAs desde la membrana apical durante su asimilación. IFABP sería capaz de transportarlos al retículo endoplásmico para su reesterificación, como lo evidencian los resultados en ratones IFABP<sup>-/-</sup>. Los FAs y MGs asimilados desde la cara apical unidos a LFABP serían principalmente destinados a su reesterificación en el retículo endoplásmico para formar TGs. Los FAs también serían direccionados hacia la síntesis de PL por LFABP. Uno de los destinos metabólicos de estos TGs es el almacenamiento en gotas lipídicas. Además, LFABP cargada con sus ligandos sería capaz de traslocar al núcleo con el fin de interactuar con factores de transcripción y receptores nucleares que regulan el metabolismo lipídico, el crecimiento y diferenciación, entre otros muchos procesos. Por otro lado, la biogénesis de los quilomicrones comienza en el dominio apical del retículo endoplásmico donde

empieza a ensamblarse el complejo de lípidos (TG y colesterol) y proteínas, principalmente apolipoproteína B. LFABP es una de las proteínas que participa en la formación de las vesículas prequilomicroónicas desde el retículo endoplásmico para su secreción a través del aparato de Golgi. Nuestros resultados en los cuales observamos que la composición lipídica de los lípidos secretados está alterada nos llevan a concluir que LFABP podría interactuar entregando sus ligandos a las enzimas que catalizan la síntesis de TG, los cuales formarán finalmente el complejo lípido-proteína que será secretado como quilomicrón basolateralmente.

El fin último de esta tesis es el análisis de las funciones específicas de I- y LFABP. Hemos combinado la información obtenida a través de diversas aproximaciones: biofísica, bioquímica y de biología celular aplicadas al estudio de estas proteínas de modo de esclarecer los roles de I- y LFABP en el enterocito intestinal.

## Bibliografía.

- Agellon, Luis B, Lena Li, Le Luong, and Richard R E Uwiera. 2006. "Adaptations to the Loss of Intestinal Fatty Acid Binding Protein in Mice." *Molecular and Cellular Biochemistry* 284 (1-2). Netherlands: 159–66.
- Agellon, Luis B, Matthew J Toth, and Alan B R Thomson. 2002. "Intracellular Lipid Binding Proteins of the Small Intestine." *Molecular and Cellular Biochemistry* 239 (1-2). Netherlands: 79–82.
- Alpers, D H, N M Bass, M J Engle, and K DeSchryver-Kecsckemeti. 2000. "Intestinal Fatty Acid Binding Protein May Favor Differential Apical Fatty Acid Binding in the Intestine." *Biochimica et Biophysica Acta* 1483 (3). NETHERLANDS: 352–62.
- Atshaves, B P, G G Martin, H A Hostetler, A L McIntosh, A B Kier, and F Schroeder. 2010. "Liver Fatty Acid Binding Protein and Obesity." *Journal of Nutrition Biochemistry* 21: 1015–32.
- Babeu, Jean Philippe, and François Boudreau. 2014. "Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha Involvement in Liver and Intestinal Inflammatory Networks." *World Journal of Gastroenterology* 20 (1): 22–30.
- Babeu, Jean-Philippe, Mathieu Darsigny, Carine R Lussier, and François Boudreau. 2009. "Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha Contributes to an Intestinal Epithelial Phenotype in Vitro and Plays a Partial Role in Mouse Intestinal Epithelium Differentiation." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 297 (1): G124–34.
- Baier, Leslie J, James C Sacchettini, William C Knowler, Janina Eads, Giuseppe Paolisso, Pietro A Tataranni, Hisayoshi Mochizuki, Peter H Bennett, Clifton Bogardus, and Michal Prochazka. 1995. "An Amino Acid Substitution in the Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein Is Associated with Increased Fatty Acid Binding , Increased Fat Oxidation , and Insulin Resistance" 95 (March): 1281–87.
- Banaszak, L, N Winter, Z Xu, D A Bernlohr, S Cowan, and T A Jones. 1994. "Lipid-Binding Proteins: A Family of Fatty Acid and Retinoid Transport Proteins." *Advances in Protein Chemistry* 45. UNITED STATES: 89–151.
- Bass, N M. 1990. "Fatty Acid-Binding Protein Expression in the Liver: Its Regulation and Relationship to the Zonation of Fatty Acid Metabolism." *Molecular and Cellular Biochemistry* 98 (1-2). NETHERLANDS: 167–76.
- Bass, Nathan M. 1985. "Ligand Binding to FABP." *Chemistry and Physics of Lipids* 38: 95–114.
- Bligh, DE, and WG Dyer. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Can J Biochem Physiol* 37 (August): 911–17.
- Brouillette, Charles, Yohan Bosse, Louis Perusse, Daniel Gaudet, and Marie-Claude Vohl. 2004. "Effect of Liver Fatty Acid Binding Protein (FABP) T94A Missense

- Mutation on Plasma Lipoprotein Responsiveness to Treatment with Fenofibrate." *Journal of Human Genetics* 49 (8). Japan: 424–32.
- Caspary, W F. 1992. "Physiology and Pathophysiology of Intestinal Absorption." *The American Journal of Clinical Nutrition* 55 (1 Suppl). UNITED STATES: 299S – 308S.
- Chmurzynska, Agata. 2006. "The Multigene Family of Fatty Acid-Binding Proteins (FABPs): Function, Structure and Polymorphism." *Journal of Applied Genetics* 47 (1). Poland: 39–48.
- Chon, Su Hyoun, John D. Douglass, Yin Xiu Zhou, Nashmia Malik, Joseph L. Dixon, Anita Brinker, Loredana Quadro, and Judith Storch. 2012. "Over-Expression of Monoacylglycerol Lipase (MGL) in Small Intestine Alters Endocannabinoid Levels and Whole Body Energy Balance, Resulting in Obesity." *PLoS ONE* 7 (8): 1–12.
- Coe, N R, and D A Bernlohr. 1998. "Physiological Properties and Functions of Intracellular Fatty Acid-Binding Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1391 (3). NETHERLANDS: 287–306.
- Corsico, B, D P Cistola, C Frieden, and J Storch. 1998. "The Helical Domain of Intestinal Fatty Acid Binding Protein Is Critical for Collisional Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12174–78.
- Córsico, Betina, Gisela R Franchini, Kuo-Tung Hsu, and Judith Storch. 2005. "Fatty Acid Transfer from Intestinal Fatty Acid Binding Protein to Membranes: Electrostatic and Hydrophobic Interactions." *Journal of Lipid Research* 46 (8): 1765–72.
- Córsico, Betina, Heng Ling Liou, and Judith Storch. 2004. "The Alpha-Helical Domain of Liver Fatty Acid Binding Protein Is Responsible for the Diffusion-Mediated Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes." *Biochemistry* 43 (12): 3600–3607.
- Curto, Lucrecia M, Julio J Caramelo, and M Delfino. 2005. " $\Delta$  98  $\Delta$  , a Functional All- - Sheet Abridged Form of Intestinal Fatty Acid Binding." *Biochemistry* 44: 13847–57.
- Curto, Lucrecia María, Julio Javier Caramelo, Gisela Raquel Franchini, and José María Delfino. 2009. "Delta98Delta, a Minimalist Model of Antiparallel Beta-Sheet Proteins Based on Intestinal Fatty Acid Binding Protein." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 18 (4): 735–46.
- Darimont, Christian, and Nathalie Gradoux. 1998. "Differential Regulation of Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins in Human Intestinal Cell Line ( Caco-2 ): Role of Collagen" 447: 441–47.
- Darimont, Christian, Nathalie Gradoux, Elke Persohn, Frédéric Cumin, and Alain De Pover. 2000. "Effects of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Overexpression on Fatty Acid Metabolism in Caco-2 Cells." *Journal of Lipid Research* 41: 84–92.
- De Gerónimo, Eduardo, Robert M Hagan, David C Wilton, and Betina Córsico. 2010. "Natural Ligand Binding and Transfer from Liver Fatty Acid Binding Protein

- (LFABP) to Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 (9). Elsevier B.V.: 1082–89.
- De Gerónimo, Eduardo, Luciana Rodriguez Sawicki, Natalia Bottasso Arias, Gisela Raquel Franchini, Fernando Zamarreño, Marcelo Daniel Costabel, Betina Córscico, and Lisandro Jorge Falomir Lockhart. 2014. "IFABP Portal Region Insertion during Membrane Interaction Depends on Phospholipid Composition." *Biochimica et Biophysica Acta* 1841 (January): 141–50.
- Devane, W A, L Hanus, A Breuer, R G Pertwee, L A Stevenson, G Griffin, D Gibson, A Mandelbaum, A Etinger, and R Mechoulam. 1992. "Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor." *Science (New York, N.Y.)* 258 (5090). UNITED STATES: 1946–49.
- DiPatrizio, Nicholas V, Giuseppe Astarita, Gary Schwartz, Xiaosong Li, and Daniele Piomelli. 2011. "Endocannabinoid Signal in the Gut Controls Dietary Fat Intake." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 12904–8.
- Drover, Victor a., Mohammad Ajmal, Fatiha Nassir, Nicholas O. Davidson, Andromeda M. Nauli, Daisy Sahoo, Patrick Tso, and Nada a. Abumrad. 2005. "CD36 Deficiency Impairs Intestinal Lipid Secretion and Clearance of Chylomicrons from the Blood." *Journal of Clinical Investigation* 115 (5): 1290–97.
- Drover, Victor a., David V. Nguyen, Claire C. Bastie, Yolanda F. Darlington, Nada a. Abumrad, Jeffrey E. Pessin, Erwin London, Daisy Sahoo, and Michael C. Phillips. 2008. "CD36 Mediates Both Cellular Uptake of Very Long Chain Fatty Acids and Their Intestinal Absorption in Mice." *Journal of Biological Chemistry* 283: 13108–15.
- Dubé, Nadia, Edgard Delvin, Wagner Yotov, Carole Garofalo, Moise Bendayan, Jacques H. Veerkamp, and Emile Levy. 2001. "Modulation of Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins in Caco-2 Cells by Lipids, Hormones and Cytokines." *Journal of Cellular Biochemistry* 81: 613–20.
- Erol, E, L S Kumar, G W Cline, G I Shulman, D P Kelly, and B Binas. 2003. "Liver Fatty Acid-Binding Protein Is Required for High Rates of Hepatic Fatty Acid Oxidation but Not for the Action of PPAR-Alpha in Fasting Mice." *Faseb Journal* 17: 347-359.
- Falomir-Lockhart, Lisandro J, Gisela R Franchini, María Ximena Guerbi, Judith Storch, and Betina Córscico. 2011. "Interaction of Enterocyte FABPs with Phospholipid Membranes: Clues for Specific Physiological Roles." *Biochimica et Biophysica Acta* 1811 (7-8). Elsevier B.V.: 452–59.
- Falomir-Lockhart, Lisandro J, Lisandro Laborde, Peter C Kahn, Judith Storch, and Betina Córscico. 2006. "Protein-Membrane Interaction and Fatty Acid Transfer from Intestinal Fatty Acid-Binding Protein to Membranes. Support for a Multistep Process." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 13979–89.



- Fisher, Eva, Cornelia Weikert, Maja Klapper, Inka Lindner, Matthias Mohlig, Joachim Spranger, Heiner Boeing, Jurgen Schrezenmeir, and Frank Doring. 2007. "L-FABP T94A Is Associated with Fasting Triglycerides and LDL-Cholesterol in Women." *Molecular Genetics and Metabolism* 91 (3). United States: 278–84.
- Fogh, J, JM Fogh, and T Orfeo. 1977. "One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice." *Journal National Cancer Institute* 59: 221–26.
- Franchini, G R, J Storch, and B Corsico. 2008. "The Integrity of the Alpha-Helical Domain of Intestinal Fatty Acid Binding Protein Is Essential for the Collision-Mediated Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta* 1781 (4): 192–99.
- Freshney, R I. 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*.
- Friedman, Ran, Esther Nachliel, and Menachem Gutman. 2005. "Molecular Dynamics Simulations of the Adipocyte Lipid Binding Protein Reveal a Novel Entry Site for the Ligand." *Biochemistry* 44 (11). United States: 4275–83.
- Friedman, Ran, Esther Nachliel, and Menachem Gutman. 2006. "Fatty Acid Binding Proteins: Same Structure but Different Binding Mechanisms? Molecular Dynamics Simulations of Intestinal Fatty Acid Binding Protein." *Biophysical Journal* 90 (March): 1535–45.
- Furuhashi, Masato, and Gökhan S Hotamisligil. 2008. "Fatty Acid-Binding Proteins: Role in Metabolic Diseases and Potential as Drug Targets." *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (6): 489–503.
- Gajda, Angela M, Yin Xiu Zhou, Luis B Agellon, Susan K Fried, Sarala Kodukula, Walter Fortson, Khamoshi Patel, and Judith Storch. 2013. "Direct Comparison of Mice Null for Liver or Intestinal Fatty Acid-Binding Proteins Reveals Highly Divergent Phenotypic Responses to High Fat Feeding." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30330–44.
- Gajda, Angela M., and Judith Storch. 2015. "Enterocyte Fatty Acid-Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver and Intestinal FABPs in the Intestine." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 93. Elsevier: 9–16.
- Gilham, Dean, Mustafa Alam, Wenhui Gao, Dennis E Vance, and Richard Lehner. 2005. "Triacylglycerol Hydrolase Is Localized to the Endoplasmic Reticulum by an Unusual Retrieval Sequence Where It Participates in VLDL Assembly without Utilizing VLDL Lipids as Substrates." *Molecular Biology of the Cell* 16 (2). United States: 984–96.
- Glatz, J F, and G J van der Vusse. 1996. "Cellular Fatty Acid-Binding Proteins: Their Function and Physiological Significance." *Progress in Lipid Research* 35 (3). ENGLAND: 243–82.
- Glatz, JF, and JH Veerkamp. 1983. "Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Lipidex 1000 Chromatography." *J Biochem Biophys Methods* 1 (August): 57–61.

- Glatz, JF, and JH Veerkamp .1983. "A Radiochemical Procedure for the Assay of Fatty Acid Binding by Proteins." *Anal Biochemistry* 132: 89–95.
- Gomori, GA. 1942. "Modification of Colorimetric Phosphorus Determination for Use with the Photoelectric Colorimeter." *J Lab Clin Med* 27: 955–60.
- Haeggström, Jesper Z., Agnes Rinaldo-Matthis, Craig E. Wheelock, and Anders Wetterholm. 2010. "Advances in Eicosanoid Research, Novel Therapeutic Implications." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396 (1). Elsevier Inc.: 135–39.
- Hamilton, James A. 2004. "Fatty Acid Interactions with Proteins: What X-Ray Crystal and NMR Solution Structures Tell Us." *Progress in Lipid Research* 43 (3). England: 177–99.
- Hauerland, Norbert H., and Friedrich Spener. 2004. "Fatty Acid-Binding Proteins - Insights from Genetic Manipulations." *Progress in Lipid Research* 43: 328–49.
- He, Y., Rima Estephan, Xiaomin Yang, Adriana Vela, Hsin Wang, Cédric Bernard, and Ruth E Stark. 2011. "An NMR-Based Structural Rationale for Contrasting Stoichiometry and Ligand Binding Site(s) in Fatty Acid-Binding Proteins." *Biochemistry* 50 (March 1): 1283–95.
- He, Y., X Yang, H Wang, R Estepha, F Francis, S Kodukula, J Storch, and RE Stark. 2007. "Solution-State Molecular Structure of Apo and Oleate-Liganded Liver Fatty Acid-Binding Protein." *Biochemistry* 44 (November 6): 12543–56.
- Ho, Shiu-Ying, Lissette Delgado, and Judith Storch. 2002. "Monoacylglycerol Metabolism in Human Intestinal Caco-2 Cells: Evidence for Metabolic Compartmentation and Hydrolysis." *The Journal of Biological Chemistry* 277: 1816–23.
- Ho, Shiu-ying, and Judith Storch. 2001. "Common Mechanisms of Monoacylglycerol and Fatty Acid Uptake by Human Intestinal Caco-2 Cells." *American Journal of Physiology Cell Physiology* 281: 1106–17.
- Hodsdon, ME, and DP Cistola. 1997. "Discrete Backbone Disorder in the Nuclear Magnetic Resonance Structure of Apo Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: Implications for the Mechanism of Ligand Entry." *Biochemistry* 36 (February 11): 1450–60.
- Hope, MJ, MJ Bally, G Webb, and P Cullis. 1985. "Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure: Characterization of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential." *Biochimica et Biophysica Acta* 812: 55–65.
- Hotamisligil, G S. 2006. "Inflammation and Metabolic Disorders." *Nature* 444 (December): 860–67.
- Hsu, Kuo-tung, and Judith Storch. 1996. "Protein Chemistry and Structure : Fatty Acid Transfer from Liver and Intestinal Fatty Acid-Binding Proteins to Membranes

- Occurs by Different Mechanisms." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (June 7): 13317–23.
- Huang, Huan, Olga Starodub, Avery McIntosh, Barbara P Atshaves, Gebre Woldegiorgis, and Ann B Kier. 2004. "Liver Fatty Acid-Binding Protein Colocalizes with Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  and Enhances Ligand Distribution to Nuclei of Living Cells †," 2484–2500.
- Izzo, Angelo a., Fabiana Piscitelli, Raffaele Capasso, Gabriella Aviello, Barbara Romano, Francesca Borrelli, Stefania Petrosino, and Vincenzo Di Marzo. 2009. "Peripheral Endocannabinoid Dysregulation in Obesity: Relation to Intestinal Motility and Energy Processing Induced by Food Deprivation and Re-Feeding." *British Journal of Pharmacology* 158 (October 2008): 451–61.
- Jung, Kwang Mook, Jason R. Clapper, Jin Fu, Giuseppe D'Agostino, Ana Guijarro, Dean Thongkham, Agnesa Avanesian, et al. 2012. "2-Arachidonoylglycerol Signaling in Forebrain Regulates Systemic Energy Metabolism." *Cell Metabolism* 15 (3): 299–310.
- Kaczocha, Martin, Sherrye T Glaser, and Dale G Deutsch. 2009. "Identification of Intracellular Carriers for the Endocannabinoid Anandamide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (15): 6375–80.
- Kim, K, DP Cistola, and C Frieden. 1996. "Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: The Structure and Stability of a Helix-Less Variant." *Biochemistry* 35 (June 11): 7553–58.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (August 1970): 680–85.
- Lagakos, W S, X Guan, S Y Ho, L R Sawicki, B Corsico, S Kodukula, K Murota, R E Stark, and J Storch. 2013. "Liver Fatty Acid-Binding Protein Binds Monoacylglycerol in Vitro and in Mouse Liver Cytosol." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (27): 19805–15.
- Lagakos, William Stacy, Angela Marie Gajda, Luis Agellon, Bert Binas, Victor Choi, Bernadette Mandap, Timothy Russnak, Yin Xiu Zhou, and Judith Storch. 2011. "Different Functions of Intestinal and Liver-Type Fatty Acid-Binding Proteins in Intestine and in Whole Body Energy Homeostasis." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (5): G803–14.
- Levy, Emile, Daniel Ménard, Edgard Delvin, Alain Montoudis, Jean-François Beaulieu, Geneviève Mailhot, Nadia Dubé, Daniel Sinnett, Ernest Seidman, and Moise Bendayan. 2009. "Localization, Function and Regulation of the Two Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Types." *Histochemistry and Cell Biology* 132 (3): 351–67.
- Luchoomun, J. 1999. "Assembly and Secretion of Chylomicrons by Differentiated Caco-2 Cells. NASCENT TRIGLYCERIDES AND PREFORMED PHOSPHOLIPIDS ARE

- PREFERENTIALLY USED FOR LIPOPROTEIN ASSEMBLY.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (28): 19565–72.
- Lussier, Carine R, Jean-Philippe Babeu, Benoît a Auclair, Nathalie Perreault, and François Boudreau. 2008. “Hepatocyte Nuclear Factor-4alpha Promotes Differentiation of Intestinal Epithelial Cells in a Coculture System.” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 294: G418–28.
- Malewiak, M I, N M Bass, S Griglio, and R K Ockner. 1988. “Influence of Genetic Obesity and of Fat-Feeding on Hepatic FABP Concentration and Activity.” *International Journal of Obesity* 12 (6). ENGLAND: 543–46.
- Mansbach, C M 2nd, and R F Dowell. 1992. “Uptake and Metabolism of Circulating Fatty Acids by Rat Intestine.” *The American Journal of Physiology* 263 (6 Pt 1). UNITED STATES: G927–33.
- Mansbach, Charles M, and Shadab a Siddiqi. 2010. “The Biogenesis of Chylomicrons.” *Annual Review of Physiology* 72: 315–33.
- Marcil, Valérie, Ernest Seidman, Daniel Sinnett, François Boudreau, Fernand-Pierre Gendron, Jean-François Beaulieu, Daniel Ménard, Louis-Philippe Precourt, Devendra Amre, and Emile Levy. 2010. “Modification in Oxidative Stress, Inflammation, and Lipoprotein Assembly in Response to Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha Knockdown in Intestinal Epithelial Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (52): 40448–60.
- Martin, Gregory G, Barbara P Atshaves, Avery L McIntosh, John T Mackie, Ann B Kier, and Friedhelm Schroeder. 2006. “Liver Fatty Acid Binding Protein Gene Ablation Potentiates Hepatic Cholesterol Accumulation in Cholesterol-Fed Female Mice.” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (1): G36–48.
- Martin, Gregory G, Heike Danneberg, Leena S Kumar, Barbara P Atshaves, Erdal Erol, Michael Bader, Friedhelm Schroeder, and Bert Binas. 2003. “Decreased Liver Fatty Acid Binding Capacity and Altered Liver Lipid Distribution in Mice Lacking the Liver Fatty Acid-Binding Protein Gene.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21429–38.
- Martin, Gregory G, Huan Huang, Barbara P Atshaves, Bert Binas, and Friedhelm Schroeder. 2003. “Ablation of the Liver Fatty Acid Binding Protein Gene Decreases Fatty Acyl CoA Binding Capacity and Alters Fatty Acyl CoA Pool Distribution in Mouse Liver †,” 11520–32.
- Martin, Gregory G, Avery L McIntosh, Huan Huang, Shipra Gupta, Barbara P Atshaves, Kerstin K Landrock, Danilo Landrock, Ann B Kier, and Friedhelm Schroeder. 2013. “The Human Liver Fatty Acid Binding Protein T94A Variant Alters the Structure, Stability, and Interaction with Fibrates.” *Biochemistry* 52 (51). United States: 9347–57.

- Massey, J B, D H Bick, and H J Pownall. 1997. "Spontaneous Transfer of Monoacyl Amphiphiles between Lipid and Protein Surfaces." *Biophysical Journal* 72 (4): 1732–43.
- McIntosh, Avery L, Barbara P Atshaves, Heather a Hostetler, Huan Huang, Jason Davis, Olga I Lyuksyutova, Danilo Landrock, Ann B Kier, and Friedhelm Schroeder. 2009. "Liver Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) Gene Ablation Reduces Nuclear Ligand Distribution and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Activity in Cultured Primary Hepatocytes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485 (2). Elsevier Inc.: 160–73.
- McIntosh, Avery L, Anca D Petrescu, Heather A Hostetler, Ann B Kier, and Friedhelm Schroeder. 2013. "Liver-Type Fatty Acid Binding Protein Interacts with Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha." *FEBS Letters* 587 (November 29): 3787–91.
- Mishkin, S, M Yalovsky, and J I Kessler. 1975. "Uptake and Compartmental Distribution of Fatty Acid by Rat Small Intestine in Vivo." *The American Journal of Physiology* 228 (5). UNITED STATES: 1409–14.
- Muga, A., D.P. Cistola, and H.H. Mantsch. 1993. "A Comparative Study of the Conformational Properties of Escherichia Coli-Derived Rat Intestinal and Liver Fatty Acid Binding Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1162 (March 26): 291–96.
- Murota, K, and J Storch. 2005. "Uptake of Micellar Long-Chain Fatty Acid and Sn -2-Monoacylglycerol into Human Intestinal Caco-2 Cells Exhibits Characteristics of Protein-Mediated Transport." *The Journal of Nutrition*, no. December 2004: 1626–30.
- Murphy, E J, D R Prows, J R Jefferson, and F Schroeder. 1996. "Liver Fatty Acid-Binding Protein Expression in Transfected Fibroblasts Stimulates Fatty Acid Uptake and Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta* 1301 (3). NETHERLANDS: 191–98.
- Neeli, Indira, Shadab a Siddiqi, Shahzad Siddiqi, James Mahan, William S Lagakos, Bert Binas, Tarun Gheyi, Judith Storch, and Charles M Mansbach. 2007. "Liver Fatty Acid-Binding Protein Initiates Budding of Pre-Chylomicron Transport Vesicles from Intestinal Endoplasmic Reticulum." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (25): 17974–84.
- Newberry, Elizabeth P, St Louis, Susan M Kennedy, and Nicholas O Davidson. 2010. "Diet-Induced Alterations in Intestinal and Extrahepatic Lipid Metabolism in Liver Fatty Acid Binding Protein Knockout Mice." *Molecular and Cellular Biochemistry* 326: 79–86.
- Newberry, Elizabeth P, Yan Xie, Susan Kennedy, Xianlin Han, Kimberly K Buhman, Jianyang Luo, Richard W Gross, and Nicholas O Davidson. 2003. "Decreased Hepatic Triglyceride Accumulation and Altered Fatty Acid Uptake in Mice with Deletion of the Liver Fatty Acid-Binding Protein Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51664–72.

- Ockner, R K. 1990. "Historic Overview of Studies on Fatty Acid-Binding Proteins." *Molecular and Cellular Biochemistry* 98 (1-2). NETHERLANDS: 3–9.
- Ockner, R K, J A Manning, R B Poppenhausen, and W K Ho. 1972. "A Binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium, and Other Tissues." *Science (New York, N.Y.)* 177 (4043). UNITED STATES: 56–58.
- Ogbay, Benhur, Gregory T Dekoster, and David P Cistola. 2004. "The NMR Structure of a Stable and Compact All-Beta-Sheet Variant of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein." *Protein Science* 13 (February 10): 1227–37.
- Ogretmen, B, D Schady, J Usta, R Wood, J M Kraveka, C Luberto, H Birbes, Y A Hannun, and L M Obeid. 2001. "Role of Ceramide in Mediating the Inhibition of Telomerase Activity in A549 Human Lung Adenocarcinoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (27). United States: 24901–10.
- Phan, C T, and P Tso. 2001. "Intestinal Lipid Absorption and Transport." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 6 (March). United States: D299–319.
- Piomelli, Daniele. 2014. "More Surprises Lying Ahead: The Endocannabinoids Keep Us Guesing." *Neuropharmacology* 29 (January): 228–34.
- Poirier, Helene, Pascal Degrace, Isabelle Niot, Andre Bernard, and Philippe Besnard. 1997. "Fatty Acid Regulation of Fatty Acid-Binding Protein Expression in the Small Intestine." *American Journal of Physiology* 273 (August 1): G289–95.
- Porter, Christopher J H, Natalie L Trevaskis, and William N Charman. 2007. "Lipids and Lipid-Based Formulations: Optimizing the Oral Delivery of Lipophilic Drugs." *Nature Reviews. Drug Discovery* 6 (3). England: 231–48.
- Pratley, R E, L Baier, D A Pan, A D Salbe, L Storlien, E Ravussin, and C Bogardus. 2002. "Effects of an Ala54Thr Polymorphism in the Intestinal Fatty Acid-Binding Protein on Responses to Dietary Fat in Humans."
- Prows, D R, E J Murphy, and F Schroeder. 1995. "Intestinal and Liver Fatty Acid Binding Proteins Differentially Affect Fatty Acid Uptake and Esterification in L-Cells." *Lipids* 30 (10). UNITED STATES: 907–10.
- Reisher, Samuel R, Thomas E Hughesti, Jose M Ordovast, Ernst J Schaefer, and Sheldon I Feinstein. 1993. "Increased Expression of Apolipoprotein Genes Accompanies Differentiation in the Intestinal Cell Line Caco-2" 90 (June): 5757–61.
- Richieri, GV, RT Ogata, and AM Kleinfeld. 1994. "Equilibrium Constants for the Binding of Fatty Acids with Fatty Ac Probe Id-Binding Proteins from Adipocyte, Intestine, Heart, and Liver Measured with the Fluorescent Probe ADIFAB." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (39): 23918–30.
- Sacchettini, J C, G Scapin, D Gopaul, and J I Gordon. 1992. "Refinement of the Structure of Escherichia Coli-Derived Rat Intestinal Fatty Acid Binding Protein with Bound

- Oleate to 1.75-Å Resolution." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (33): 23534–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429698>.
- Sacchettini, JC, JI Gordon, and LJ Banaszakl. 1989. "Crystal Structure of Rat Intestinal Fatty-Acid-Binding Protein. Refinement and Analysis of the Escherichia Coli-Derived Protein with Bound Palmitate." *Journal of Molecular Biology* 208 (2): 327–39.
- Saltiel, Alan R., and C. Ronald Kahn. 2001. "Insulin Signalling and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism." *Nature* 414 (December): 799–806.
- Sambrook, and Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sambuy, Y, I De Angelis, G Ranaldi, M L Scarino, A Stammati, and F Zucco. 2005. "The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics," 1–26.
- Santomé, J A, S M Di Pietro, B M Cavagnari, O L CORDOBA, and E C Dell'Angelica. 1998. "Fatty Acid Binding Proteins. Chronological Description and Discussion of Hypotheses Involving Their Molecular Evolution." *Trends in Comparative Biochemistry & Physiology* 4: 23–38.
- Scapin, G, J I Gordon, and J C Sacchettini. 1992. "Refinement of the Structure of Recombinant Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Apoprotein at 1.2-Å Resolution." *The Journal of Biological Chemistry* 267: 4253–69.
- Schaap, Frank G, Ger J van der Vusse, and Jan F C Glatz. 2002. "Evolution of the Family of Intracellular Lipid Binding Proteins in Vertebrates." *Molecular and Cellular Biochemistry* 239 (1-2). Netherlands: 69–77.
- Serhan, Charles N, Stephanie Yacoubian, and Rong Yang. 2008. "Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Lipid Mediators." *Annual Review of Pathology* 3: 279–312.
- Smathers, RL, and DR Petersen. 2011. "The Human Fatty Acid Binding Protein Family: Evolutionary Divergences and Functions." *Human Genomics* 5 (3): 485–96.
- Smith, Elizabeth R, and Judith Storch. 1999. "The Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Binds to Membranes by Electrostatic Interactions." *Biochimica et Biophysica Acta* 274 (December 10): 35325–30.
- Stahl, A, D J Hirsch, R E Gimeno, S Punreddy, P Ge, N Watson, S Patel, et al. 1999. "Identification of the Major Intestinal Fatty Acid Transport Protein." *Molecular Cell* 4 (3). UNITED STATES: 299–308.
- Steele, R a, D a Emmert, J Kao, M E Hodsdon, C Frieden, and D P Cistola. 1998. "The Three-Dimensional Structure of a Helix-Less Variant of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein." *Protein Science* 7 (6): 1332–39.
- Stella, N, P Schweitzer, and D Piomelli. 1997. "A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation." *Nature* 388 (6644). ENGLAND: 773–78.

- Storch, Judith. 1993. "Diversity of Fatty Acid-Binding Protein Structure and Function: Studies with Fluorescent Ligands." *Molecular and Cellular Biochemistry* 123 (1-2). NETHERLANDS: 45–53.
- Storch, Judith, NM Bass, and AM Kleinfeld. 1989. "Studies of the Fatty Acid-Binding Site of Rat Liver Fatty Acid-Binding Protein Using Fluorescent Fatty Acids." *The Journal of Biological Chemistry* 264 (15): 8708–13.
- Storch, Judith, and Betina Corsico. 2008. "The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid-Binding Proteins." *Annual Review of Nutrition* 28 (January): 73–95.
- Storch, Judith, and Alan Kleinfeld. 1986. "Transfer of Long-Chain Fluorescent Free Fatty Acids between Unilamellar Vesicles." *Biochemistry* 25 (April 8): 1717–26.
- Storch, Judith, and Alfred E Thumser. 2010. "Tissue-Specific Functions in the Fatty Acid-Binding Protein Family." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 32679–83.
- Storch, Judith, and Alfred E A Thumser. 2000. "The Fatty Acid Transport Function of Fatty Acid-Binding Proteins" 1486: 28–44.
- Storch, Judith, Yin Xiu Zhou, and William S Lagakos. 2008. "Metabolism of Apical versus Basolateral Sn-2-Monoacylglycerol and Fatty Acids in Rodent Small Intestine." *Journal of Lipid Research* 49 (8): 1762–69.
- Storr, Martin A, and Keith A Sharkey. 2007. "The Endocannabinoid System and Gut-Brain Signalling." *Current Opinion in Pharmacology* 7 (6). England: 575–82.
- Su, X., and N.a. Abumrad. 2009. "Cellular Fatty Acid Uptake: A Pathway under Construction." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20 (2): 72–77.
- Thompson, J, J Ory, A Reese-Wagoner, and L. Banaszak. 1999. "The Liver Fatty Acid Binding Protein--Comparison of Cavity Properties of Intracellular Lipid-Binding Proteins." *Molecular Cell Biochemistry* February (192): 9–16.
- Thompson, J., N. Winter, D. Terwey, J. Bratt, and L. Banaszak. 1997. "The Crystal Structure of the Liver Fatty Acid-Binding Protein: A Complex with Two Bound Oleates." *Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 7140–50.
- Thumser, a E a, and D C Wilton. 1996. "The Binding of Cholesterol and Bile Salts to Recombinant Rat Liver Fatty Acid-Binding Protein." *Biochemical Journal* 320: 729–33. Thumser, Alfred E A, and Judith Storch. 2000. "Liver and Intestinal Fatty Acid-Binding Proteins Obtain Fatty Acids from Phospholipid Membranes by Different Mechanisms." *Journal of Lipid Research* 41 (April): 647–56.
- Tijssen, P. 1985. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*.
- Trotter, Pamela J, Shiu Ying Ho, and Judith Storch. 1996. "Fatty Acid Uptake by Caco-2 Human Intestinal Cells" 37: 336–46.



- Trotter, Pamela J, and Judith Storch. 1993. "Fatty Acid Esterification during Differentiation of the Human Intestinal Cell Line Caco-2 ." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (14): 10017–23.
- Tso, P, and K Crissinger. 2006. "Digestion and Absorption of Lipids." In *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition, 2nd Edition*, 125–41.
- Van Rooijen, B. D., K. a. van Leijenhorst-Groener, M. M a E Claessens, and V. Subramaniam. 2009. "Tryptophan Fluorescence Reveals Structural Features of Alpha-Synuclein Oligomers." *Journal of Molecular Biology* 394 (5). Elsevier Ltd: 826–33.
- Vassileva, Galya, Leslie Huwyler, Kevin Poirier, Luis B Agellon, and Matthew J Toth. 2000. "The Intestinal Fatty Acid Binding Protein Is Not Essential for Dietary Fat Absorption in Mice." *FASEB J* 14: 2040–46.
- Wilkinson, T C, and D C Wilton. 1987. "Studies on Fatty Acid-Binding Proteins. The Binding Properties of Rat Liver Fatty Acid-Binding Protein." *The Biochemical Journal* 247: 485–88.
- Wu, F, B Corsico, C R Flach, D P Cistola, J Storch, and R Mendelsohn. 2001. "Deletion of the Helical Motif in the Intestinal Fatty Acid-Binding Protein Reduces Its Interactions with Membrane Monolayers: Brewster Angle Microscopy, IR Reflection-Absorption Spectroscopy, and Surface Pressure Studies." *Biochemistry* 40 (7): 1976–83.
- Zamarreño, Fernando, Fernando E Herrera, Betina Córscico, and Marcelo D Costabel. 2012. "Similar Structures but Different Mechanisms: Prediction of FABPs-Membrane Interaction by Electrostatic Calculation." *Biochimica et Biophysica Acta* 1818 (7). Elsevier B.V.: 1691–97.
- Zimmerman, A W, and J H Veerkamp. 2002. "New Insights into the Structure and Function of Fatty Acid-Binding Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (7). Switzerland: 1096–1116.