



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Análisis estructura-función de proteínas que unen ácidos grasos [FABP] de intestino de rata [Rattus norvegicus]

Franchini, Gisela Raquel

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Córscico, Betina
Co-dirección: Pollero, Ricardo José

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2006

Acceso en:
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000043>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Análisis estructura-función de proteínas que
unen ácidos grasos (FABP) de intestino de
rata (*Rattus norvegicus*).**



Gisela Raquel Franchini

Director: Dra. Betina Córscico

Codirector: Dr. Ricardo J. Pollero

2006

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Betina Corsico y la codirección del Dr. Ricardo J. Pollero.

Durante la realización del mismo recibí apoyo económico de la Universidad Nacional de La Plata, CONICET, FIRCA National Institutes of Health (NIH) y Fundación Antorchas.

Agradecimientos

a Betina, por la dirección de mi tesis, por su preocupación e interés en mi futuro, por demostrarme que los errores a veces son las mejores enseñanzas, por contagiarme su incesante interés por la ciencia y demostrarme que la solución a muchos problemas radica en la voluntad de resolverlos, por acompañarme y respetarme en momentos difíciles.

al Dr. Pollero por la codirección de mi tesis.

a la Dra. Judith Storch, por brindarme la oportunidad de trabajar temporariamente en su laboratorio.

a Lisandro, por su compañía y observaciones en el laboratorio.

a Ariel, Carolina, Natalia y Matías por su excelente apoyo tanto en el trabajo como en la vida cotidiana.

al Dr. Mario Ermácora y su grupo de trabajo, especialmente Valeria Riso, por su desinteresada e invaluable ayuda en algunos de mis experimentos.

al Dr. Rolando Rossi y su grupo de trabajo por permitirme utilizar sus equipos.

a todo el personal del INIBIOLP.

a mi mamá, papá, María, Paulo, Roberto, Madri y Noni por su incondicional apoyo y quienes velaron por mi formación personal y académica.

Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Summary.....	11
Introducción.....	14
1. Los lípidos en la naturaleza.....	14
2. Proteínas que unen lípidos (LBP).....	14
2.1. Proteínas que unen ácidos grasos extracelulares.....	15
2.2. Proteínas que unen ácidos grasos de membrana.....	16
2.3. Proteínas citosólicas que unen ácidos grasos (FABP).....	16
2.3.1. Distribución tisular de las FABP.....	17
2.3.2 Estructura génica y evolución molecular.....	18
2.3.3 Estructura general de las proteínas pertenecientes a la familia de las FABP.....	19
2.3.4. La hipótesis del “portal”.....	21
3. Digestión y absorción de lípidos en el intestino de mamíferos:	
Generalidades.....	22
4. FABP del intestino delgado de mamíferos.....	26
4.1. Diferencias entre I- y LFABP.....	26
4.2. Funciones biológicas de I- y LFABP.....	28
4.2.1. Estudios funcionales <i>in vitro</i>	29
4.2.2. Estudios a nivel celular.....	30
4.2.3. Estudios <i>in vivo</i>	31
Objetivos.....	34
Materiales y Métodos.....	36
Materiales.....	36
Métodos.....	38
1. Procedimientos generales.....	38
1.1. Técnicas de Biología Molecular:.....	38
1.1.1. Minipreparación de Plásmidos.....	38
1.1.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	39
1.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	39
1.1.4. Precipitación con etanol.....	39
1.1.5. Digestión con enzimas de restricción.....	39
1.1.6. Ligazón.....	40
1.1.7. Obtención de células competentes.....	40
1.1.8. Transformación de Bacterias competentes.....	40
1.2. Técnicas para análisis de proteínas.....	41
1.2.1. Cuantificación de Proteínas.....	41
1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	42
1.3. Análisis estadístico.....	42
2. Procedimientos específicos.....	43
2.1. Diseño y construcción de cDNAs quiméricos recombinantes a partir de I- y LFABP por intercambio de la región α.....	43
2.1.1. PCR de solapamiento.....	44
2.2. Purificación de proteínas recombinantes.....	48

2.2.1. Purificación de las proteínas nativas I y LFABP.....	48
2.2.2. Purificación de la variante de IFABP carente de la región α helicoidal (HL-IFABP).....	49
2.2.3. Purificación de proteínas quiméricas.....	49
2.3. Modificación química de IFABP: Acetilación de los residuos de lisina	50
2.3.1. Reacción de Acetilación.....	50
2.3.2. Cuantificación de la acetilación de las lisinas.....	50
2.4. Control de la integridad estructural de las distintas variantes de FABP.	51
2.4.1. Determinación del coeficiente de extinción molar.....	51
2.4.2. Cálculo del coeficiente de partición.....	51
2.4.3. Cálculo de la constante de afinidad.....	52
2.4.4. Dicroísmo Circular.....	53
2.4.5. Rendimiento cuántico.....	54
2.5. Preparación de membranas artificiales.....	54
2.5.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).....	54
2.5.2. Vesículas unilamelares grandes (LUV).....	55
2.5.3. Cuantificación de membranas artificiales.....	55
2.5.4. Cálculo de densidad de carga superficial de vesículas.....	56
2.6. Transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) desde FABPs hacia SUVs.	56
2.7. Preparación y utilización del reactivo fotoactivable ¹²⁵I-TID-PC.....	57
2.7.1. Preparación de ácido peracético.....	57
2.7.2. Preparación del reactivo ¹²⁵ I-TID-PC.....	58
2.7.3. Experimentos de “fotocrosslinling”.....	59
2.7.4. Transferencia a membranas de PVDF.....	60
2.7.5. Proteólisis con BNPS-Skatolato de proteínas unidas a membranas de PVDF.....	60
Resultados.....	61
1. Rol de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.....	61
1.1. Efecto de la densidad de carga de las vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP.....	62
1.2. Efecto de la composición de las vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP.....	63
1.3. Rol de los residuos de lisina superficiales en la transferencia de los ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.....	66
1.4. Controles de la integridad estructural de IFABP acetilada.....	6
1.5. Efecto de la concentración de vesículas zwitteriónicas en la transferencia de AOFA desde IFABP acetilada.....	68
1.6. Efecto de la carga superficial de las vesículas en la transferencia de AOFA desde IFABP acetilada hacia membranas.....	70
1.7. Efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP acetilada hacia membranas.....	73
2. Rol de la región αI en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde FABP hacia membranas artificiales.....	76
2.1. Construcción de proteínas quiméricas.....	77
2.2. Controles de la integridad estructural de las proteínas quiméricas.....	79

Indice

2.3. Efecto de la concentración de vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde las proteínas quiméricas.....	84
2.4. Efecto de la carga de las vesículas sobre la velocidad de transferencia AOFA desde las proteínas quiméricas.....	86
3. Análisis de la interacción de FABP con membranas artificiales mediante el uso de un reactivo fotoactivable.....	87
3.1. Detección de el/los dominios y residuos específicos involucrados en la interacción con membranas.....	87
Discusión.....	92
1. Rol de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.....	92
2. Rol de la región $\alpha 1$ en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde FABP hacia membranas artificiales.....	98
3. Análisis de la interacción de FABP con membranas artificiales mediante el uso del reactivo fotoactivable.....	104
Conclusión.....	108
Referencias.....	109

Abreviaturas

12AO 12-(9-anthroiloxi) oléico

12AS 12-(9-anthroiloxi) esteárico

¹²⁵I-TID-PC 1-O-hexadecanoil-2-O-[9-[[[2-¹²⁵I]odo-4-(trifluoro-metil-3H-diazirina-3-il)benzil]oxi]carbonil]nonanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina

ADIFAB IFABP modificada con el grupo acrilodan

AFABP Proteína que une ácidos grasos de adipocito

AOFA anthroiloxi-derivados de ácidos grasos

BFABP Proteína que une ácidos grasos de cerebro

BNPS-Skatolato (2-2'-Nitrofenilsufenil)-3-metil-3'-bromoindolenina

CL cardiolipina de corazón bovino

CRABP Proteínas que unen ácido retinoico

CRBP Proteínas que unen retinol

EFABP Proteína que une ácidos grasos de epitelio

EPC fosfatidil colina de huevo

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

HFABP Proteína que une ácidos grasos de corazón

HL-IFABP IFABP carente de la región alfa-helicoidal

IBABP Proteína que une ácidos grasos de íleon

LbFABP Proteína que une ácidos grasos básica de hígado

LFABP Proteína que une ácidos grasos de hígado

LUV vesículas unilamelares grandes

MFABP Proteína que une ácidos grasos de mielina

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

PS fosfatidilserina de cerebro porcino

sn-2-MG sn-2-monoacilglicerol

SUV vesículas unilamelares pequeñas

TFABP Proteína que une ácidos grasos de testículo

Las proteínas que unen ácidos grasos de intestino (IFABP) e hígado (LFABP), son proteínas homólogas que se coexpresan en altos niveles en el citosol de células del epitelio intestinal. Se ha observado que dichas proteínas emplean mecanismos diferentes de transferencia de los ácidos grasos hacia membranas. Mientras que la transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas ocurre por interacción colisional directa de la proteína con la bicapa fosfolipídica, la transferencia de ácidos grasos desde LFABP estaría de acuerdo con un mecanismo mediado por difusión acuosa. Más aún, se ha demostrado que el dominio α -helicoidal de IFABP desempeña un rol crítico en la determinación de mecanismo de transferencia de los ácidos grasos de tipo colisional.

El objetivo general de este proyecto fue analizar las diferencias a nivel molecular entre IFABP y LFABP responsables de las amplias diferencias funcionales en el transporte de ácidos grasos. Los objetivos específicos de este trabajo fueron: la caracterización del mecanismo de transferencia colisional desde IFABP hacia membranas fosfolipídicas; la determinación de la importancia de las hélices α -I de I- y LFABP en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos hacia membranas y el análisis de la interacción física de las FABP con membranas.

Se ha postulado que IFABP participa en el transporte intracelular de ácidos grasos. Asimismo se ha propuesto que la transferencia de los ácidos grasos desde IFABP hacia vesículas ocurre mediante interacciones proteína-membrana. En este trabajo, hemos analizado la participación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en el mecanismo de transferencia de tipo colisional de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas. Utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia, examinamos la velocidad y mecanismo de transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos: a) desde IFABP hacia membranas fosfolipídicas de diferente composición; b) desde IFABP modificada químicamente, en la cual la acetilación de los residuos de lisina superficiales eliminó las cargas positivas superficiales; y c) en función de la fuerza iónica del medio. Los resultados muestran claramente que las cargas negativas de la superficie de las vesículas y las cargas positivas superficiales de la proteína son importantes para establecer el “complejo colisional”, durante el cual se produce la transferencia del ácido graso. En adición,

cambios en la hidrofobicidad de la superficie proteica, así como también el volumen hidrofóbico de las vesículas aceptoras, también influenciaron la velocidad de la transferencia del ácido graso. De esta manera, las interacciones electrostáticas entre IFABP y membranas jugarían un rol primordial en el proceso de transferencia del ácido graso hacia membranas, y las interacciones hidrofóbicas también pueden modular las velocidades de transferencia.

Para determinar la importancia de las hélices α -I de I- y LFABP en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos hacia membranas, se construyeron un par de proteínas quiméricas con el barril β de IFABP y la hélice α I de LFABP (α (I)L β IFABP); y el barril β de LFABP y la hélice α I de IFABP (α (I)I β LFABP), respectivamente. Las propiedades de transferencia de los ácidos grasos de las proteínas quiméricas fueron analizadas utilizando el ensayo de transferencia de energía de resonancia. Los resultados muestran una modificación significativa de la velocidad absoluta de transferencia desde ambas proteínas quiméricas comparadas con las proteínas nativas, indicando que la velocidad menor observada para LFABP relativa a IFABP está, en parte, determinada por la región α -helicoidal de estas proteínas. En adición a estos cambios cuantitativos, fue de gran interés encontrar cambios en el mecanismo aparente de transferencia del ácido graso cuando se intercambiaron las regiones α I. Específicamente, α (I)L β IFABP mostró un descenso significativo en la respuesta a la concentración de SUV y sensibilidad a la carga con respecto a IFABP, sin embargo el mecanismo aparente de transferencia colisional no fue completamente anulado, sugiriendo la participación de la hélice α II en la formación del “complejo colisional” entre la proteína y membrana. α (I)I β LFABP, por otra parte, no mostró cambios en el mecanismo aparente de transferencia de tipo difusional con respecto a LFABP. Estos resultados sugieren que α I de IFABP es importante en la determinación del mecanismo de transferencia de tipo colisional para IFABP pero no es capaz de impartir dicho mecanismo al barril β de LFABP. Los resultados obtenidos con α (I)I β LFABP pondrían en evidencia que α II de LFABP sería responsable del mecanismo de transferencia de tipo difusional observado para esta proteína.

Experimentos de fotocrosslinking utilizando el reactivo fotoactivable ^{125}I -TID-PC demostraron la importancia de la región α -helicoidal de IFABP en la interacción física con membranas. Empleando una variante de IFABP que carece de la región α -helicoidal completa, hemos observado un importante descenso en la interacción con membranas en comparación con la proteína nativa. Más aún, la proteólisis de IFABP luego de su fotoactivación resultó en la detección de un fragmento (conteniendo la región α -helicoidal) con un mayor nivel de interacción. Con la finalidad de caracterizar los tipos de interacción involucrados en el contacto físico de IFABP con membrana. Se realizaron asimismo experimentos de fotocrosslinking utilizando vesículas de diferente composición y la variante de IFABP acetilada. Los resultados están de acuerdo con nuestros estudios cinéticos, demostrando que las interacciones iónicas juegan un rol determinante, así como también las interacciones hidrofóbicas en la formación del complejo proteína-membrana.

Summary

Intestinal FABP (IFABP) and liver FABP (LFABP), homologous proteins expressed at high levels in intestinal absorptive cells, employ markedly different mechanisms of fatty acid transfer to acceptor membranes. Transfer from IFABP occurs during protein-membrane-collisional interactions, while for LFABP transfer occurs by diffusion through the aqueous phase. Moreover, it has been shown that the helical domain of IFABP is critical in determining its collisional FA transfer mechanism.

The overall goal of this approach was to explore the structural differences between IFABP and LFABP which underlie their large functional differences in transport and binding. The specific aims of this work were: to characterize the collisional transfer mechanism of fatty acids from IFABP to membranes; to explore the importance of α helices of I- and LFABP in the determination of fatty acid transfer mechanism and to assess the net physical interaction of these proteins with membranes.

IFABP is thought to participate in the intracellular transport of fatty acids. Fatty acid transfer from IFABP to phospholipid membranes is proposed to occur during protein-membrane collisional interactions. In this study, we analyzed the participation of electrostatic and hydrophobic interactions in the collisional mechanism of FA transfer from IFABP to membranes. Using a fluorescence resonance energy transfer assay, we examined the rate and mechanism of transfer of anthroyloxy-fatty acid analogs *a*) from IFABP to phospholipid membranes of different composition; *b*) from chemically modified IFABPs, in which the acetylation of surface lysine residues eliminated positive surface charges; and *c*) as a function of ionic strength. The results show clearly that negative charges on the membrane surface and positive charges on the protein surface are important for establishing the "collisional complex," during which fatty acid transfer occurs. In addition, changes in the hydrophobicity of the protein surface, as well as the hydrophobic volume of the acceptor vesicles, also influenced the rate of fatty acid transfer. Thus, ionic interactions between IFABP and membranes appear to play a primary

Summary

role in the process of fatty acid transfer to membranes, and hydrophobic interactions can also modulate the rates of ligand transfer.

To assess the specific structural elements which lead to unique transport properties of intestinal FABP a pair of chimeric proteins was engineered with the 'body' (ligand binding domain) of IFABP and the α I-helix of LFABP (α (I)L β IFABP); and the ligand binding pocket of LFABP and the α I-helix of IFABP (α (I)I β LFABP), respectively. The fatty acid transfer properties of the FABP chimeras were examined using the fluorescence resonance transfer assay. The results showed a significant modification of the absolute rate of FA transfer from the chimeric proteins compared to the wild-types, indicating that the slower rate of FA transfer observed for LFABP relative to IFABP is, in part, determined by the helical domain of the proteins. In addition to these quantitative changes, it was of great interest to observe that the apparent mechanism of FA transfer also changed when the α I-helix was exchanged. Specifically, α (I)L β IFABP showed a significant decrease in both the response to SUV concentration and charge sensitivity, even though the apparent collisional fatty acid transfer mechanism was not completely abolished suggesting the participation of α II-helix in the formation of protein-membrane "collisional complex". α (I)I β LFABP, on the other hand, didn't show changes in the apparent transfer mechanism in comparison with LFABP. These results suggest that α I-helix of IFABP is important in the determination of the collisional fatty acid transfer mechanism for IFABP but it is not enough to impart this transfer property to LFABP β -barrel domain. The results obtained with α (I)I β LFABP show evidence that α II-helix of LFABP may be responsible for the diffusional FA transfer mechanism observed for this protein.

Photocrosslinking experiments with a photoactivable reagent underscored the importance of the α -helical domain of IFABP in the physical interaction with membranes. Employing an IFABP variant, which lacks the entire α -helical domain, we observed a very important decrease in the interaction with membranes compared to the wild type protein. Moreover, chemical cleavage of IFABP after its photoactivation resulted in the detection of a fragment (containing the α -helical

Summary

domain) with a greater level of interaction. In order to characterize the kind of interactions involved in FABP-membrane physical contact, photocrosslinking experiments employing vesicles of different composition and the acetylated IFABP were undertaken. The results are in agreement with our kinetic studies showing that ionic interactions play a primary role, and hydrophobic interaction could also participate in the formation of the protein-membrane complex.



1. Los lípidos en la naturaleza

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diverso, cuya característica general es su hidrofobicidad o poca solubilidad en agua (Lehninger et al, 2005). Dicho grupo heterogéneo de compuestos cumple las más diversas funciones; las grasas y aceites son la forma principal de almacenar energía de tejidos animales y vegetales respectivamente; los fosfolípidos cumplen roles estructurales como formación de membranas biológicas; otros lípidos cumplen roles cruciales como cofactores de enzimas, transportadores de electrones, pigmentos fotosensibles, “chaperonas” de proteínas de membrana, agentes emulsificantes en el tracto digestivo, hormonas y segundos mensajeros. Más recientemente se ha observado que cumplen funciones como reguladores de factores de transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico.

Los ácidos grasos son constituyentes de triacilglicéridos y fosfolípidos; como tales constituyen la principal fuente de energía de la célula, son componentes integrales de las membranas celulares, precursores de segundos mensajeros intracelulares y pueden modular la expresión génica. Todos los ácidos grasos son indispensables en los animales, pero especies como el linoleico (18:2 n6) y el α -linolénico (18:2 n3) son además esenciales porque no pueden ser sintetizados en animales a partir de compuestos simples. Los mismos deben ser tomados de la dieta y son utilizados como precursores para la generación de otros ácidos grasos de gran importancia mediante reacciones de desaturación y elongación de la cadena carbonada.

2. Proteínas que unen lípidos (LBP)

Numerosos sistemas biológicos dependen del transporte de distintos tipos de lípidos a través de sistemas acuosos para llevar a cabo diversas funciones.

Considerando la poca solubilidad de los mismos en agua, a lo largo de la evolución han surgido una gran variedad de proteínas que facilitan el transporte de dichas sustancias.

En los vertebrados, distintos órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético presentan rutas metabólicas que demandan un importante transporte de lípidos, especialmente ácidos grasos, tanto desde otros tejidos vía torrente sanguíneo o en su interior celular. Sintéticamente, algunos de los procesos intracelulares que involucran transporte incluyen la absorción intestinal de ácidos grasos provenientes de la dieta, su almacenamiento y movilización como triglicéridos en adipocitos, producción de energía de la β -oxidación de los ácidos grasos, la incorporación de los mismos en lípidos más complejos como fosfolípidos y ésteres de colesterol, acilación de proteínas específicas, y la función de los ácidos grasos como señales intracelulares (ver review Glatz et al., 1996).

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

2.1. Proteínas que unen ácidos grasos extracelulares

En el plasma sanguíneo y los fluidos intersticiales de mamíferos, la albúmina es la proteína que transporta los ácidos grasos no esterificados (ver review Glatz et al., 1996). El transporte de triacilglicéridos y ésteres de colesterol se lleva a cabo bajo la forma de estructuras especializadas denominadas *lipoproteínas*. Las lipoproteínas son partículas con un centro altamente hidrofóbico y una superficie externa relativamente hidrofílica. Una partícula lipoproteica típica, consiste en un centro de triacilglicerol y ésteres de colesterol y una cubierta de fosfolípidos y colesterol libre. Cada partícula lipoproteica está asociada con una o más moléculas proteicas, las *apolipoproteínas* que se encuentran en su superficie.

2.2. Proteínas que unen ácidos grasos de membrana

Hasta los años 80 se creyó que la entrada de los ácidos grasos de cadena larga a las células eucariotas se producía por difusión simple a través de la membrana fosfolipídica. Actualmente existe amplia evidencia que demuestra la existencia de un mecanismo saturable de incorporación de ácidos grasos de cadena larga en distintos tejidos, que coexistiría con la difusión simple de los ácidos grasos (Stahl et al., 2001). Asimismo se han identificado varias de las proteínas responsables de este transporte a través de membrana. Se han caracterizado al menos tres grupos de proteínas receptoras y transportadoras de ácidos grasos existentes en membranas; el grupo de las proteínas que unen ácidos grasos de membrana plasmática (PM-FABP) (Stremmel et al., 1985), el grupo de las translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) (Abumrad et al., 1981) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP) (Schaffer et al., 1994).

2.3. Proteínas citosólicas que unen ácidos grasos (FABP)

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABP) son miembros de una familia multigénica que codifican para la expresión de proteínas citosólicas pequeñas (14-15 kD) que unen ácidos grasos intracelulares (Vogel Hertz et al., 2000). Desde su primer hallazgo en 1972 (Ockner et al., 1972) hasta la actualidad se han sumado numerosos representantes de esta familia pertenecientes a distintos grupos del reino animal.

Es importante destacar que las proteínas que unen retinol (CRBP) y ácido retinoico (CRABP) están estrechamente relacionadas con las FABP ya que presentan una estructura terciaria muy similar. Si bien se trata de un grupo muy importante de proteínas no nos referiremos a ellas ya que no forman parte de los objetivos específicos de este trabajo.

2.3.1. Distribución tisular de las FABP

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

Distintos miembros de la familia de las FABP han sido encontrados en todos los tejidos y son especialmente abundantes en aquellos con un alto metabolismo lipídico. A medida que las distintas FABP fueron identificadas se denominaron de acuerdo al tejido de origen, hoy en día se sabe que la mayoría de los tejidos expresan varios tipos de FABP variando solamente en los niveles de expresión (Hauerland et al., 2004). Específicamente, LFABP se expresa en hepatocitos, enterocitos, colonocitos y células de los túbulos proximales del riñón (ver review Glatz et al., 1996). De esta manera se pueden encontrar tipos celulares específicos, como el enterocito, que expresan más de un tipo de FABP.

Tabla I. Miembros de la familia de las FABP

FABP^a	Gen	Expresión	Ligandos
LFABP	<i>Fabp1</i>	Hígado, intestino, riñón, pulmón y páncreas.	LCFA*, acil-CoA y grupo hemo.
IBABP	<i>Fabp6</i>	Ileon	Sales biliares
LbFABP	<i>Fabp10</i>	Hígado de peces y aves	LCFA
IFABP	<i>Fabp2</i>	Intestino, hígado	LCFA
HFABP	<i>Fabp3</i>	Corazón, músculo esquelético, cerebro, riñón, pulmón, glándulas mamarias, testículos, ovarios y estómago.	LCFA
AFABP	<i>Fabp4</i>	Tejido adiposo y macrofagos	LCFA
EFABP	<i>Fabp5</i>	Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, corazón, músculo esquelético, testículos, retina y riñón.	LCFA
BFABP	<i>Fabp7</i>	Cerebro, células de la glia y retina.	LCFA
MFABP	<i>Fabp8</i>	Cerebro y células de Schwann	LCFA
TFABP	<i>Fabp9</i>	Testículo	LCFA

* Ácidos grasos de cadena larga

^aProteínas que unen ácidos grasos de hígado (LFABP), íleon (IBABP), básica de hígado (LbFABP), corazón (HFABP), adipocito (AFABP), epitelio (EFABP), cerebro (BFABP), mielina (MFABP), y testículo (TFABP). Extraído de Hauerland et al., 2004.

2.3.2 Estructura génica y evolución molecular

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

Para la mayoría de las FABP, los genes han sido identificados y caracterizados. Todos ellos presentan una estructura génica muy similar, la cual consiste en cuatro exones interrumpidos por tres intrones que varían su longitud pero presentan una posición similar dentro de la secuencia génica (ver review Glatz et al., 1996). El hecho de presentar una estructura génica tan similar sugiere la existencia de un gen ancestral para las FABP; esta secuencia original habría dado origen a la variedad de FABP conocidas en la actualidad mediante el proceso de duplicación génica (Hauerland et al., 2004).

Dicho gen ancestral codificaría para una proteína capaz de unir numerosos ligandos hidrofóbicos, a partir de la cual se fueron diversificando los distintos tipos de FABP presentando especificidad por los distintos tipos de ligandos hidrofóbicos (Schaap et al., 2002). Esto sugiere que la fuerza de selección podría haber sido, en parte, la necesidad de transportadores específicos para cada tipo de ligando. Es importante resaltar que cada tipo de FABP presenta un alto porcentaje de homología con los mismos tipos de FABP aislados de otros organismos dentro del grupo de los vertebrados. Por ejemplo las HFABP de humano, bovina, murina y de rata presentan un porcentaje de homología entre 85 y 96% mientras que el porcentaje de homología entre HFABP y LFABP humanas es tan solo de un 27% (Santome et al, 1998).

Considerando que la familia de las FABP ha sido encontrada solo en el Reino Animalia, se ha sugerido que el gen ancestral de dicha familia surgió luego de la divergencia del grupo animal de aquellos de los hongos y las plantas; esto debió producirse alrededor de 1200-1000 millones de años atrás (Schaap et al., 2002).

El análisis de las relaciones evolutivas entre los miembros de las FABP de vertebrados utilizando el test de máxima similitud en base a las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas presentes en las diferentes bases de datos (Huelsenbeck et al., 1997), ha dado como resultado un árbol filogenético en el cual se distinguieron claramente cuatro grupos (Schaap et al., 2002). Estos grupos parecen poder definirse de acuerdo al tipo de ligando que unen sus distintos miembros. El primero de ellos incluye a ILBP y a las dos isoformas de LFABP siendo sus principales ligandos ácidos grasos, sales biliares, colesterol y grupo hemo. Otro de los grupos está compuesto por las CRBP/ CRABP y sus ligandos son los derivados de la vitamina A. El tercer grupo está compuesto por HFABP, AFABP, BFABP y EFABP entre otros y sus ligandos son principalmente ácidos grasos, retinoides y eicosanoides. Finalmente el cuarto grupo está representado por IFABP la que solo presenta afinidad por un solo tipo de ligando, los ácidos grasos.

La primera duplicación del gen ancestral se produjo aproximadamente hace 930 millones de años (Santomé et al., 1998) generándose los dos primeros grandes grupos de FABP; uno de ellos incluía I- y LFABP. Se ha propuesto que la separación entre el grupo de LFABP e IFABP ocurrió aproximadamente 630 millones de años atrás, antes del surgimiento del grupo de los vertebrados (Chan et al., 1985).

2.3.3 Estructura general de las proteínas pertenecientes a la familia de las FABP

Considerando la estructura primaria, los miembros de esta familia muestran un moderado nivel de homología de secuencia que varía desde 20% hasta 70% (Banaszak et al., 1994) (**Tabla II**). Sin embargo la característica principal de este grupo de proteínas es una estructura tridimensional muy bien conservada. La misma consiste en 10 cadenas β antiparalelas (nombradas desde βA hasta βJ) las cuales forman un barril β levemente elíptico y dos α hélices cortas que se ubican entre βA y βB , denominadas αI y αII (**Fig. 1**). Las 10 cadenas se agrupan en dos hojas β de 5 cadenas cada una, las cuales se enfrentan con una orientación casi

perpendicular determinando una cavidad central. La unión entre las cadenas β A y β 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).

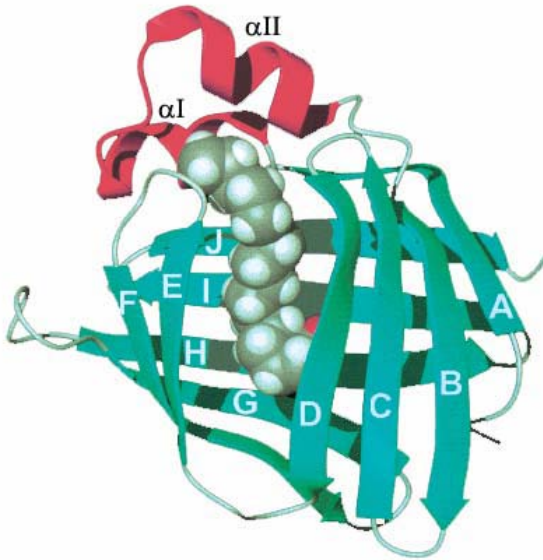


Fig. 1: Diagrama de cinta de IFABP de rata en presencia del ligando. Tomada de Steele et al. (1998)

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 halla desplazado del centro de la proteína. Aunque las secuencias no se conservan, la naturaleza hidrofóbica de los residuos en esta área se mantiene. Esta cavidad es bastante inaccesible para el solvente, cuando se analizan las estructuras cristalográficas de algunas FABP, las mismas presentan aperturas por las cuales se podría establecer un intercambio de moléculas de agua; pero ninguno de estos poros parece lo suficientemente grande como para dejar pasar un ácido graso (Banaszak et al., 1994).

Todos los elementos de la estructura secundaria son superponibles cuando se comparan las estructuras tridimensionales de los distintos miembros de las FABP. Las diferencias estructurales más significativas ocurren en las cadenas β D, β E y β F y en los giros entre ellas. Otro punto de grandes variaciones es el giro entre β G y β H.

Las dos α hélices (I y II) son de la misma longitud en todas las FABP y se encuentran “tapando” uno de los extremos del barril β . Es notable resaltar que I-, A- y HFABP tienen una α hélice anfipática.

En la familia de las FABP, todas las cadenas β adyacentes del barril β están conectadas entre sí por puentes de hidrógeno excepto entre las cadenas β D y β E, las cuales presentan una apertura hacia el interior de la cavidad. Esta apertura no representa el lugar de entrada para el/los ligandos. El gran número de puentes de hidrógeno da una enorme estabilidad a la estructura terciaria (Thompson et al., 1999).

Tabla II. Identidad de secuencias de aminoácidos entre FABP^a

	AFABP	MFABP	KFABP	HFABP	IFABP	LFABP
AFABP	100	67	51	64	28	22
MFABP		100	52	58	28	23
EFABP			100	46	23	18
HFABP				100	31	24
IFABP					100	24
LFABP						100

^a Los porcentajes fueron calculados en base a una longitud promedio de 132 aminoácidos. Extraído de Banasazak et al., (1994).

2.3.4. La hipótesis del “portal”

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

La hipótesis del “portal” sugiere que la entrada del ácido graso en la cavidad de las FABP tiene lugar a través de un área dinámica, constituida por la hélice α II y residuos de los giros entre las cadenas β C y β D, y las cadenas β E y β F

(Sacchetti et al., 1989; Friedman et al., 2006). Estudios comparativos de cristalografía de las formas apo- y holo-IFABP dieron como resultado que, si bien los esqueletos carbonados de ambas formas eran casi superponibles, la forma apo- se encuentra en un estado un poco más abierto al solvente que la forma holo- en la región portal (Scapin et al., 1992; Sacchetti et al., 1992). Estudios posteriores de las estructuras en solución, utilizando la técnica de NMR, permitieron observar que la forma apo- IFABP posee una región discreta de desorden en comparación con la forma holo-, siendo esta más pronunciada en la región C-terminal de α hélice II y el giro entre las cadenas C-D (Hodsdon et al., 1997). En base a estos resultados se postuló que apo-IFABP existe en solución como una población heterogénea de formas localmente ordenadas y desordenadas en equilibrio (Hodsdon et al., 1997).

Estudios recientes han sugerido diferentes mecanismos de unión de los ligandos para I- y AFABP, considerando la posición de los puntos de entrada en distintos lugares de las proteínas (Friedman et al., 2006).

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

La función del tubo intestinal en conjunto con el hígado y el páncreas, es digerir el alimento, reducir los hidratos de carbono, lípidos y proteínas a moléculas que puedan ser absorbidas por la mucosa (Bloom et al., 1995). Los lípidos de la dieta, constituidos principalmente por triglicéridos y en menor medida por ésteres de colesterol y fosfolípidos, son emulsionados en el duodeno gracias a la acción de las sales biliares y los movimientos peristálticos de las paredes del intestino, formando micelas. La formación de dichas micelas incrementa enormemente la fracción de lípidos expuestos a la acción de las lipasas en el entorno acuoso del intestino; generándose como resultado diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Lehninger, 2005). Las células intestinales absorbentes pueden incorporar fácilmente ácidos grasos libres de cadena larga; para ello se postulan dos mecanismos de absorción: a) difusión pasiva y b) transporte facilitado.

Específicamente sn-2-monoacilglicerol y los ácidos grasos libres, generados por la acción de la lipasa pancreática sobre los triglicéridos ingeridos con la dieta, son absorbidos del lumen intestinal hacia el interior de los enterocitos. La absorción de los ácidos grasos por el enterocito ha sido históricamente interpretada como un proceso de difusión simple a través de la membrana plasmática. Trabajos recientes han demostrado la existencia de proteínas de membrana existentes en células absorbentes del epitelio intestinal que estarían facilitando la entrada de dichos componentes lipídicos. Hasta la actualidad se han caracterizado las siguientes proteínas: proteína que une ácidos grasos de membrana plasmática (PM-FABP), ácido graso translocasa (FAT) y proteína transportadora de ácidos grasos tipo 4 (FATP 4). Más aún, trabajos realizados en líneas celulares establecidas (IEC-6 y Caco-2) han demostrado una cinética saturable de incorporación de ácidos grasos al citoplasma para ácidos grasos de cadena larga así como para el sn-2-monoacilglicerol (sn-2-MG) (Murota et al., 2001, Murota et al., 2005, Trotter et al., 1996). De todas maneras se ha postulado la coexistencia de ambos tipos de mecanismos de incorporación de los principales productos de la digestión de triacilglicéridos en el intestino (Murota et al., 2005).

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. En condiciones normales dichas vías metabólicas representan el 20 y 80 % de los triacilglicéridos totales de los quilomicrones, respectivamente (ver Ho et al., 2002). La vía que involucra monoacilglicéridos procede por directa acilación del sn-2-monoacilglicérido con un ácido graso-CoA, dando como producto sn-1,2-diacilglicerol como intermediario. El complejo enzimático "triacilglicerido sintetasa" es el responsable de llevar a cabo la ruta antes mencionada y se encuentra en la superficie citosólica del retículo endoplasmático (Lehner et al., 1995). Cuando los niveles de ácidos grasos libres y el sn-2-MG son bajos, la ruta del glicerol-3-fosfato se convierte en la vía principal de síntesis en el enterocito (ver Ho et al., 2002). Esta ruta involucra la acilación del glicerol-3-fosfato con ácido graso-CoA para rendir ácido lisofosfatídico; que luego de acilarse y desfosforilarse se transforma

en diacilglicerol. La conversión de diacilglicerol a triacilglicerol, catalizado por diacilglicerol aciltransferasa, representa el paso final para ambas rutas metabólicas. Los triacilglicéridos producidos por ambas rutas metabólicas son incorporados en los quilomicrones, estos pasan al sistema linfático para luego llegar al sistema sanguíneo haciendo entrega de su carga a los diferentes tejidos.

Estudios realizados en células en cultivo y en animales enteros han permitido observar que los enterocitos pueden absorber ácidos grasos desde la cara basolateral, además de hacerlo desde la luminal. (Ho et al., 2002; Gangl et al., 1975). Los ácidos grasos incorporados por vías diferentes son metabolizados de manera diferencial, mientras que los ácidos grasos incorporados por la cara luminal del intestino son principalmente incorporados en triacilglicéridos, los ácidos grasos incorporados a través de la cara basolateral son principalmente utilizados en la β -oxidación y en la producción de fosfolípidos de membrana (Ho et al., 2002, Gangl et al., 1975). Esta es una condición única inherente al epitelio intestinal y ha sido poco estudiada.

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

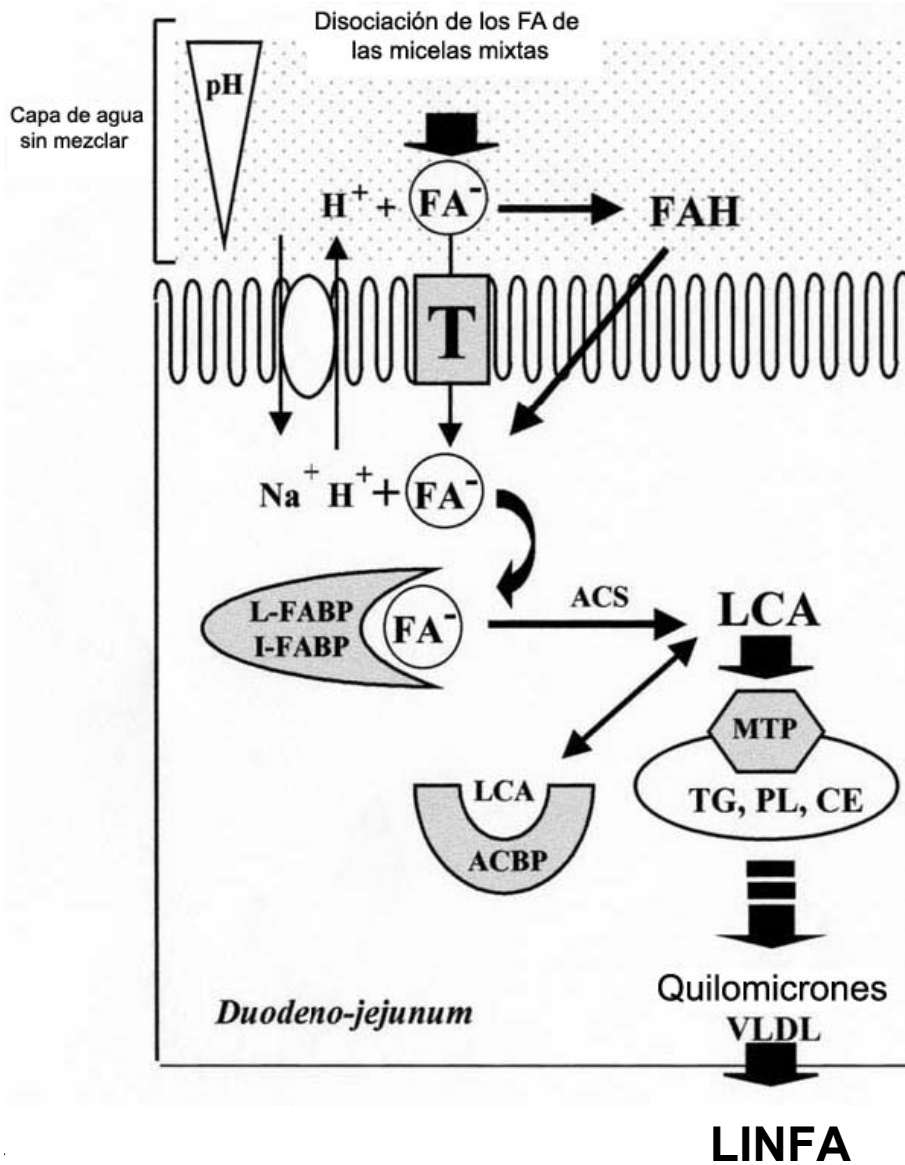


Fig. 2: Pasos principales en la absorción de los ácidos grasos. Las proteínas que unen ácidos grasos de membrana y citosólicas se muestran en gris. FA^- -ácido graso ionizado; FAH -ácido graso protonado; T -absorción mediada por transportador proteico; L-/IFABP - proteínas que unen ácidos grasos de hígado e intestino respectivamente; ACS -acil CoA sintetasa; LCA -acil CoA de cadena larga; ACBP -proteína que une acil CoA; MTP -proteína transportadora de triglicéridos; PL -fosfolípidos; CE -ésteres de colesterol; VLDL - lipoproteína de baja densidad. Tomado de Besnard et al. (2002).

4. FABP del intestino delgado de mamíferos

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

4.1. Diferencias entre I- y LFABP

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

Distribución tisular. LFABP se expresa tanto en hígado como en el intestino delgado, mientras que IFABP lo hace exclusivamente en el intestino delgado (Bass et al., 1988).

Diferencias estructurales. I- y LFABP presentan un bajo nivel de homología de secuencia, correspondiente con un 24% (Banaszak et al., 1994). Los elementos de

estructura secundaria son básicamente los mismos con la excepción de la presencia en IFABP de una hélice anfipática en el segmento α I. El patrón de puentes de hidrógeno descrito anteriormente difiere en LFABP en la región desde β F a β G. En comparación con el resto de los miembros de la familia, faltan al menos cuatro interacciones entre dichas cadenas, más aún el giro β entre β G y β H tiene dos residuos menos que los otros miembros de la familia. De esta manera LFABP, exclusivamente, presenta una segunda apertura en el barril β junto con la existente entre β D y β 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\AA^3 . La cavidad de IFABP por otra parte es mucho menor presentando un volumen aproximado de 353\AA^3 . Estas diferencias en el volumen de la cavidad probablemente sean las responsables de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que unen I- y LFABP.

Especificidad y afinidad por los distintos ligandos. LFABP presenta el rango más amplio de ligandos de la familia de las FABP, puede ligar ácidos grasos con muy alta afinidad, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (Thompson et al., 1999). Por el contrario IFABP es capaz de unir solamente ácidos grasos. Considerando solamente los ácidos grasos, LFABP presenta una estequiometría que le es única en la familia ya que es capaz de unir dos ácidos grasos al mismo tiempo mientras que IFABP sólo puede unir un ácido graso por vez. Estudios de afinidad de las distintas FABP por distintos ácidos grasos utilizando la sonda fluorescente ADIFAB demostraron que las constantes de disociación para toda la familia de FABP se encuentran en el rango de 2 hasta 1000 nM (Richieri et al., 1994). Más específicamente IFABP de rata mostró la mayor variación de los valores de K_d de acuerdo a los distintos ácidos grasos analizados, observándose valores de $K_d = 6$ nM para el ácido esteárico hasta $K_d = 480$ nM para el ácido linolénico. Esta disminución en la afinidad está de acuerdo con un aumento en las insaturaciones del ligando y por ende con su mayor solubilidad en agua. LFABP, por otra parte, mostró una gran afinidad tanto por los ácidos grasos saturados como por los insaturados, variando

desde $K_d = 9$ nM para el ácido esteárico hasta $K_d = 69$ nM para el ácido linolénico. El segundo sitio de unión descrito para LFABP mostró también altas afinidades por los distintos ligandos probados, siendo equivalentes en el caso de los ácidos grasos saturados pero 10 veces más débiles que el primer sitio para el caso de los ácidos grasos insaturados (Richieri et al., 1994).

4.2. Funciones biológicas de I- y LFABP

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

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

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

4.2.1. Estudios funcionales *in vitro*

Ensayos de transferencia de energía de resonancia. Mediante un ensayo que permite el monitoreo directo de la transferencia de ácidos grasos desde FABP hacia membranas artificiales (Storch et al., 1990) se han detectado marcadas diferencias entre I- y LFABP (Hsu et al., 1996; Thumser et al., 2000). Los resultados de estos estudios han demostrado que la velocidad absoluta de transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) hacia membranas es mayor desde IFABP que desde LFABP. Más aún, el mecanismo aparente de transferencia de ácidos grasos en estas dos proteínas es diferente. Mientras que la transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas ocurre por interacción colisional directa de la proteína con la bicapa fosfolipídica, la transferencia de ácidos grasos desde LFABP estaría de acuerdo con un mecanismo mediado por difusión acuosa. En base a estos resultados, se ha sugerido que estas dos FABPs de enterocito, podrían estar desempeñando funciones diferentes dentro de la célula intestinal en la regulación del transporte de los ácidos grasos y su utilización. Mientras que LFABP podría estar funcionando como un buffer citosólico de ácidos grasos, IFABP podría estar involucrada en la señalización de los ácidos grasos a ser transportados desde y hacia membranas subcelulares.

Interacción de IFABP con membranas. Utilizando una variante de IFABP que carece de región alfa-helicoidal (HL-IFABP) (Cistola et al., 1996), se ha demostrado la importancia crítica del dominio alfa-helicoidal en la interacción de IFABP con membranas y en su mecanismo de transferencia de ácidos grasos (Córsico et al., 1998). Asimismo, analizando la unión de IFABP y HL-IFABP a monocapas fosfolipídicas (Wu et al., 2001), se han obtenido datos a nivel de estructura molecular que permiten corroborar las medidas cinéticas previas,

indicando que la región alfa-helicoidal es esencial para el mecanismo colisional de transferencia de ácidos grasos y la interacción con membranas.

4.2.2. Estudios a nivel celular

Se han utilizado técnicas de biología molecular con el objetivo de alterar los contenidos celulares de I- y LFABP. Estos modelos se logran mediante la transfección de distintas líneas celulares de mamífero, con el cDNA antisentido (para lograr la anulación de la expresión); o el cDNA sentido (para lograr la sobreexpresión), insertos en un vector plasmídico conveniente bajo el control de un promotor constitutivo o inducible.

Existen varias líneas celulares establecidas que presentan niveles muy bajos o virtualmente nulos de expresión de FABP que resultan en modelos muy interesantes para abordar en primera instancia el rol de las FABP en procesos biológicos. Entre estas líneas encontramos HepG2, L-fibroblastos, H9c2, Caco-2 y hBRIE 380.

La transfección de fibroblastos de ratón con el cDNA de LFABP provocó un incremento del 50 % en la absorción de los ácidos grasos y su rápida incorporación en triacilglicéridos y fosfolípidos (Prows et al., 1995).

Los estudios realizados en células en cultivo vinculados con la función de IFABP no son concluyentes. La sobreexpresión de IFABP en fibroblastos de ratón no provocó ningún cambio en la absorción de los ácidos grasos del medio pero se observó un incremento en los niveles de triacilglicéridos y ésteres de colesterol (Prows et al., 1995, Prows et al., 1996). Sin embargo, la transfección de células embrionarias con IFABP resultó en un significativo incremento de la absorción de los ácidos grasos del medio (Atshaves et al., 1998). La línea celular Caco-2, proveniente de un carcinoma de colon humano, representa un modelo muy interesante para el estudio del metabolismo intestinal ya que mimetiza células del epitelio intestinal. Sin embargo, a diferencia de lo que se observa en enterocitos normales, donde I- y LFABP son expresadas abundantemente y en concentraciones equivalentes, las células Caco-2 expresan cantidades muy bajas

de I-FABP pero cantidades normales de L-FABP. La transfección de células de la línea Caco-2 con el mutante natural Thr⁵⁴-IFABP (ver más adelante) dio como resultado incrementos notables en el transporte de ácidos grasos de cadena larga y en la secreción de triacilglicéridos cuando se comparó con células de la misma línea transfectadas con la proteína salvaje (Ala⁵⁴-IFABP) (Baier et al., 1996). Cabe destacar que medidas de afinidad realizadas con este mutante natural mostraron una afinidad dos veces mayor que la proteína nativa (Baier et al., 1995), lo que permitiría explicar, en parte, los resultados de los experimentos de transfección. Más aún, estudios de sobreexpresión de IFABP en células de la línea Caco-2, dieron como resultado una menor incorporación de ácidos grasos y diferencias en ciertos marcadores de diferenciación afectados, así como también un efecto inhibitorio de la proliferación celular postulando un rol para IFABP en el proceso de diferenciación (Darimont et al., 2000). Finalmente, estudios de sobreexpresión de IFABP en un cultivo primario de epitelio intestinal humano normal arrojaron resultados poco definitivos no observándose diferencias en la esterificación de lípidos, síntesis de lipoproteínas, y ensamblaje de lipoproteínas (Montoudis et al., 2006).

4.2.3. Estudios *in vivo*

La primera evidencia *in vivo* sobre un rol diferencial de las distintas FABP del intestino delgado surge de la directa observación de los diferentes patrones de expresión observados a lo largo del eje céfalo-caudal del intestino de mamíferos (Poirier et al., 1997) y del eje cripta-vellosidad (Shields et al., 1986; Halldén et al., 1997); así como también la expresión de LFABP en el hígado en relación con la región de alta metabolización de ácidos grasos de dicho órgano (Bass et al., 1990). Alteraciones en la actividad del metabolismo lipídico, ya sea producto de diversas patologías o manipulaciones experimentales, generalmente coinciden con cambios similares en el contenido de FABP del tejido (ver review Glatz et al., 1996). Específicamente, el incremento del contenido de grasa de la dieta resultó

en un incremento marcado del contenido de FABP citoplasmática de hígado, intestino, corazón y riñón (Veerkamp et al., 1991).

En algunos individuos de la población aborigen de Pima de los EEUU, se observó una alta tasa de oxidación de grasas. Esta diferencia en el metabolismo lipídico fue directamente asociada a una sustitución de un solo aminoácido (Ala54→Thr54) en la secuencia de IFABP (Baier et al., 1995). Como se describió anteriormente esta mutación provoca un aumento en la afinidad por los ácidos grasos dos veces superior en relación a la proteína nativa. Este hallazgo sugiere que IFABP participaría en la absorción y metabolización de los ácidos grasos en el intestino.

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar el rol *in vivo* de ciertas proteínas es la ablación del gen codificante en cuestión en un organismo completo. De esta manera se generaron los ratones *knock-out* para I- y LFABP.

La ablación del gen que codifica para LFABP en ratones (Martin et al., 2003, Newberry et al., 2003) no ha dado como resultado modificaciones fenotípicas sustanciales en estos animales. En principio no se observaron diferencias de apariencia, morfología y viabilidad en dichos ratones *knock-out* con respecto a las cepas naturales. Los niveles totales de los lípidos hepáticos, ácidos grasos no esterificados y triacilgliceroles, mantuvieron sus valores normales. No obstante la capacidad de unión de ácidos grasos por parte del citosol de células hepáticas se vio significativamente reducido. Se ha observado una reducción de la absorción de ácidos grasos del plasma sanguíneo y una clara reducción de los depósitos intracelulares de triacilglicéridos. Por otra parte, luego de 48 horas de ayuno la absorción de ácidos grasos y su oxidación, así como también los niveles de colesterol fueron mucho menores para la línea *knock-out* con respecto a la cepa natural (Neuberry et al., 2003). Otros estudios, en los cuales la cepa *knock-out* fue alimentada con una dieta estándar, una cetogénica o diabetogénica dieron resultados muy similares a los descritos anteriormente; en todos los casos se observaron tasas de oxidación de ácidos grasos mucho más bajas que miembros de la cepa natural en idénticas condiciones (Erol et al., 2004).

En el caso de la ablación del gen que codifica para IFABP, se demostró claramente que IFABP no es esencial para la absorción de la grasa de la dieta (Vassileva et al., 2000). Los ratones demostraron ser viables y fértiles, la característica más llamativa fue un incremento en el peso corporal de los machos de la cepa *knock-out* con respecto a los machos de la cepa normal. Una consecuencia que fue observada en ambos sexos fue el incremento de la concentración de insulina en sangre aún con niveles normales de glucosa. Estudios recientes utilizando ratones deficientes en la expresión de IFABP, mostraron que la pérdida de IFABP causa un incremento en la expresión de los genes *Fabp1* y *Fabp6* tanto en machos como en hembras (Agellon et al., 2006). Es llamativo, que a pesar de su abundante expresión en enterocitos, la ausencia de IFABP no determinó cambios drásticos en la morfología del órgano. El incremento de la expresión de LFABP e ILBP en enterocitos de ratones *knock-out* para el gen de IFABP, estaría indicando un posible efecto compensatorio atenuando los posibles efectos de la ablación (Agellon et al., 2006)



Objetivos

Como se ha descrito anteriormente, dos miembros de la familia de las FABP, I- y LFABP, se coexpresan en los enterocitos de mamífero. Se ha sugerido que IFABP podría participar en el tráfico de los ácidos grasos a través del citoplasma mientras que LFABP podría funcionar como buffer de los altos niveles de ácidos grasos y monoacilglicéridos que ingresan en dichas células. Sin embargo, las funciones específicas de dichas proteínas no se conocen completamente.

El objetivo general de este proyecto fue analizar las diferencias a nivel molecular entre IFABP y LFABP responsables de las amplias diferencias funcionales en el transporte de ácidos grasos. Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el mecanismo de transferencia colisional desde IFABP hacia membranas artificiales. Específicamente, analizar el rol de los residuos superficiales de IFABP y el efecto de la composición de distintas membranas aceptoras en el mecanismo “colisional” de transporte de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas. Para ello se obtuvo una variante de IFABP modificada químicamente, mediante la acetilación de los residuos catiónicos superficiales. Las propiedades de transferencia de esta variante fueron evaluadas mediante el ensayo de transferencia de energía de resonancia hacia vesículas de distinta composición en comparación con la proteína nativa.
- Determinar la importancia de las hélices α -I de I- y LFABP en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos hacia membranas. Este objetivo se llevó a cabo mediante la construcción de un par de proteínas quiméricas I/LFABP, intercambiando la región α -I. Las propiedades de transferencia de los ácidos grasos de las proteínas quiméricas fueron analizadas utilizando el ensayo de transferencia de energía de resonancia y comparadas con sus correspondientes proteínas nativas.
- Analizar la interacción física de las FABP con membranas. Para llevar a cabo este objetivo se empleó un método de fotocrosslinking con membranas

Objetivos

conteniendo un reactivo fotoactivable. Esta técnica permitió evidenciar en forma directa la interacción de FABP con membranas y determinar la identidad de él o los dominios involucrados en dicha interacción. Se utilizaron la proteína nativa de intestino y una serie de variantes estructurales de I- y L-FABP obtenidas en nuestro laboratorio.



Materiales.

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

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

Ensayos Bioquímicos y Biofísicos. Los antroiloxi derivados de los ácidos grasos oleico (12-(9-antroiloxi) oléico (12AO)) y esteárico (12-(9-antroiloxi) esteárico (12AS)) fueron adquiridos a Molecular Probes (USA). Los fosfolípidos naturales y fluorescentes para fabricar las membranas artificiales: fosfatidil colina de huevo (EPC), fosfatidilserina de cerebro porcino (PS), cardiolipina de corazón bovino (CL) y 1-Oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina (NBD-PC) fueron adquiridos a Avanti Polar Lipids (USA). La fluorescamina utilizada para la cuantificación de la acetilación fue comprada a ICN Pharmaceuticals (USA). El precursor no iodinado del reactivo fotoactivable (TID-PC) fue donado gentilmente por el Profesor J. Brunner (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland). El ^{125}I fue comprado a Perkin Elmer (USA). Las placas de cromatografía en capa fina fueron adquiridas a Merck (Alemania). Los reactivales fueron adquiridos a Pierce (USA). El agente

proteolítico (2-2'-Nitrofenilsufenil)-3-metil-3'-bromoindolenina (BNPS-Skatolato) fue adquirido a Sigma Aldrich (USA).

Métodos.

1. Procedimientos generales

1.1. Técnicas de Biología Molecular:

1.1.1. Minipreparación de Plásmidos. La obtención de DNA plásmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó según el protocolo que figura en Sambrook et al, (2001). De esta manera se transfirió 1 ml de cultivo bacteriano a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 12000 rpm durante 1-2' a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100 µl de una solución Tris-ClH 25 mM, EDTA 10 mM, pH= 8, agitando en vortex. Se adicionaron 200 µl de una solución NaOH 0,2 M, SDS 1 %, recientemente preparada. Se agitó suavemente por inversión, hasta la disolución del pellet, y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 150 µl de una solución acetato de potasio 5M, ácido acético 11,5% v/v, enfriada en hielo. Se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionaron 450 µl de fenol-cloroformo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionó 1 ml de etanol 96 % y se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y se invirtió cuidadosamente el tubo sobre un papel absorbente y se dejó secar a temperatura ambiente. Se disolvió el pellet en 20 µl de agua bidestilada estéril y se midió en una dilución apropiada la absorbancia a 280 y 260 nm. Se agregó RNAsa en una concentración aproximada de 20 µg/ml y se guardó a -20 °C. La presencia de plásmidos con los distintos insertos se evidenció mediante una digestión con las enzimas de restricción correspondientes y electroforesis en geles de agarosa.

1.1.2. Electroforesis en geles de agarosa. Esta técnica fue utilizada en el análisis y separación de fragmentos de DNA en base a su peso molecular. Se preparó una solución de agarosa en un porcentaje adecuado como para resolver el/los fragmentos de interés. La solución se preparó en buffer Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH=8 y se agregó 1 µl de Bromuro de Etidio de una concentración 10 mg/ml.

1.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa. La técnica utilizada para la extracción de DNA a partir de geles de agarosa fue una adaptación del procedimiento descrito en el manual de DNA Gel Extraction Kit, Millipore. Se cortaron con bisturí las distintas bandas de interés del gel de agarosa bajo luz ultravioleta y se trituró sobre una superficie lisa. Los trocitos de gel fueron depositados en filtros de 0,22 µm, los cuales encastran en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó a 13000 rpm en una microcentrífuga refrigerada durante 7 minutos. Con el volumen eluido se realizó una precipitación con etanol.

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

1.1.5. Digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son elementos útiles debido a su especificidad y a que generan terminales ligables, lo que permite el corte y análisis del DNA. Todas las digestiones fueron realizadas según el siguiente protocolo: 2 µl H₂O bidestilada estéril, 0,5 µl 10X Buffer provisto junto con las enzimas a utilizar, 0,5 µl 10X BSA, 1 µl DNA (concentración

aproximada 1 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$), 0,5 μl enzima 1, 0,5 μl enzima 2. En un volumen final de 5 μl . Se incubó 2 hrs a 37 °C.

1.1.6. Ligazón. Mediante una reacción se ligazón se favorece la formación de enlaces fosfodiéster, pudiendo unir fragmentos de DNA de distinto origen. Para una ligazón, se utilizó una relación inserto/vector 3:1 (mol:mol), 1 μl 10X buffer ligasa provisto junto con la enzima, 1 μl enzima T4 DNA ligasa, H₂O bidestilada estéril hasta completar un volumen final de 10 μl . Las reacciones fueron incubadas durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

1.1.7. Obtención de células competentes. Este protocolo permite generar y almacenar bacterias competentes. Las mismas han sido utilizadas en las sucesivas transformaciones. Se inocularon 3 ml de medio de cultivo líquido LB (Bacto-triptona 1%, Bacto-levadura 0,5%, NaCl 1%) sin antibiótico con un stock de bacterias no competentes recién descongeladas. Se incubó toda la noche a 37°C, con agitación fuerte. Se diluyeron los 3 ml de cultivo en 100 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte hasta $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$. Se dejó enfriar depositando el cultivo sobre hielo durante aproximadamente 10-15 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 30 ml de buffer RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15 %, pH=5,8, se esterilizó con filtro de 0,22 μm . Se incubó sobre hielo durante 90 minutos y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 4 ml de buffer MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glicerol 15 %, pH= 8,0, se esterilizó mediante autoclave. Las bacterias fueron almacenadas a -70°C en alícuotas de 500 μl .

1.1.8. Transformación de Bacterias competentes. Mediante esta técnica se logra la incorporación en el citoplasma bacteriano de DNA plasmídico. En este trabajo de tesis se han transformado células pertenecientes a distintas cepas de *E. coli* (JM109 y BL21 (DE3)). Se tomaron 5 μl de una reacción de ligazón y se

depositaron en un Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 100 µl del stock de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se aplicó un shock térmico incubando en un baño termostatzado a 42°C durante 50 segundos, seguidos de dos minutos de incubación sobre hielo. Se agregaron 900 µl de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte durante 2 horas a 37°C. Se realizaron al menos dos diluciones del cultivo y se distribuyeron sobre placas de medio LB con agar conteniendo el antibiótico correspondiente. Se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Se seleccionaron varias colonias y se constató la presencia del plásmido mediante una minipreparación de plásmidos. Las bacterias transformadas fueron almacenadas a -70°C con una concentración final de glicerol del 20 %.

1.2. Técnicas para análisis de proteínas.

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

- **Técnica de Lowry** (Lowry et al, 1951). La curva estándar se construyó empleando albúmina sérica 0,5 mg/ml, los tubos del estándar así como las muestras a evaluar se prepararon por duplicado. La solución de coloración de Lowry se preparó a partir de la mezcla de dos soluciones: A (1 parte de tartrato de sodio y potasio al 4%, 1 parte de SO₄Cu al 2%, 98 partes de CO₃Na₂ 3% en NaOH 0,1 N) y B (1 parte de Folin-Ciocalteu: 1 parte de agua bidestilada).

En cada tubo de reacción se colocó el volumen correspondiente de muestra o estándar, el cual se llevó a 200 µl con agua bidestilada y luego se agregó 1 ml de la solución A agitando en vortex. Finalmente, se agregaron 100 µl de solución B agitando en vortex. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 30 a 60 minutos. Se midió la absorbancia a 750 nm.

- **Coefficiente de Extinción Molar.** En los casos donde el coeficiente de extinción molar de la proteína era conocido se calculó la concentración de la misma aplicando la Ley de Lambert-Beer, midiendo la absorbancia a 280 nm:

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

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

1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. En la mayoría de los casos la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método glicina-SDS-PAGE de Laemmli (Laemmli, 1970). Se emplearon geles en una concentración de 15 % acrilamida, con un espesor de 0,7 ó 1 mm y de dimensiones 6 cm de alto por 8 cm de largo. La tinción se realizó con una solución 0,1 % Coomassie Blue R-250 en H_2O :metanol:acético (5:5:2). La decoloración se efectuó con una solución 10 % ácido acético 30 % metanol. Para el análisis de péptidos se utilizaron geles de poliacrilamida del sistema tricina-SDS-PAGE según el método de Schägger et al. (1987). En estos casos se utilizaron geles de 16,5 % T 6 % C. Donde T significa la cantidad de monomero utilizado y C la cantidad de crosslinker. Se utilizaron las mismas dimensiones que en los geles comunes descritos anteriormente. Una vez terminada la corrida electroforética se incubaron los geles en la solución fijadora (metanol 50 %, acético 10 %) durante 20 minutos. A continuación fueron coloreados con una solución 0,025 % Coomassie Blue R 250 en 10% acético durante 2 horas. La decoloración se llevaba a cabo con ácido acético del 10 % durante dos horas. En ambos tipos de geles las muestras fueron incubadas, en los correspondientes buffer muestra, durante 5 minutos a 100°C antes de la siembra.

1.3. Análisis estadístico.

Los experimentos se realizaron por triplicado como mínimo. En los casos en que no fue así, se lo ha indicado convenientemente. Los resultados se expresan como las medias con sus respectivos desvíos estándares. Las diferencias entre

las mismas fueron analizadas estadísticamente con el test “*t*” de Student. En los casos que fueron necesarios se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Los límites de confianza utilizados se señalan para cada experimento.

2. Procedimientos específicos.

2.1. Diseño y construcción de cDNAs quiméricos recombinantes a partir de I- y LFABP por intercambio de la región α .

La construcción de los cDNAs quiméricos se realizó utilizando los plásmidos recombinantes pET11d-IFABP y pET11a-LFABP, gentilmente donados por los Dres. Alan Kleinfeld y Ron Ogata (Medical Biology Institute, La Jolla, CA, USA). Se introdujo un único sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Age I en la región correspondiente al nexo entre α I y α II de dichos cDNAs. La introducción de la secuencia de reconocimiento para el enzima Age I representaba el menor número de mutaciones posibles, considerando las secuencias originales, facilitando el proceso y disminuyendo el riesgo de cambios en la secuencia proteica. La incorporación de dicho sitio de reconocimiento para Age I determinó dos mutaciones en las posiciones 65 y 66 del cDNA de LFABP y tres mutaciones para IFABP en las posiciones 65, 66 y 69. El cambio de los nucleótidos en las posiciones 65 y 66 determinaron un cambio en la secuencia aminoacídica para ambas proteínas, sustituyéndose un residuo de metionina por uno de treonina, ver **Figura 1.**

ambos casos (I- y LFABP) los primers internos 2 y 3 son complementarios entre sí. Las mutaciones a introducir se muestran subrayadas.

wI-FABP:

Antisentido 5' CAC GTT AAT ACC GGT TTT CTC CAT 3'

Interno 2

Sentido 5' ATG GAG AAA ACC GGT ATT AAC GTG 3'

Interno 3

wL- FABP:

Antisentido 5' CTC AGG CAG ACC GGT CGC CTT CAT 3'

Interno 2

Sentido 5' ATG AAG GCG ACC GGT CTG CCT GAG 3'

Interno 3

En la **Figura 2** se observa un esquema general mostrando como se introduce una mutación en un fragmento de DNA amplificado por PCR mediante el método PCR de solapamiento. Dos reacciones de PCR denominadas “primarias” generan dos fragmentos solapables, ambos portando la misma mutación introducida por los primers internos en la región de solapamiento. Dicha región permite que ambos fragmentos recombinen para producir un fragmento doble hebra completo portando la mutación. Dichos fragmentos son utilizados como DNA molde en una reacción de PCR denominada “secundaria”, utilizando esta vez solo los primers externos como únicos cebadores.

PCR's primarias. Ambas PCR's primarias se llevaron a cabo por separado, utilizando las condiciones estándar de PCR apropiadas para la amplificación deseada: 1X Pfx buffer de amplificación provisto con la polimerasa, dNTPs 0,3 mM, MgSO₄ 1 mM, 0,3 μM de primers externos e internos, 0,5-1nM DNA molde, 1 unidad de Pfx DNA polimerasa, H₂O bidestilada estéril hasta un volumen final de

50 μ l. El protocolo de tiempo y temperatura fue el siguiente: 2 minutos iniciales a 94°C, seguidos de 35 ciclos (30 seg desnaturalización a 94°C, 30 seg hibridación a 55 °C, 90 seg polimerización a 68°C), y finalmente 5 minutos a 68°C.

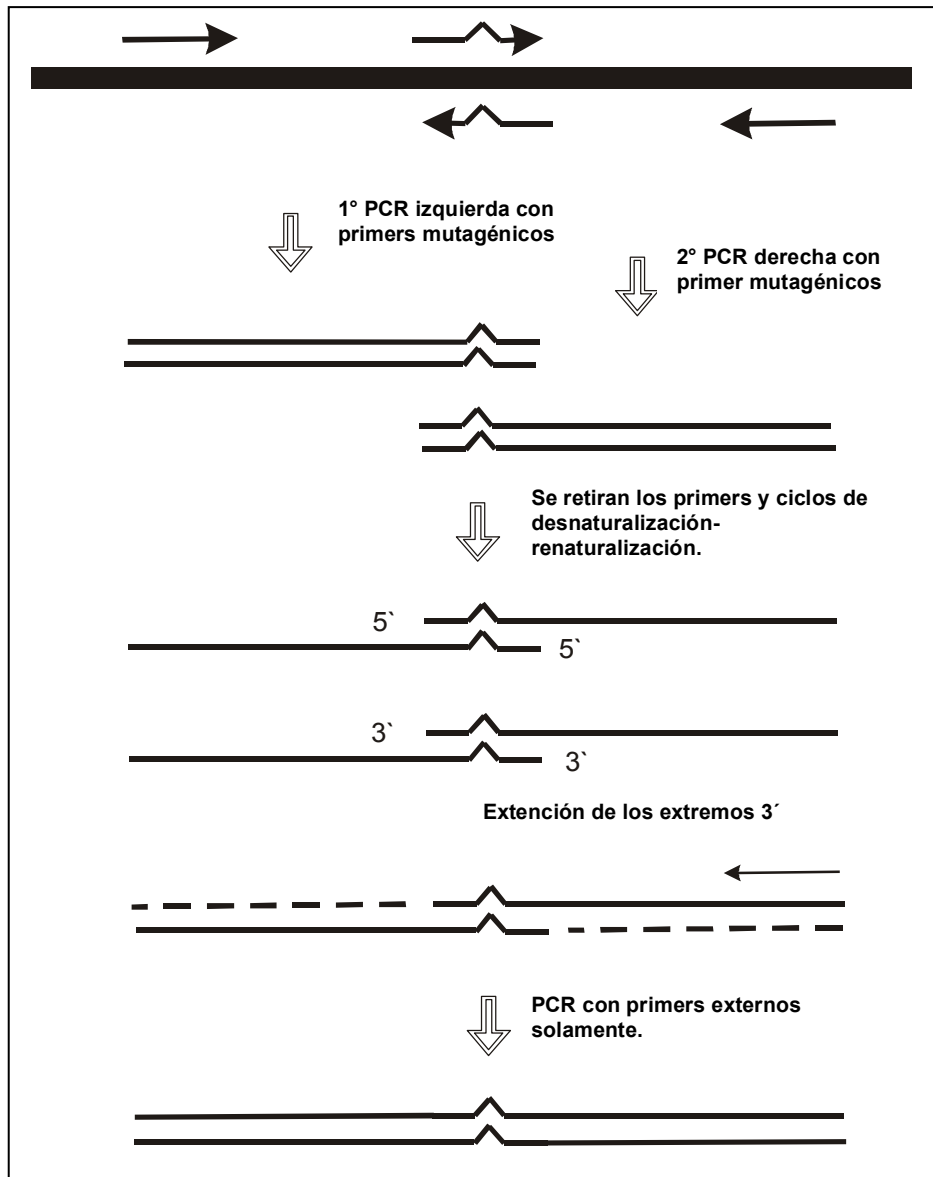


Fig. 2: Esquema mostrando los pasos de la técnica "PCR de solapamiento". (Higuchi et al., 1988)

PCR secundaria. En primera instancia, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando los productos de las PCRs primarias en ausencia de primers, se realizaron aproximadamente 10 ciclos. Luego de esos 10 primeros ciclos se agregaron los primers externos 1 y 4 en proporciones iguales y se llevaron a cabo aproximadamente 25 ciclos más con el mismo protocolo de tiempo y temperatura detallado para la PCR primaria.

Los productos de PCR portando las mutaciones fueron visualizados y purificados en geles de agarosa de acuerdo a lo antes descrito. Con el objetivo de obtener un gran número de copias, ambos insertos mutantes, se subclonaron en el vector pGEM-T y se transformaron bacterias *E. coli* JM109. Las colonias positivas fueron almacenadas a -70°C .

Los insertos portadores de la mutación fueron verificados por secuenciación (Laboratorio de Servicios en Biología Molecular de Alta Complejidad, INTA). El posterior análisis de los resultados fue realizado por alineamiento de secuencias mediante el programa CLUSTALW (Centro Computacional de San Diego, Universidad de California, San Diego, EEUU (<http://workbench.sdsc.edu/>)).

Ambos plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción Age I y Bam HI. De esta manera, a partir de cada plásmido se generaron dos fragmentos: a) región $\alpha\text{II} + \text{barril } \beta$, y b) el vector más la región $\beta\text{A} + \alpha\text{I}$. Se aislaron y purificaron ambos fragmentos por separado.

Se intercambiaron los fragmentos de I- y LFABP como se indica en la **Figura 3** de tal forma de obtener los cDNAs quiméricos recombinantes pGEM $\alpha(\text{I})\text{L}-\beta\text{IFABP}$ y pGEM $\alpha(\text{I})\text{I}-\beta\text{LFABP}$. Los cDNAs quiméricos se transformaron en bacterias *E. coli* JM109 y se almacenó a -70°C . Los resultados fueron verificados por secuenciación y posterior análisis con el programa CLUSTALW.

Con el objetivo de sobreexpresar las proteínas quiméricas en un sistema procariótico se subclonaron ambos cDNAs en el vector de expresión pET-11d. El subclonado se realizó utilizando las enzimas de restricción XbaI y BamHI. De esta manera se obtuvieron los cDNAs recombinantes pET-11d $\alpha(\text{I})\text{L}-\beta\text{IFABP}$ y pET-11d $\alpha(\text{I})\text{I}-\beta\text{LFABP}$; con los cuales se transformaron bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) y se almacenó a -70°C .

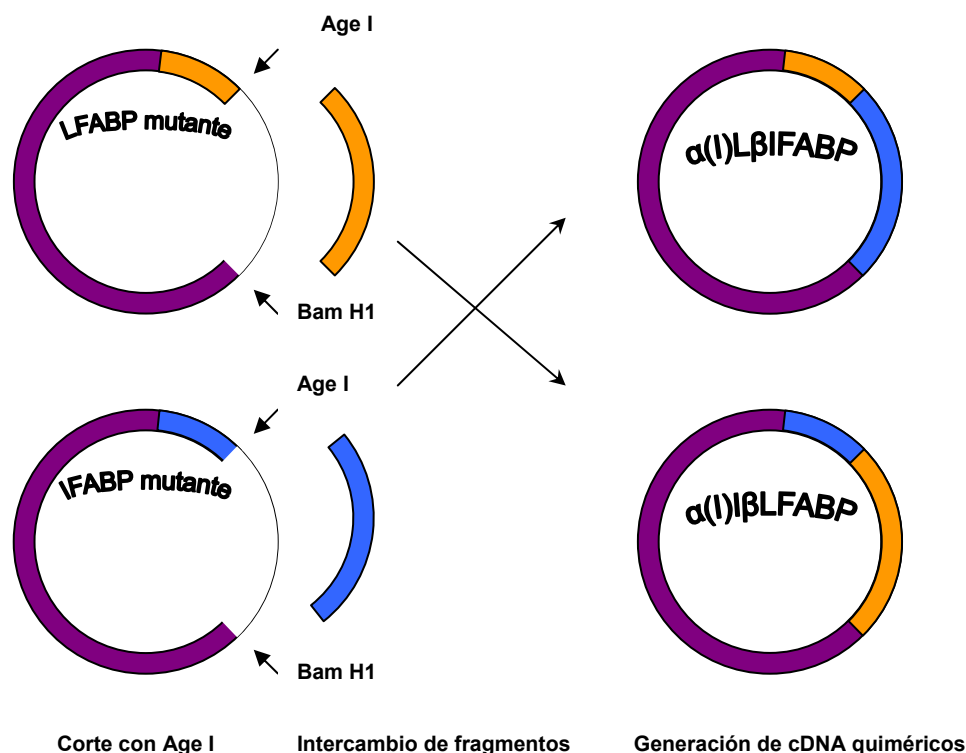


Fig. 3: Esquema mostrando la confección de los cDNA quiméricos. Se realizó un corte con las enzimas AgeI y BamH1, se aislaron e intercambiaron los fragmentos generando los cDNA quiméricos.

2.2. Purificación de proteínas recombinantes.

2.2.1. Purificación de las proteínas nativas I y LFABP. La purificación de las proteínas nativas se realizó según el método descrito por Hsu et al. (1996). De esta manera 20 ml de cultivos en medio líquido LB con ampicilina (100 µg/ml) de *E coli* BL21 transformadas con pET11d-IFABP o pET11a-LFABP fueron incubados toda la noche a 37°C. El cultivo fue diluido 1/100 en el mismo medio e incubado hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0,6$. La expresión de las proteínas fue inducida con IPTG 0,4 mM (concentración final). Las bacterias se colectaron luego de 4 horas de inducción por centrifugación, y luego de resuspender en buffer de lisis se sonicaron. Los restos de pared celular fueron descartados centrifugando la

muestra a 20000 rpm durante 45 minutos. El sobrenadante fue incubado a 4°C con una solución sobresaturada de SO_4NH_4 , para una precipitación fraccionada de proteínas. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue sembrado en una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex G-50. Finalmente se deslipidizó la muestra utilizando una columna Lipidex-1000 (Glatz et al., 1983). La pureza de las proteínas fue constatada mediante SDS-PAGE al 15% y la concentración fue asignada en base a su $\text{DO}_{280\text{nm}}$ utilizando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{\text{IFABP}} = 16900$ y $\epsilon_{\text{LFABP}} = 6000$ (Richieri et al., 1994)).

2.2.2. Purificación de la variante de IFABP carente de la región α helicoidal (HL-IFABP). La variante de IFABP carente de la región α -helicoidal, HL-IFABP, fue sobreexpresada en *E. coli* BL21 transformadas con pMON-HL-IFABP. La purificación de HL-IFABP se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para las proteínas nativas, con la excepción de la inducción, la cual se realizó con ácido nalidíxico 0,1 mM concentración final.

2.2.3. Purificación de proteínas quiméricas. Las proteínas quiméricas se purificaron a partir de cuerpos de inclusión dado que no se expresan en forma soluble. Los primeros pasos de la purificación hasta la recolección de las bacterias fueron idénticos a lo descrito para las proteínas nativas. El pellet bacteriano fue sometido a cuatro lavados con 5 ml de buffer de lisis (Tris.HCl 50 mM, NaCl 100mM, EDTA 1 mM, pH= 8.0). En tres de los cuatro lavados se agregaron DNAsa (0,01 mg/ml final), incubando 20 minutos a temperatura ambiente; deoxicolato de sodio (1 mg/ml final), incubando 10 minutos a temperatura ambiente y Tritón X-100 (0,5% final), nuevamente incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Entre los lavados, las muestras fueron sonicadas y centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se realizó un lavado exhaustivo del pellet con agua bidestilada. El pellet conteniendo los cuerpos de inclusión fue disuelto en buffer Urea 6,5 M, Glicina 5 mM, ácido fosfórico 25 mM, pH= 3,5. Se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando la matriz Sp-Sepharosa Fast Flow.

Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -70°C . Para cada uno de los experimentos las proteínas fueron renaturalizadas por diálisis contra un litro de buffer ClKPO_4 $\text{pH}=7,4$, realizando dos cambios cada 6-8 horas.

2.3. Modificación química de IFABP: Acetilación de los residuos de lisina.

2.3.1. Reacción de Acetilación. La acetilación de los residuos de lisina de IFABP se realizó según la técnica descrita por Herr et al. (1995). IFABP fue dializada contra H_2O bidestilada, filtrada y cuantificada utilizando su absorbancia. En base a la concentración molar observada de proteína se calculó el número de moles totales de residuo de lisina. Se agregó un exceso molar de 50 veces de anhídrido acético sobre la concentración de dichos residuos de lisina a temperatura ambiente. El total de anhídrido acético se agregó cada 3 minutos en un lapso total de 30 minutos; en todo momento se mantuvo el $\text{pH}=9$ con una solución de 1 N NaOH. Al finalizar la reacción, se incubó 1 hora a temperatura ambiente agregando $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ hasta una concentración final 1N, se llevó a $\text{pH}=10$. Finalmente la proteína modificada fue dializada contra buffer ClKPO_4 , filtrada y concentrada.

2.3.2. Cuantificación de la acetilación de las lisinas. La cuantificación de la acetilación se realizó empleando un ensayo con fluorescamina según Udenfried et al. (1972), en el que la emisión del fluoróforo es directamente proporcional a la concentración de aminas primarias. La curva de calibración se construyó con IFABP. Las muestras se diluyeron en un volumen final de $50\ \mu\text{l}$, se agregó 1 ml de buffer borato 0,2 M, $\text{pH}=9$ más 0,5 ml de una solución fluorescamina 1mM en acetona. Las medidas de fluorescencia se realizaron excitando 390 nm y se midió la emisión a 478 nm.

2.4. Control de la integridad estructural de las distintas variantes de FABP.

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

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

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

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

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

2.4.2. Cálculo del coeficiente de partición. El coeficiente de partición (K_p) del ligando 12AO entre FABP y SUV se determinó empleando la técnica de Massey et al. (1997). El K_p se calculó midiendo la fluorescencia del 12AO luego del agregado de EPC-NBD SUV a una solución conteniendo la proteína más el ligando fluorescente en una proporción 10:1 (μM) en buffer TBS (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH=7,4). Las medidas de fluorescencia se realizaron a una temperatura de 25°C, con una longitud de onda de excitación 383 nm y se tomaron espectros de emisión entre 400-500 nm.

$$K_p = ([\text{FABP-12AO}]/[\text{FABP}])/([\text{SUV-12AO}]/[\text{SUV}])$$

Brevemente, el agregado de las vesículas conteniendo NBD determinará una disminución de la fluorescencia inicial de la proteína en presencia del ligando. El

decaimiento en la fluorescencia del 12AO luego de la titulación con EPC-NBD SUV fue relacionada al Kp según la siguiente ecuación:

$$1/\Delta F = (1/K_p)(1/\Delta F_{\max})([FABP]/[SUV]) + 1/\Delta F_{\max}$$

Donde ΔF es la diferencia entre la fluorescencia inicial del 12AO con la proteína en ausencia de SUV y la fluorescencia del mismo a una determinada proporción FABP:SUV, y ΔF_{\max} es la máxima diferencia en la fluorescencia del 12AO. Un gráfico de $1/\Delta F$ versus $(1/\Delta F_{\max})([FABP]/[SUV])$ da una pendiente correspondiente a $1/K_p$.

2.4.3. Cálculo de la constante de afinidad. La constante de afinidad del ligando por la proteína (Kd) se calculó mediante dos métodos: a) titulación fluorimétrica utilizando 12AO como ligando fluorescente según Xu et al. (1991) y b) mediante el método de ADIFAB. ADIFAB es una sonda fluorescente que permite monitorear la concentración de ácidos grasos libres en equilibrio con la proteína cuyo Kd se quiere determinar (Richieri et al., 1994).

- a) Método de titulación fluorimétrica. En esta técnica se monitorea el incremento de la fluorescencia de un ligando fluorescente como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de proteína, con el objetivo de determinar su afinidad por el mismo. Se determinó la concentración del ligando 12AO por absorbancia usando $\epsilon_{383\text{nm}}=6400 \text{ M}^{-1}$ en etanol absoluto. Se preparó una dilución $0,5 \mu\text{M}$ del ligando en buffer TBS en una cubeta de cuarzo. Se agregaron cantidades crecientes de la proteína en un rango de 0 a $10 \mu\text{M}$, se incubó por 3 minutos y se midió la fluorescencia del 12AO. Las medidas de fluorescencia se realizaron a una temperatura de 25°C , excitando a 383 nm y midiendo espectros de emisión entre 400-500 nm. Los datos fueron analizados según Scatchard para obtener los respectivos de Kd.

b) Método utilizando ADIFAB. La sonda fluorescente ADIFAB es una IFABP modificada covalentemente con un grupo fluorescente acrilodan. La unión de los ácidos grasos a la sonda ADIFAB determina un corrimiento hacia el rojo en el espectro de emisión del acrilodan (Richieri et al., 1994). Utilizando el valor de K_d conocido de ADIFAB por el ligando específico, se pueden determinar las constantes de afinidad para otras proteínas. Se preparó una solución stock de ácido oleico 25 mM en agua a pH=9,7 25 μ M BHT. Con la misma se tituló una solución HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 1 mM, pH=7,4, conteniendo 0,2 μ M ADIFAB y 4 μ M IFABP, 4 μ M α (I)L β IFABP, 2 μ M LFABP o 2 μ M α (I) β LFABP. Se incubó por 5 minutos a 37°C y midió la emisión de fluorescencia a 505 y 432 nm, excitando a 386 nm. Se calculó la media y desviación estándar de 10 pares de R (emisión a 505 y 432 nm). La media se utilizó para el análisis de equilibrio de unión utilizando un $R_{\text{max}} = 11,5$ (Richieri et al., 1994). Los datos experimentales fueron ajustados para la unión a un solo ligando (IFABP, α (I)L β IFABP y α (I) β LFABP) o a dos sitios de unión (LFABP) y analizados según Scatchard para obtener los valores respectivos de K_d .

2.4.4. Dicroísmo Circular. Se midieron espectros en el UV lejano y en el UV cercano con el objetivo de evaluar los componentes de estructura secundaria y presencia de estructura terciaria, respectivamente. Los espectros de CD fueron tomados en un espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco Corporation, Japan). Las condiciones generales que se utilizaron para tomar los espectros fueron; velocidad de 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 segundo. Los datos obtenidos en el UV cercano (240-340 nm) o en el UV lejano (180-240 nm) fueron medidos en cubetas de 10 mm o 1 mm, respectivamente. Se tomaron 5 espectros en total para cada proteína en una concentración 0,15 mg/ml, los mismos fueron promediados. Los porcentajes de las distintas estructuras secundarias (α hélices y hoja β) fueron calculados utilizando tres algoritmos diferentes: SELCON3, CONTINLL, y CDSSTR; accesibles en el servidor del Department of Crystallography, Birkbeck College, University of London (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>).

2.4.5. Rendimiento cuántico. El rendimiento cuántico se utiliza para evaluar la hidrofobicidad relativa del entorno de un fluoróforo determinado con respecto a un fluoróforo de referencia. Se midió el rendimiento cuántico (Q_f) de 12AO unido a proteínas nativas y quiméricas, usando quinina hemisulfato como fluoróforo de referencia, con un $Q_{ref}=0,7$ (Storch et al., 1989). Se prepararon distintas soluciones de quinina hemisulfato en H_2SO_4 0,1 N, y soluciones 4 μ M 12AO en buffer TBS y etanol absoluto. Las muestras conteniendo las distintas proteínas con el ligando 12AO en una proporción 20:1 (prot:ligando) más los estándares antes mencionados fueron excitadas a 352 y 383 nm. Se registró la intensidad de emisión de fluorescencia del ligando en el rango de 430-460nm. Por otra parte se midió la absorbancia a 352 y 383 nm de las soluciones.

Con los valores obtenidos antes mencionados se procedió a calcular el factor de corrección de la lámpara, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de corrección (LF): } \frac{\text{Int prot 352} \times \text{Abs prot 383}}{\text{Int prot 383} \times \text{Abs prot 352}}$$

Una vez obtenido el factor de corrección se procedió a calcular el rendimiento cuántico del 12AO para cada una de las muestras proteicas. Se utilizó la siguiente fórmula:

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

2.5. Preparación de membranas artificiales.

2.5.1. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV). Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas de acuerdo a los trabajos de Huang et al. (1974) y Storch et al. (1986). Los lípidos en $CHCl_3$ fueron mezclados, secados bajo N_2 y resuspendidos en buffer TBS. Para las vesículas que contenían CL se utilizó buffer TBS 1 mM EDTA. La mezcla de fosfolípidos fue sonicada a 4°C bajo N_2 hasta clarificar la suspensión. Finalmente las vesículas fueron ultracentrifugadas a 50000 rpm durante 45 minutos.

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

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

2.5.3. Cuantificación de membranas artificiales. La concentración de los fosfolípidos fue determinada por un ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico según la técnica de Gomori et al. (1942). La curva estándar se preparó empleando NaH_2PO_4 1mM. Las muestras y los estándares se prepararon por duplicado. Se agregaron 30 μl de $\text{Mg}(\text{NO}_3)$ al 10% y se carbonizó bajo flama. A continuación se agregaron 400 μl de HCl 0,5 N agitando en vortex. Los tubos se incubaron por 30 minutos en baño de agua hirviendo. Terminada la incubación, se agregó a cada tubo 930 μl de una solución 1:6 (vol/vol) de ácido ascórbico (10% peso/vol): ácido molíbdico. Las muestras se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 820 nm. La concentración de las vesículas que contenían CL en su composición fue corregida de acuerdo a la relación de 2 grupos fosfatos por molécula de CL.

2.5.4. Cálculo de densidad de carga superficial de vesículas. La densidad de carga en la superficie (σ) de membranas con PC y otro fosfolípido cargado negativamente fue estimado según Pinheiro et al. (1994), empleando la formula:

$$\sigma = e_0 z_n X_n / A(1 + P X_n + X_n)$$

Donde e_0 es la carga elemental, A es el área seccional de la molécula de fosfatidilcolina, estimada en 68 \AA^2 , P es la razón entre las áreas seccionales de los fosfolípidos cargados negativamente sobre la molécula de PC, y X_n en la fracción molar de los lípidos aniónicos.

2.6. Transferencia de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) desde FABP hacia SUV.

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

En los experimentos en general, 10-30 μM FABP fueron incubados con 1-3 μM AOFA a temperatura ambiente durante 10 minutos previos a iniciar las mediciones. El AOFA fue agregado de una solución stock concentrada en etanol, quedando una concentración final de etanol en el medio $<1\%$ (v/v). Se estimó que

en una proporción de 10:1 FABP:AOFA, un 95 % del ligando se hallaba ligado a la proteína (Hsu et al., 1996). Las condiciones finales de los experimentos fueron: 5-15 μM FABP más 0,5-1,5 μM AOFA vs 150-1200 μM SUV. El buffer utilizado en los experimentos fue TBS y la temperatura utilizada en todos los experimentos fue de 25 °C.

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

$$F(t) = A \exp(-kt) + C$$

El ajuste de las distintas curvas fue realizado utilizando el software provisto por el espectrofluorómetro. Los valores de velocidad fueron tomados del parámetro k.

2.7. Preparación y utilización del reactivo fotoactivable ^{125}I -TID-PC.

El enfrentamiento de proteínas con membranas conteniendo el reactivo fotoactivable ^{125}I -TID-PC, ha permitido evidenciar el contacto físico de las mismas con membranas. Cuando la mezcla es iluminada se produce la fotólisis del grupo reactivo, rápidamente convertido en un grupo carbeno, el cual es capaz de reaccionar covalentemente con una gran variedad de grupos funcionales, incluso los enlaces C-H. De esta manera todo segmento proteico insertado o en contacto con la región hidrofóbica de la membrana quedará marcado (Weber et al., 1995).

2.7.1. Preparación de ácido peracético. Se mezclaron en una ampolla de reacción 2,5 gr de H_2O_2 de 250 volúmenes con 25 μl de H_2SO_4 concentrado. Luego se agregaron lentamente 9,5 ml de anhídrido acético, gota a gota, con agitación en baño térmico a 35 °C durante 3 hs.

2.7.2. Preparación del reactivo ^{125}I -TID-PC. El reactivo ^{125}I -TID-PC fue preparado por radioiodinación de su precursor no radiactivo (gentilmente donado por el Prof. J. Brunner, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich) según Weber et al., 1995. Se transfirieron 50 nmoles de TID-PC en un reactivial de 1 ml. Se evaporó el solvente con N_2 , se aplicó vacío durante 10 minutos y luego se disolvió en 25 μl de ácido acético. Se agregaron 2,5 mCi de ^{125}I Na. Bajo campana se agregaron 5 μl de ácido peracético para iniciar la reacción, se agitó bien y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 125 μl de 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Se agregaron 100 μl de Cloroformo:Metanol (2:1). Se agitó bien y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos. Se extrajeron los lípidos de la fase orgánica inferior y se transfirieron a otro vial; se secó con N_2 y carbón activado para absorber posibles desechos radioactivos volátiles. Una vez secos, los lípidos se resuspendieron en 100 μl de metanol:cloroformo:agua (9:1:1) y se sometió a una cromatografía de alta presión de fase reversa (RF-HPLC) usando la misma mezcla de solventes y una columna 208HS54 C8 (Vydac) en un cromatografo Merck-Hitachi con detector UV a 254 nm. El flujo de la corrida fue de 1 ml/min, y se colectaron fracciones de 0.5 ml. El ^{125}I -TID-PC eluyó a los 20 minutos, mientras que el exceso de precursor sin marcar salió a los 40 minutos. Alícuotas de 5 μl de toda la corrida fueron llevadas a un contador Gamma Packard Multiprias 1. El control de la marcación se realizó mediante TLC, alícuotas de 3 μl fueron analizadas por TLC en placas de silica gel (LK6D, 60 Å; Whatman, Clifton, NJ) y estas últimas fueron sometidas a autoradiografía. Las fracciones conteniendo radioactividad fueron juntadas, llevadas a sequedad con vacío y resuspendida en 1ml de etanol absoluto. El ^{125}I -TID-PC fue guardado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.7.3. Experimentos de “fotocrosslinking”. Las FABP nativas y las variantes fueron enfrentadas con LUVs conteniendo el reactivo fotoactivable. Las condiciones experimentales finales fueron: 16 μM FABP incubadas con 240 μM LUV, en buffer TBS glutatión 50mM, pH=7,4. Cada muestra se incubó un minuto a temperatura ambiente y se irradió con una lámpara de Xe (450 Watts) a una distancia de 15 cm durante 30 segundos. La muestra se deslipidizó agregando 3 volúmenes de Cloroformo/Metanol (2/1, v/v) y se extrajo la fase clorofórmica. Las proteínas se precipitaron con acetona en frío desde la fase acuosa y resuspendidas en buffer de siembra para SDS-PAGE. Las muestras fueron resueltas mediante SDS-PAGE. Los geles fueron secados utilizando un secador de geles Modelo 543 (Bio Rad) a 80°C durante 30 minutos y expuestos a placas autorradiográficas a -70°C por distintos períodos de tiempo, dependiendo de la marca contenida en las muestras. En los casos que se realizó una proteólisis de las FABP a continuación de la fotoactivación las proteínas fueron resuspendidas en H₂O. Ver **Figura 4**.

Experimentos de “fotocrosslinking”

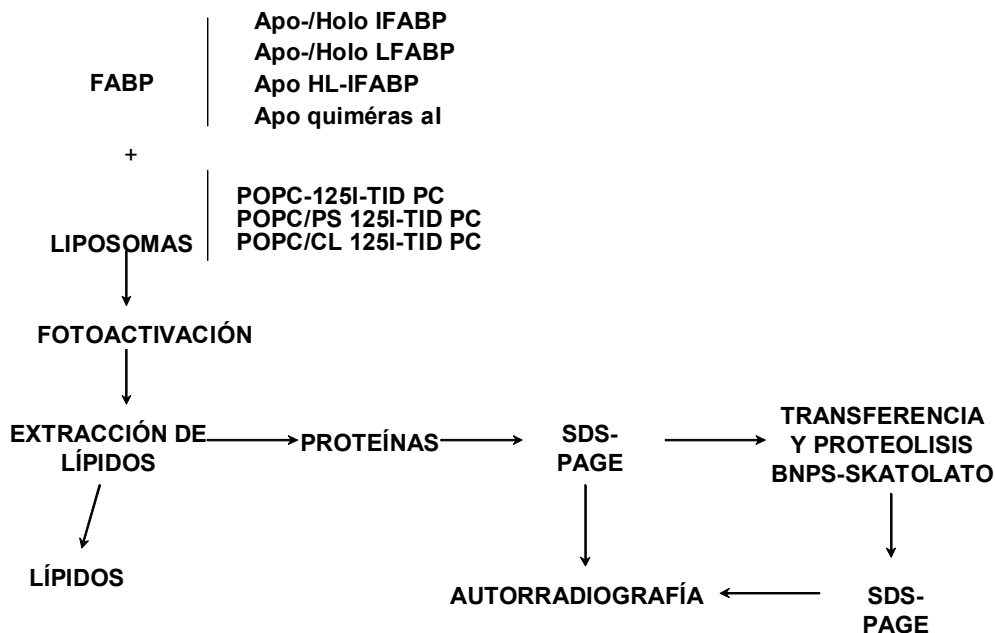


Fig. 4: Esquema mostrando los distintos pasos desarrollados durante los experimentos de fotoactivación.

2.7.4. Transferencia a membranas de PVDF. En todos los casos se realizó una electroforesis de poliacrilamida para resolver las distintas muestras proteicas. Finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Crimmins et al., 1990). La transferencia se realizó en un sistema húmedo, durante 1 hora a 100 voltios utilizando como buffer de transferencia Tris 25 mM, glicina 1,44 % p/v, metanol 20 % v/v. Para aislar las distintas bandas de proteínas, las membranas fueron teñidas con la coloración de Ponceau.

2.7.5. Proteólisis con BNPS-Skatolato de proteínas unidas a membranas de PVDF. Las bandas de proteínas unidas a membranas de PVDF fueron cortadas con un bisturí y escindidas en trocitos de aproximadamente 1mm². Se agregaron 100 µl de una solución BNPS-Skatolato 1µg/µl en ácido acético 75%. Los tubos fueron incubados 1 hora a 47 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con 500 µl de agua bidestilada. Las membranitas fueron llevadas a sequedad con vacío. Los productos de proteólisis fueron eluidos de la membrana de PVDF incubando las mismas en 35 µl de Buffer de elución (Tris 50 mM, SDS 2%, Tritón 1%, pH=9,1) durante dos horas. Luego se agregaron 7 µl de Buffer de siembra 6X (glicerol 60%, Azul de Bromofenol 0,3%, DTT 100mM). Las muestras eran directamente sembradas y resueltas en un gel de tricina (Crimmins et al., 1990).



1. Rol de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.

El mecanismo de transferencia de tipo colisional descrito para IFABP también ha sido observado en otros miembros de la familia de las FABP, incluyendo corazón (HFABP), adipocito (AFABP), queratinocito (KFABP) y cerebro (BFABP) (Kim et al., 1992; Wootan et al., 1993; Shaugnessy et al., 2000; Thumser et al., 2001). Con el objetivo de profundizar los conocimientos sobre la función de IFABP es importante determinar que características propias de la proteína y de la membrana aceptora regulan el proceso de transferencia del ácido graso. En estudios previos, se ha observado un aumento significativo en la transferencia de AOFA desde IFABP hacia vesículas conteniendo un 25% CL con respecto a vesículas zwitteriónicas (Hsu et al., 1996, Córscico et al., 1998, Córscico et al., 2004) dichos resultados sugieren la participación de interacciones electrostáticas en el mecanismo de transferencia, específicamente residuos proteicos de carga positiva podrían estar involucrados en la interacción.

Se analizó la influencia de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en el mecanismo de transferencia de tipo colisional desde IFABP hacia membranas fosfolípídicas. Con tal finalidad se aplicaron dos estrategias: a) modificación de la composición de las membranas aceptoras, y b) modificación de los residuos superficiales de la proteína. Empleando un ensayo de transferencia de energía de resonancia se analizó la transferencia de AOFA desde IFABP hacia membranas fosfolípídicas artificiales con diferente composición de cabeza polar y cadenas aciladas para examinar los efectos de las variaciones en la densidad de carga superficial y volumen hidrofóbico respectivamente. Por otra parte, IFABP fue modificada químicamente mediante una acetilación completa y selectiva de los

residuos de lisina superficiales para examinar la influencia de las cargas positivas superficiales de la proteína.

1.1. Efecto de la densidad de carga de las vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP.

La densidad de carga superficial de las vesículasceptoras puede ser un importante modulador de la velocidad de transferencia si el proceso es mediado por interacciones electrostáticas entre proteína dadora y membrana aceptora. Con el objetivo de evaluar el efecto de la densidad de carga de las vesículasceptoras se emplearon SUV con concentraciones crecientes de CL en su composición. Se analizó la velocidad de transferencia de dos ligandos diferentes, 12AS (18:0) y 12AO (18:1). El análogo de ácido graso monoinsaturado, 12AO, transfirió 10 veces más rápido que el análogo saturado, 12AS, hacia vesículas zwitteriónicas. A medida que se incorporaron cantidades crecientes de CL en las vesículasceptoras, las velocidades de transferencia de ambos derivados de ácidos grasos desde IFABP mostraron un incremento logarítmico de las velocidades de transferencia. Sin embargo la transferencia del 12AS mostró una pendiente más pronunciada que 12AO (**Fig. 1**).

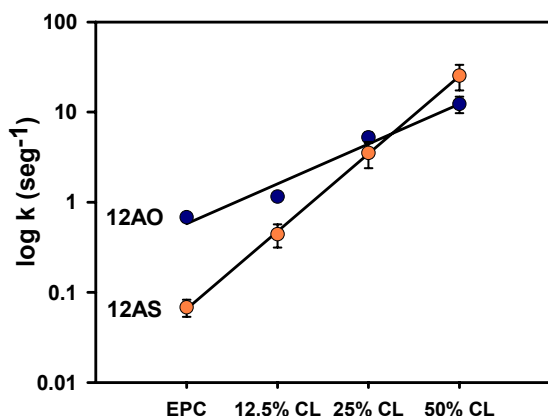


Fig. 1: Efecto del contenido de CL sobre la transferencia de AOFA desde IFABP hacia vesículas unilamelares pequeñas. Se midió la transferencia de 1,5 μM 12AO (círculos azules) o 1,5 μM 12AS (círculos naranjas) desde IFABP 15 μM hacia 150 μM SUV de EPC conteniendo 10% NBD-PC y concentraciones crecientes de CL. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

A medida que el contenido de CL se incrementó, la diferencia en las velocidades de transferencia entre 12AO y 12AS decreció. Ambos ligandos

mostraron aproximadamente la misma velocidad de transferencia para vesículas con un 25% de CL, sin embargo en presencia de un 50% de CL la velocidad de transferencia para el 12AS sobrepasó levemente la del 12AO (**Fig. 1**).

1.2. Efecto de la composición de las vesículas aceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP.

El notable incremento de la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP hacia vesículas conteniendo concentraciones crecientes de CL, pone de manifiesto la importancia de las interacciones electrostáticas superficiales en la interacción y transferencia del ligando desde la proteína. Podría ser posible que además de interactuar superficialmente, la proteína penetre parcialmente la membrana. La presencia de fosfolípidos aniónicos facilita este proceso generando perturbaciones sobre la densidad de las cadenas aciladas y estructura de la bicapa fosfolipídica, promoviendo tanto interacciones electrostáticas como interacciones no polares (Auckland et al., 2000; McLaughlin et al., 1995). Postulamos, entonces, la posible existencia de un mecanismo que involucraría interacciones de tipo electrostático iniciales seguidas de penetración de la membrana con interacciones no polares. Con el objetivo de evidenciar posibles interacciones hidrofóbicas durante el proceso de transferencia del ácido graso se realizaron experimentos utilizando SUV que variaron en su volumen hidrofóbico además de diferir en la densidad de carga superficial. Monolisocardiopina y dilisocardiopina son análogos de CL formados por la hidrólisis de una o dos de las cadenas aciladas, respectivamente, unidas a una de las moléculas de glicerol presentes en la CL. Se realizaron controles con el objetivo de detectar diferencias en la forma y tamaño de las distintas SUV que luego pudieran afectar la cinética de transferencia de ácidos grasos. Con tal finalidad, se realizaron medidas de dynamic light scattering sobre vesículas conteniendo 100% PC, 25% monolisocardiopina/ 75% PC, y 25% CL/ 75% PC. Los resultados indicaron que las suspensiones eran monodispersas, con diámetros promedio de $23,9 \pm 4,3$, $28,4 \pm 5,2$, y $36,9 \pm 6,6$ nm, respectivamente. Asimismo, se evaluó la densidad

superficial de carga de los distintos tipos de vesículas, los cálculos mostraron que todas las vesículas conteniendo un 25% de CL o alguno de sus análogos, tenían aproximadamente la misma densidad de carga (Pinheiro et al., 1994). Por otra parte, las vesículas conteniendo un 12,5% CL tenían la misma densidad de carga que las vesículas con un 25% de ácido fosfatídico (**Tabla I**).

Tabla I. Densidad de carga superficial de SUV con diferente composición fosfolipídica.*

Vesículas		σ
CL	12,5 %	-0,042
CL	25 %	-0,065
MLCL	25 %	-0,068
DLCL	25 %	-0,071
PA	25 %	-0,041

* La densidad de carga de las vesículas (σ) fue estimada como $e_0 z_n X_n / A (1 + PX_n + X_n)$, donde X_n es la fracción molar del fosfolípido cargado negativamente, z_n es la carga de los fosfolípidos aniónicos, e_0 es la carga elemental, A es el área de la sección transversal para cada molécula de fosfolípido, y P es la relación entre las áreas de los lípidos negativos con respecto a los neutrales. (Pinheiro et al., 1994)

La determinación de las velocidades de transferencia de ácidos grasos hacia membranas de diferente composición permitió observar que las velocidades de transferencia del 12AS desde IFABP hacia membranas con un 25% monolisocardiolipina y dilisocardiolipina decrecieron en un 90 y 80% respectivamente, comparadas con las velocidades observadas para vesículas con un 25% de CL (**Fig. 2**).

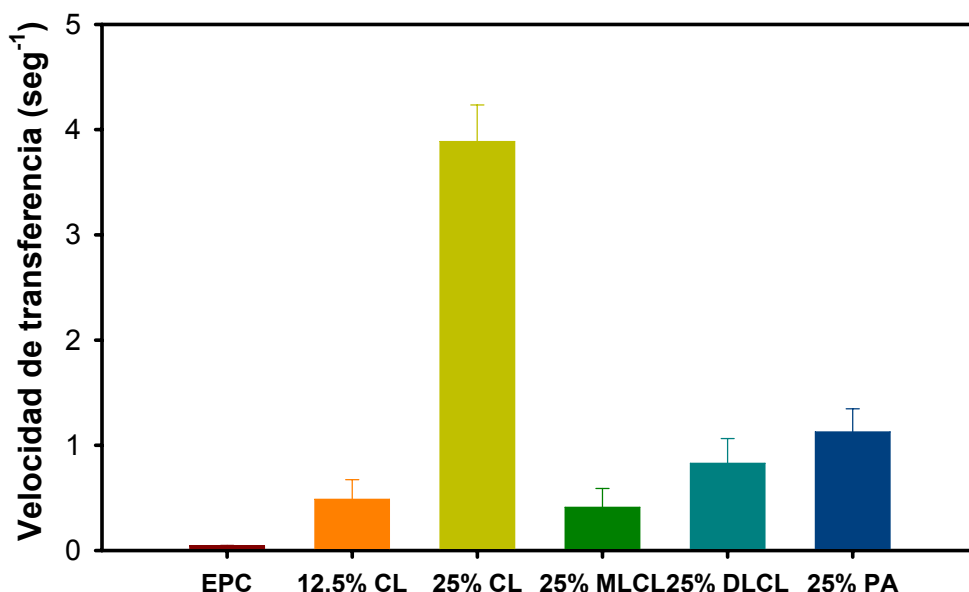


Fig. 2: Transferencia de 12AS desde IFABP a membranas con diferente composición de fosfolípidos. 15 μM IFABP y 1,5 μM 12AS fueron mezclados con 150 μM SUV compuestas por EPC:NBD-PC (90:10), 12,5% CL (EPC:CL:NBD-PC, 77,5:12,5:10), 25% CL (EPC:CL:NBD-PC, 65:25:10), 25% monolisocardiopina (MLCL, EPC:MLCL:NBD-PC, 65:25:10), 25% dilisocardiopina (DLCL, EPC:DLCL:NBD-PC, 65:25:10), o 25% ácido fosfatídico (PA, EPC:PA:NBD-PC, 65:25:10). Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

La transferencia hacia vesículas con un 25% CL fue aproximadamente 8 veces más rápida que la observada hacia vesículas con un 12,5% CL. Estos resultados junto con lo observado en la Fig.1, indicarían que la velocidad de transferencia no es estrictamente una función lineal de la carga superficial de membrana. Finalmente la velocidad de transferencia del 12AS hacia vesículas con un 25% de ácido fosfatídico fue aproximadamente el doble con respecto a la transferencia hacia vesículas con un 12,5% CL, aún cuando ambos tipos de vesículas poseen una densidad superficial de carga similar. Esto sería indicativo de que alteraciones en las propiedades de las cadenas aciladas de los fosfolípidos que componen la bicapa estarían influenciando significativamente la interacción de IFABP con membranas, en adición a los efectos claramente observados producidos por la carga de la cabeza polar de los distintos fosfolípidos.

1.3. Rol de los residuos de lisina superficiales en la transferencia de los ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.

El incremento en la velocidad de transferencia del ácido graso desde IFABP hacia vesículas cargadas negativamente con respecto a vesículas zwitteriónicas (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 1998; Córscico et al., 2004) sugiere que los residuos catiónicos de superficie de IFABP podrían participar en la interacción de la misma con membranas. IFABP presenta 15 residuos de lisina, orientados al solvente, sobre la superficie de la proteína. En base a estas observaciones, se examinó el efecto de la neutralización de los residuos de lisina de IFABP sobre la velocidad de transferencia del ácido graso desde IFABP hacia membranas. Para ello se realizó una acetilación completa y selectiva de los residuos de lisina. El grado de acetilación de cada preparación se evaluó utilizando el fluoróforo fluorescamina, sensor de aminas primarias. Como se puede observar en la **Figura 3**, IFABP mostró un incremento de la fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de proteína agregada, por el contrario IFABP acetilada mantuvo los valores de fluorescencia prácticamente invariables indicando una acetilación masiva de los residuos de lisina.

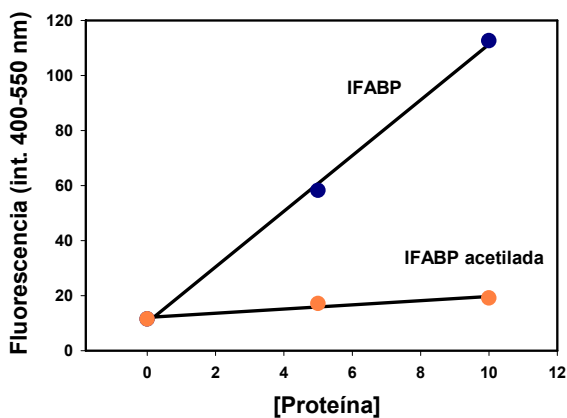


Fig.3: Cuantificación de la acetilación. Se midió la emisión de fluorescencia de concentraciones crecientes de IFABP (puntos azules) e IFABP acetilada (puntos naranjas) en presencia de 300 μ M fluorescamina.

1.4. Controles de la integridad estructural de IFABP acetilada.

Con la finalidad de evaluar las posibles alteraciones generadas en la estructura de IFABP como resultado de la acetilación se realizaron los siguientes controles estructurales y de unión al ligando: cálculo de la constante de afinidad

por el análogo de ácido graso 12AO y medición del espectro de dicroísmo circular de IFABP acetilada en comparación con la proteína nativa.

El cálculo de la constante de afinidad se realizó mediante titulación fluorimétrica, los valores de constantes de afinidad aparentes fueron de $0,16 \pm 0,04 \mu\text{M}$ y $0,15 \pm 0,05 \mu\text{M}$ para IFABP nativa y acetilada, respectivamente.

El espectro de dicroísmo circular de la proteína nativa coincidió en forma e intensidad con datos anteriormente publicados (Córsico et al., 2004; Clérico et al., 2000), la variante acetilada no mostró diferencias con respecto a IFABP nativa (**Fig. 4**). Los valores de elipticidad molar mostraron un mínimo a 215 nm tanto para la proteína nativa como para la acetilada.

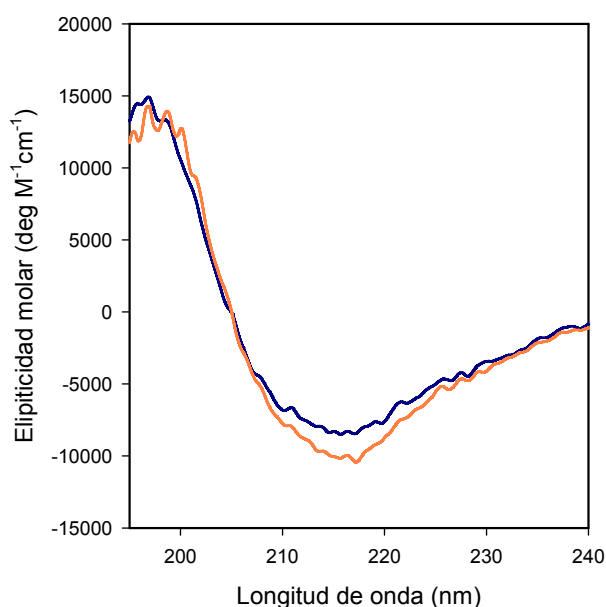


Fig. 4: Espectros de dicroísmo circular de IFABP (línea azul) e IFABP acetilada (línea naranja). Los espectros representan un promedio de 5 mediciones seguidas entre 180 nm y 250 nm, de soluciones 0,15 mg/ml en buffer fosfato 10 mM, pH=7,4.

En la **Tabla II**, se muestran los porcentajes de las distintas estructuras secundarias, hoja β -plegada y α -hélice, calculadas a partir de los espectros de dicroísmo circular con tres algoritmos diferentes: SELCON3, CONTILL, y CDSSTR. Los valores obtenidos para el contenido de hoja β -plegada para IFABP nativa (aproximadamente un 70%) coincidieron con los resultados de estudios de cristalografía de rayos X (Scapin et al., 1992). Las estimaciones de los porcentajes de α -hélice para IFABP nativa mostraron gran variabilidad (22, 23 y 2 % de acuerdo al algoritmo empleado). Estas variaciones pudieron deberse a los grandes errores típicamente observados en el rango de 180-200 nm de los espectros de

CD, probablemente generados por la presencia de CINA en el buffer que contenía la muestra. Cada uno de los tres algoritmos predijo un descenso de aproximadamente un 30% en el porcentaje de α -hélice luego de la acetilación mientras que el porcentaje de hoja β -plegada se mantuvo constante.

Estos resultados confirman que la acetilación de los residuos superficiales de lisina no alteran el correcto plegamiento de IFABP ni su capacidad de unión al ligando.

Tabla II. Porcentajes de estructuras secundarias*

	IFABP			IFABP acetilada		
	Hoja β %	α hélice %	NMRSD ^a	Hoja β %	α hélice %	NMRSD ^a
SELCON3	71,4	22,0	0,43	65,8	17,1	0,65
CONTINLL	84,0	23,0	0,33	66,3	13,0	0,36
CDSSTR	78,0	2,0	0,029	83,5	1,5	0,033

* Calculados a partir de los espectros de dicroísmo circular de IFABP e IFABP acetilada, según los algoritmos SELCON3, CONTINLL y CDSSTR.

^a Raíz cuadrada de la desviación estándar de la media.

1.5. Efecto de la concentración de vesículas zwitteriónicas en la transferencia de AOFA desde IFABP acetilada.

Una de las características principales del mecanismo de transferencia de tipo colisional es el incremento proporcional de la velocidad de transferencia del ligando desde la proteína en respuesta a un aumento en la concentración de vesículas aceptoras. Con el objetivo de determinar si los residuos catiónicos de superficie se hallan involucrados en el mecanismo de transferencia, se neutralizaron las lisinas superficiales mediante acetilación y se midió la velocidad de transferencia del 12AS desde la proteína nativa y acetilada en función de la concentración de membranas artificiales zwitteriónicas. Se analizó la transferencia de 1,5 μ M 12AS desde 15 μ M IFABP nativa o acetilada hacia 150 μ M EPC/NBD-PC SUV. La acetilación de IFABP indujo un incremento de 5 veces en la velocidad de transferencia del análogo de ácido graso 12AS desde la proteína hacia

vesículas zwitteriónicas. Las velocidades de transferencia observadas fueron de $0,057 \pm 0,001$ para IFABP y $0,265 \pm 0,046$ para la proteína acetilada. La **Figura 5** muestra los resultados obtenidos cuando una concentración constante del complejo dador FABP-12AS fue enfrentado con concentraciones crecientes de EPC-SUV. En concordancia con resultados previos (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 1998; Córscico et al., 2004), el aumento de la concentración de las vesículas aceptoras en un rango de hasta 4 veces la concentración inicial, provocó un incremento casi proporcional de la velocidad de transferencia para la proteína nativa en función de las SUV (**Fig. 5**). El resultado obtenido para la proteína acetilada fue completamente equivalente a lo observado para IFABP nativa, indicando que, a pesar de la modificación en los valores absolutos de velocidad de transferencia (dichas diferencias fueron mantenidas en todo el rango de concentraciones de SUV medidas, ver inserto), el mecanismo de transferencia del ácido graso desde la proteína acetilada hacia vesículas zwitteriónicas no presenta cambios con respecto a la proteína nativa.

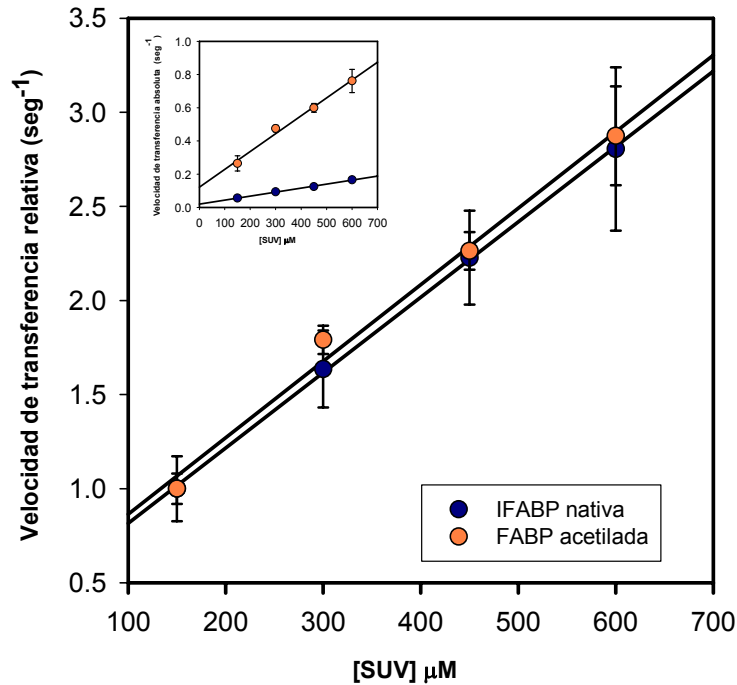


Fig. 5: Efecto de la concentración vesículas sobre la velocidad de transferencia de 12AS desde IFABP e IFABP acetilada. Se midió la transferencia de 1,5 μM 12AS desde 15 μM IFABP nativa (círculos azules) o 15 μM IFABP acetilada (círculos naranja) hacia 150 μM EPC:NBD-PC SUV. Los resultados fueron expresados en forma relativa a la velocidad de transferencia del punto inicial (150 μM EPC:NBD-PC SUV) para cada proteína. Los valores absolutos de velocidad de transferencia se muestran en el recuadro superior izquierdo. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

1.6. Efecto de la carga superficial de las vesículas en la transferencia de AOFA desde IFABP acetilada hacia membranas.

Como se mencionó anteriormente, cambios en la densidad de carga superficial de las vesículas aceptoras puede tener influencia sobre la velocidad de transferencia del ligando. La **Figura 6** muestra que la transferencia del 12AS desde IFABP nativa se incrementó de manera significativa con la incorporación de PS o CL en las EPC:NBD-PC SUV, comportamiento que es el esperado para un mecanismo colisional. En contraste, la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP acetilada no mostró variaciones en la velocidad de transferencia en

presencia de membranas cargadas negativamente, sugiriendo una modificación en el mecanismo de transferencia con respecto a la proteína nativa.

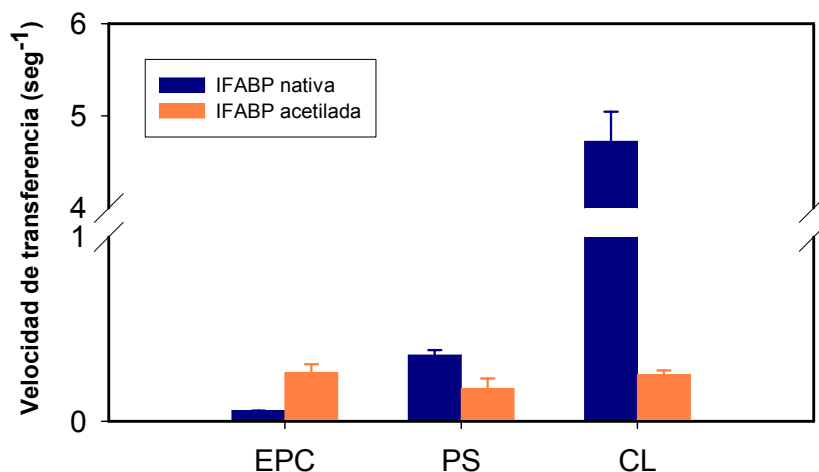


Fig. 6: Efecto de la carga en la transferencia del 12AS desde IFABP e IFABP acetilada hacia vesículas de EPC, PS y CL. Se midió la transferencia de 1,5 μM 12AS desde 15 μM IFABP (barras azules) o 15 μM IFABP acetilada (barras naranja) hacia 150 μM EPC:NBD-PC SUV conteniendo 25% de PS o CL. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

Con el objetivo de investigar con más detalle el efecto de las cargas negativas de las vesículas aceptoras en el mecanismo de transferencia de IFABP acetilada, se analizó la modificación de la velocidad de transferencia con concentraciones crecientes de membranas aceptoras acídicas (**Fig. 7**). IFABP acetilada no mostró un incremento proporcional al aumento de la concentración de vesículas conteniendo un 25% PS o un 25% CL. Contrariamente, IFABP mostró el clásico comportamiento “colisional” incrementando su velocidad de manera proporcional a la concentración de vesículas aceptoras, independientemente de la carga neta de las mismas.

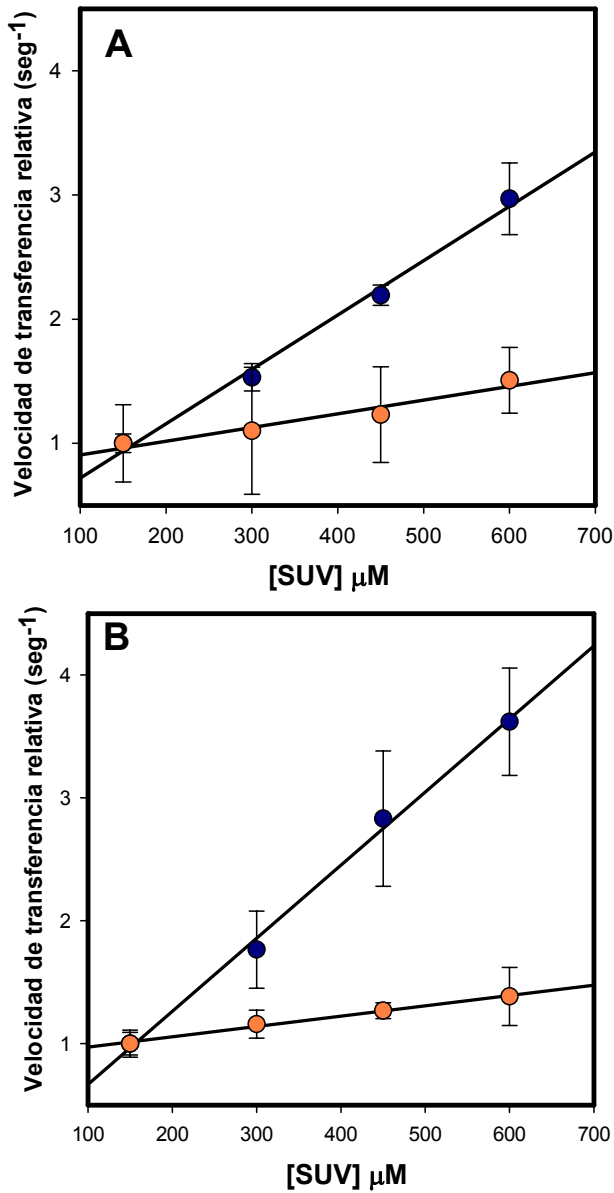


Fig. 7: Transferencia de 12AS desde IFABP e IFABP acetilada hacia concentraciones crecientes de vesículas cargadas negativamente. Se midió la velocidad de transferencia de 1,5 μM 12AS hacia vesículas de PS (A) y vesículas de CL (B) desde 15 μM IFABP nativa (círculos azules) o IFABP acetilada (círculos naranja). Los resultados fueron expresados en forma relativa a la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP nativa o acetilada al valor de transferencia del punto inicial (150 μM SUV). Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

Es interesante notar que la falta de sensibilidad a la concentración de vesículasceptoras observada para IFABP acetilada incrementó con la carga neta superficial de las distintas vesículas, lo que podría deberse a un efecto repulsivo entre la proteína acetilada y las cargas negativas de las membranas.

1.7. Efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP acetilada hacia membranas.

La velocidad de transferencia de un ligando hidrofóbico desde una proteína hacia una membrana aceptora, a través de un medio acuoso, estará modulada por factores que alteren la solubilidad en agua del mismo (Hsu et al., 1996). De esta manera para una proteína de tipo “colisional” como IFABP, se espera que la velocidad de transferencia sea independiente de la fuerza iónica del medio. Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de fosfolípidos aniónicos en vesículas aceptoras incrementa significativamente la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP, lo que ha sido atribuido a la existencia de interacciones electrostáticas en la formación de complejo proteína-membrana. La acetilación de IFABP disminuyó significativamente las interacciones electrostáticas y por ende la sensibilidad a la carga superficial de las vesículas aceptoras. Con el objetivo de constatar la importancia de los residuos de lisina en la formación de interacciones electrostáticas durante la transferencia se midió la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP e IFABP acetilada hacia membranas artificiales en función de concentraciones crecientes de ClNa en el medio.

Teniendo en cuenta que las modificaciones de la fuerza iónica del medio pueden inducir modificaciones estructurales en las proteínas, se midieron los espectros de dicroísmo circular de IFABP nativa y acetilada a las distintas fuerzas iónicas que se emplearían posteriormente en los experimentos de transferencia. Como se puede observar en la **Figura 8**, los espectros de dicroísmo circular para IFABP nativa y acetilada a las distintas fuerzas iónicas fueron esencialmente equivalentes. En la **Tabla III** se muestran los valores de elipticidad molar a 215 y 222 nm, los mismos coinciden con datos previamente publicados para IFABP (Clérico et al., 2001; Córscico et al., 2004).

Tabla III. Valores de elipticidad molar a 222 y 215 nm, para IFABP e IFABP acetilada a distinta fuerza iónica.

	θ215	θ222
IFABP 100 mM ClNa	-7846,29	-6253,44
IFABP 250 mM ClNa	-7351,48	-6006,22
IFABP 500 mM ClNa	-5435,71	-4352,29
IFABP 1000 mM ClNa	-10063,72	-8087,74
IFABP acetilada 100 mM ClNa	-8096,13	-6215,95
IFABP acetilada 250 mM ClNa	-8916,86	-6941,74
IFABP acetilada 500 mM ClNa	-7600,31	-6120,46
IFABP acetilada 1000 mM ClNa	-9302,99	-7102,08

El análisis de las cinéticas de transferencia a distintas fuerzas iónicas arrojó los resultados que se detallan a continuación. Se detectó un pequeño incremento en la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP nativa hacia SUV neutras con concentraciones crecientes de ClNa (**Fig. 9**). Por otra parte, el incremento de la fuerza iónica causó un descenso estadísticamente no significativo en la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP acetilada hacia vesículas neutras (**Fig. 9A**). Cuando se agregaron cargas negativas a las membranas, se observó una drástica modificación para IFABP a alta fuerza iónica. Como se mostró en las **Figuras 6 y 7**, IFABP nativa exhibió un incremento de 80 veces en la velocidad de transferencia del 12AS hacia vesículas con CL en comparación con EPC SUV a baja fuerza iónica. A medida que se fue incrementando la fuerza iónica, se observó un marcado descenso de los altos valores medidos a baja fuerza iónica (**Fig. 9B**). Esto sugiere un apantallamiento de las interacciones electrostáticas, las cuales juegan un rol muy importante a baja fuerza iónica, producido por el alto contenido de sal del medio. Por otra parte, la velocidad de transferencia del ácido graso desde IFABP acetilada se mantuvo casi constante a las distintas fuerzas iónicas medidas (**Fig. 9B**).

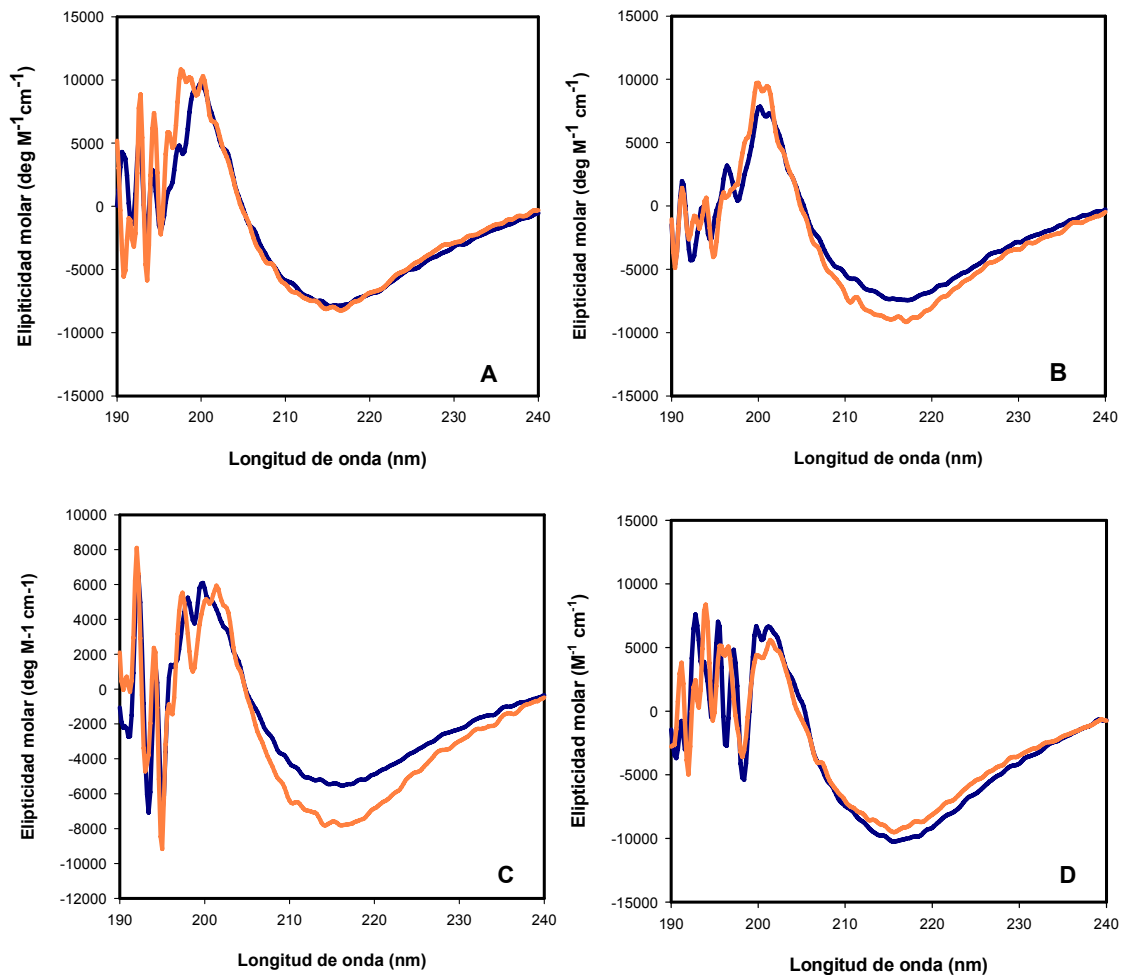


Fig. 8: Espectros de dicroísmo circular de IFABP (línea azul) e IFABP acetilada (línea naranja) a fuerza iónica creciente. (A) 100 mM ClNa, (B) 250 mM ClNa, (C) 500 mM ClNa, y (D) 1000 mM ClNa. Los espectros representan un promedio de 5 mediciones entre 180nm y 240 nm, de soluciones 0,15 mg/ml en buffer fosfato 10 mM a las distintas fuerzas iónicas indicadas, pH=7,4.

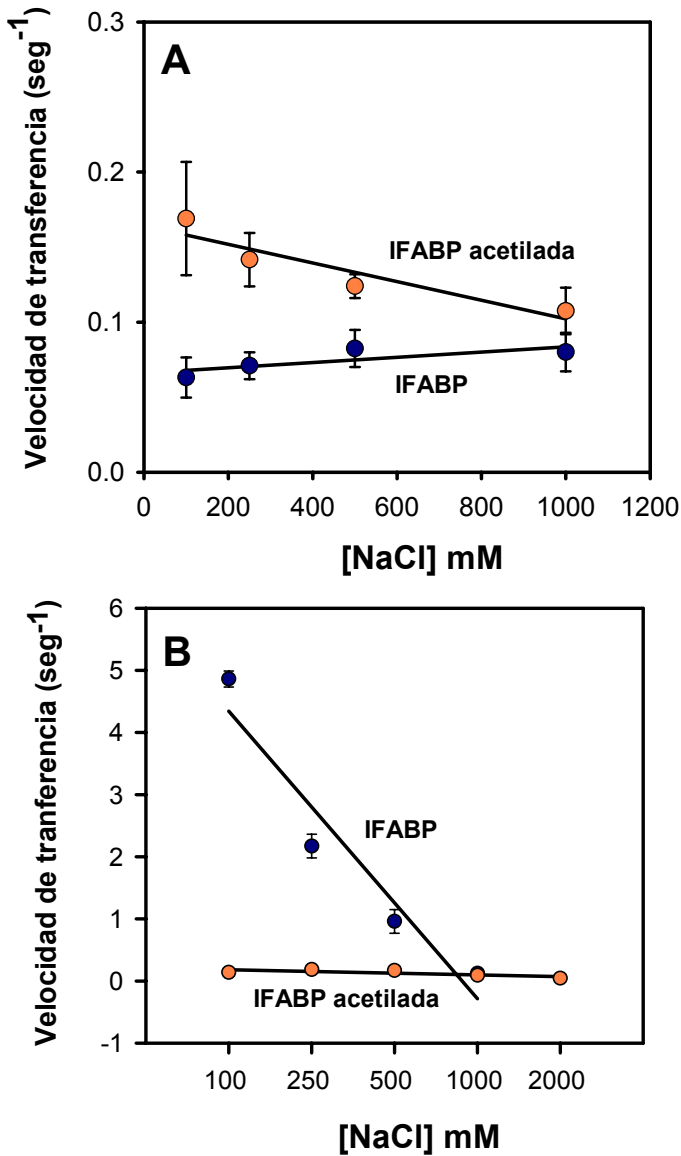


Fig. 9: Efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia del 12AS desde IFABP nativa y acetilada. Se midió la transferencia de 1,5 μM 12AS desde 15 μM IFABP (círculos azules) o IFABP acetilada (círculos naranja) hacia 150 μM EPC:NBD-PC SUV (A) o 150 μM EPC:NBD-PC SUV conteniendo un 25% CL (B). Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

2. Rol de la región $\alpha 1$ en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde FABP hacia membranas artificiales.

I- y LFABP, se expresan en gran cantidad en células de epitelio intestinal. La permanencia en un mismo tipo celular de dos miembros de la misma familia a través de la evolución sugiere funcionalidades diferentes. Utilizando el ensayo *in*

vitro de transferencia de energía de resonancia, antes mencionado, se ha evidenciado que I- y LFABP emplean mecanismos diferentes de transferencia del ligando hacia membranas. IFABP presenta un mecanismo de tipo colisional, mientras que LFABP entregaría el ligando a través de un mecanismo difusional.

Estudios realizados con una variante de IFABP carente de la región α -helicoidal han demostrado la importancia de dicha región en la determinación del mecanismo de transferencia (Corsico et al, 1998), sugiriendo un rol fundamental del dominio helicoidal en la formación del complejo proteína-membrana durante el proceso de transferencia del ligando. En un estudio posterior se evaluó el rol de la región α -helicoidal de I- y LFABP respectivamente, mediante la construcción de proteínas quiméricas I-/LFABP, por intercambio de la región α -helicoidal completa (Corsico et al., 2004). Dicho trabajo demostró la capacidad de la región α -helicoidal de LFABP de impartir un mecanismo de tipo difusional al cuerpo de IFABP, mientras que la región homóloga (perteneciente a IFABP) es capaz de conferir un mecanismo de tipo colisional de transferencia al cuerpo de LFABP. Por otra parte, la cristalografía de rayos X de IFABP ha demostrado que el segmento α 1 es antipático. Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados y con el propósito de profundizar los conocimientos sobre la/s regiones responsables de las diferencias funcionales entre I- y LFABP, se construyeron un par de proteínas quiméricas por intercambio de la región α 1 entre I- y LFABP.

2.1. Construcción de proteínas quiméricas

Se introdujo un mismo sitio de restricción en los cDNAs de I- y LFABP en la región que separa α 1 de α 11. En la **Figura 10** se pueden apreciar los resultados de los dos primeros ciclos de PCR para LFABP generando dos fragmentos solapables de distinto tamaño, uno de 135 pb y otro de 500 pb. Los resultados para IFABP fueron semejantes.

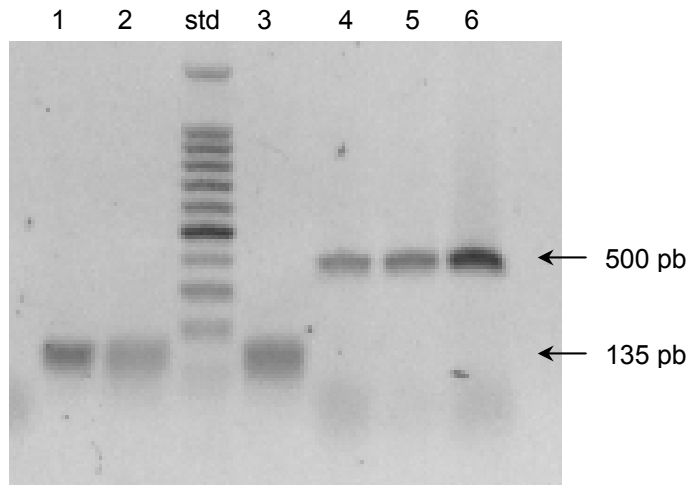


Fig. 10: Primer y segundo ciclo de PCR para LFABP. Gel de agarosa 1% mostrando los resultados de los dos primeros ciclos de PCR. Las líneas 1,2 y 3 muestran el fragmento de 135 pb producto de la amplificación del segmento de cDNA situado desde el extremo 5' hasta el sitio de la mutación. Las líneas 4,5 y 6 muestran un fragmento de 500 pb producto de la amplificación del segmento de cDNA desde el sitio de la mutación hasta el extremo 3'.

Los fragmentos correspondientes a los ciclos 1 y 2 de PCR fueron purificados y combinados para realizar el tercer ciclo. Como producto de dicha combinación, se observó el fragmento correspondiente al cDNA mutante de LFABP de 500 pb (**Fig. 11, calles 1-6**) y el fragmento correspondiente al cDNA mutante de IFABP de 650 pb (**Fig. 11, calles 7-11**), ambos portando el sitio de corte para Age I.

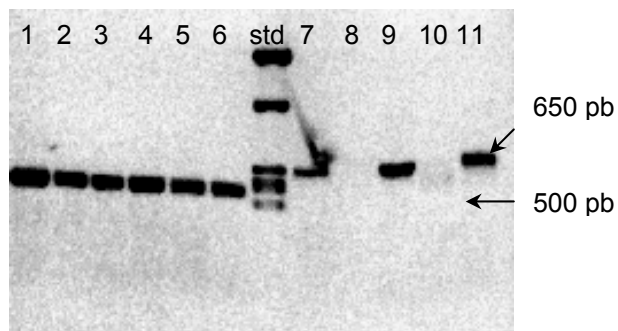


Fig. 11: Tercer PCR. Gel de agarosa 1% mostrando el resultado de la tercer PCR. Las líneas 1-6 corresponden al cDNA mutante de LFABP (500 pb) y las líneas 7-11 al cDNA mutante de IFABP (650 pb), ambos portando el sitio de restricción para AgeI.

En la **Figura 12** se pueden observar los productos generados por la digestión con las enzimas Age I y BamHI de ambos cDNA mutantes subclonados en el vector de clonación pGEM-T. Los distintos fragmentos obtenidos (insertos y vectores) fueron aislados y recombinados para obtener los respectivos cDNA quiméricos, $\alpha(I)\beta$ LFABP y $\alpha(I)\beta$ IFABP.

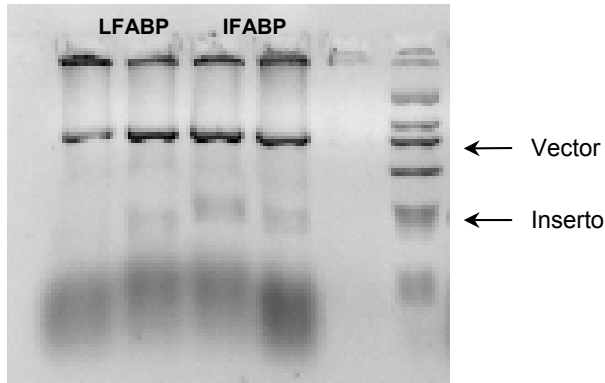


Fig. 12: Digestión con las enzimas *Age*I y *Bam*H I, de los cDNA mutantes subclonados en el vector pGEM-T.

Posteriormente a su análisis por secuenciación, las construcciones quiméricas recombinantes fueron sobreexpresadas en *E. coli* BL21 (DE3). Como se puede ver en la **Figura 13**, todas las colonias seleccionadas, en ambos casos, expresaron las proteínas quiméricas.

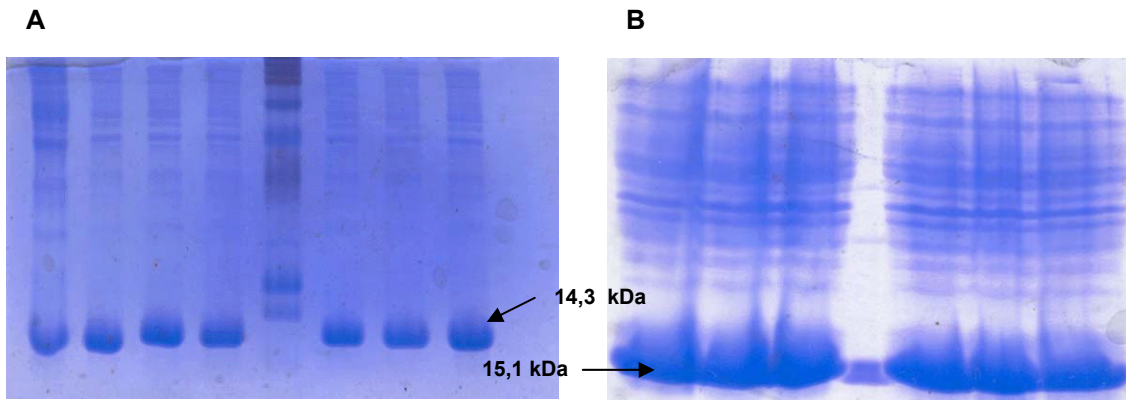


Fig. 13: Sobreexpresión de los cDNA quiméricos en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). (A) pET11-d- α I β LFABP, (B) pET11-d- α I β IFABP.

2.2. Controles de la integridad estructural de las proteínas quiméricas.

La familia de las FABP está caracterizada por una estructura terciaria muy conservada, sin embargo la homología de secuencia entre los distintos miembros es baja. I y LFABP, poseen una homología de secuencia de aproximadamente un 29% (Veerkamp et al., 1991). La construcción de un par de proteínas quiméricas entre I- y LFABP implicó el intercambio de una secuencia de 22 aminoácidos, pudiendo generar cambios muy drásticos en las respectivas estructuras terciarias, por tal motivo se realizaron una serie de controles estructurales que permitieron

evaluar la integridad estructural de las construcciones quiméricas con respecto a sus proteínas parentales.

En primera instancia se calcularon los coeficientes de extinción molar como se describió en la sección Materiales y Métodos. Los valores de coeficiente de extinción molar obtenidos fueron $9721 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $9285 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para $\alpha(\text{I})\text{L}\beta\text{IFABP}$ y $\alpha(\text{I})\beta\text{LFABP}$, respectivamente. Estos valores obtenidos experimentalmente presentaron diferencias de un 13 y un 5% en relación a sus valores teóricos respectivamente. Una diferencia de hasta un 15% es considerada aceptable según Gill et al. (1989).

Para controlar las posibles alteraciones en el plegamiento se midieron los siguientes parámetros de las distintas construcciones en comparación con las proteínas nativas: a) espectros de dicroísmo circular, b) rendimiento cuántico del 12AO unido a la cavidad hidrofóbica, c) constante de afinidad utilizando la sonda fluorescente ADIFAB y d) coeficiente de partición relativo del 12AO entre cada una de las FABP y SUV. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Parámetros físicos y de unión al ligando de proteínas nativas y quiméricas.

	Kp (suv:prot)	Kd (nM)	Q _f	θ_{215} (grad $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	θ_{222} (grad $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
IFABP	$6,74 \pm 2,25$	43	$0,08 \pm 0,04$	-7212,33	-5616,12
LFABP	$0,09 \pm 0,06$	Kd1=4 Kd2=96	$0,31 \pm 0,09$	-8528,85	-9084,17
$\alpha(\text{I})\text{L}\beta\text{IFABP}$	$2,08 \pm 0,14$	652 ± 209	$0,12 \pm 0,05$	-4776,02	-3738,76
$\alpha(\text{I})\beta\text{LFABP}$	$0,64 \pm 0,13$	ND	$0,11 \pm 0,03$	-8661,78	-7003,34

La constante de partición describe la distribución relativa del 12AO entre proteína y membrana. LFABP mostró una mayor afinidad relativa por el 12AO en comparación con IFABP, esto estaría de acuerdo con valores obtenidos previamente (Thumser et al., 2000). Por otra parte las proteínas quiméricas mostraron valores intermedios con respecto a los obtenidos para las proteínas nativas. Específicamente $\alpha(\text{I})\beta\text{LFABP}$ mostró una afinidad relativa por el 12AO mayor que $\alpha(\text{I})\text{L}\beta\text{IFABP}$, manteniendo la relación observada para las proteínas nativas. Estos resultados indican que la afinidad relativa del ligando no se ha visto mayoritariamente afectada en las proteínas quiméricas con respecto a las

respectivas proteínas nativas. En base a estas observaciones se decidió emplear las mismas condiciones experimentales para los ensayos de transferencia, tanto para IFABP y $\alpha(1)L\beta$ IFABP como para LFABP y $\alpha(1)\beta$ LFABP.

La constante de afinidad por el ácido oléico fue calculada utilizando el método de ADIFAB. IFABP mostró un solo sitio de unión para el ácido graso con un K_d de 43 nM, mientras que LFABP mostró dos sitios de unión con afinidades diferentes, 4 y 96 nM. Estos valores coinciden con datos publicados previamente utilizando el mismo método (Córsico et al., 2004; Richieri et al., 1994). La proteína quimérica $\alpha(1)L\beta$ IFABP mostró una constante de afinidad mucho mayor a la observada para IFABP, no obstante valores de K_d similares para IFABP han sido reportados utilizando otros ligandos naturales, como ácido linoléico (Richieri et al., 1994).

Se realizó la medición del rendimiento cuántico (Q_f) del análogo de ácido graso, 12AO, con el objetivo de evaluar los posibles cambios en el entorno hidrofóbico del mismo en las proteínas quiméricas en comparación con las nativas (Herr et al., 1996, Liou et al., 2001). Los valores obtenidos para las proteínas nativas coincidieron con valores previamente obtenidos (Córsico et al., 2004). Nuevamente las proteínas quiméricas mostraron valores intermedios a los de las proteínas nativas evidenciando modificaciones en la hidrofobicidad de la cavidad determinadas por la introducción de sendas regiones α .

En la **Figura 14** se muestran los espectros de dicroísmo circular, medidos en el UV lejano de ambas proteínas quiméricas en comparación con sus respectivas proteínas nativas; y medidas en el UV cercano para $\alpha(1)L\beta$ IFABP. Con respecto a los espectros en el UV lejano, $\alpha(1)L\beta$ IFABP mostró los mismos picos, tanto positivos como negativos, pero con intensidades menores que IFABP (**Fig. 14 A**). Teniendo en cuenta que $\alpha(1)L\beta$ IFABP posee un residuo de triptofano menos con respecto a IFABP y la fuerte influencia que las bandas de absorción de los residuos aromáticos tienen sobre la intensidad de la señal en el UV-lejano (Clérico et al., 1999; Freskgard et al., 1994), el decremento en la intensidad de la señal podría atribuirse, en parte, a dicha disminución en el número de residuos de triptofano. Si bien la concentración de las proteínas fue determinada utilizando el

coeficiente de extinción molar (ver Materiales y Métodos), posibles diferencias en dicha determinación también pudieron contribuir en menor medida a las diferencias observadas. Por otra parte, $\alpha(I)\beta$ LFABP mostró cambios importantes en la forma del espectro con respecto a LFABP. La intensidad a 200 nm estuvo cercana a cero, una señal moderadamente positiva apareció a los 196 nm y la banda negativa centrada a 216 se observó más ancha y corrida hacia el azul; estos cambios dan evidencia de grandes variaciones en las distintas estructuras secundarias de la proteína quimérica (**Fig. 14 B**).

Con respecto al espectro de dicroísmo circular en el UV cercano no se pudo hacer una comparación directa de IFABP con la proteína quimérica $\alpha(I)\beta$ IFABP, ya que esta última posee un residuo de triptofano menos como resultado del intercambio de segmentos. No obstante, $\alpha(I)\beta$ IFABP mostró dos bandas bien definidas, con signos opuestos, centradas a 260 y 280 nm dando evidencia de una estructura terciaria definida (**Fig. 14 C**).

Finalmente en la **Tabla V** se resumen los resultados obtenidos del análisis de los distintos espectros de dicroísmo circular en el UV lejano con diferentes algoritmos, mostrando los porcentajes de estructuras secundarias.

Tabla V. Porcentajes de estructuras secundarias de proteínas nativas y quiméricas*

	SELCON3			CONTIN			CDSSTR		
	% α	% β	NRMSD ^a	% α	% β	NRMSD	% α	% β	NRMSD
IFABP	18	58	0,22	19	60	0,049	21	61	0,029
LFABP	35	39	0,39	31	51	0,036	40	54	0,027
$\alpha(I)\beta$IFABP	14	74	0,091	11	72	0,036	9	70	0,004
$\alpha(I)\beta$LFABP	30	50	0,159	17	54	0,096	1,12	56	0,035

* Datos calculados a partir de los espectros de dicroísmo circular de IFABP, LFABP, $\alpha(I)\beta$ IFABP y $\alpha(I)\beta$ LFABP según los algoritmos SELCON3, CONTINLL y CDSSTR.

^a Raíz cuadrada de la desviación estándar de la media.

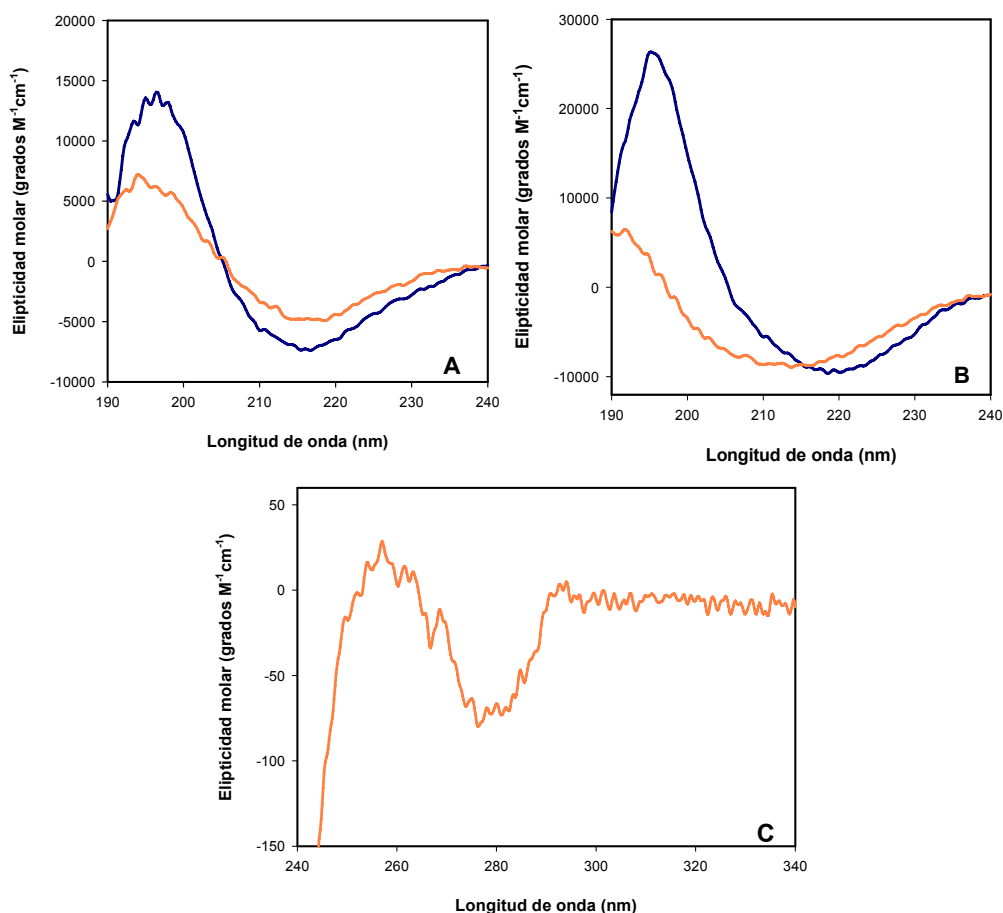


Fig. 14: Espectros de dicroísmo circular de las proteínas nativas (línea azul) y las proteínas quiméricas (línea naranja). (A) IFABP y α(I)LβIFAB, (B) LFABP y α(I)βLFABP, y (C) α(I)LβIFAB. A y B se corresponden con medidas tomadas en el UV lejano, los espectros representan un promedio de 5 mediciones entre 180nm y 240 nm, de soluciones 0,15 mg/ml en buffer fosfato 10 mM, pH=7,4. C son medidas realizadas en el UV cercano, el espectro representa un promedio de 5 mediciones entre 240 nm y 340 nm.

Los tres algoritmos calcularon alrededor de un 60% de hoja β plegada para IFABP y un 45 % para LFABP, estos datos coinciden con resultados previamente publicados (Scapin et al., 1992, Cistola et al., 1988). Los resultados de las proteínas quiméricas arrojaron un promedio de 72 y 54 % de hoja β plegada para α(I)LβIFABP y α(I)βLFABP, respectivamente. Con respecto a los valores obtenidos sobre el porcentaje de α-hélice están sujetos a una mayor variación

considerando que las zonas del espectro sobre las cuales se realizan los cálculos, ya que son las que presentan mayor error de medición. Aún así, las proteínas nativas presentaron valores que coinciden con la literatura y las proteínas quiméricas arrojan valores aproximados a sus respectivas proteínas parentales.

En conjunto, estos controles sugieren que no hubo cambios drásticos en la conformación y propiedades de unión al ácido graso de $\alpha(1)\text{L}\beta\text{IFABP}$ en comparación con sus proteínas parentales. Dicha proteína quimérica presenta un plegamiento correcto y une una sola molécula de ácido graso en una cavidad relativamente hidrofóbica. Los estudios de K_p y Q_f también indicaron que la integridad de la cavidad hidrofóbica de la otra proteína quimérica, $\alpha(1)\beta\text{LFABP}$ se ha mantenido en cierta medida con respecto a sus proteínas parentales, razón por la cual fue utilizada para los ensayos de transferencia. Estos resultados pueden deberse a una deficiencia en el plegamiento de dicha proteína quimérica lo cual determina que en las distintas preparaciones se presente como un equilibrio entre formas correctamente plegadas y formas deficientes. En todo momento se contemplan las dificultades de plegamiento y su posible efecto sobre la cinética de transferencia.

2.3. Efecto de la concentración de vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde las proteínas quiméricas.

El efecto de la concentración de las vesículasceptoras sobre la velocidad de transferencia puede ser utilizado para distinguir entre un comportamiento de tipo “difusional” y uno de tipo “colisional”, donde la velocidad de transferencia del ligando está directamente relacionada a la colisión de la proteína con las vesículas. En la **Figura 15** se muestran los resultados obtenidos cuando una concentración constante de complejo dador FABP-AOFA fue enfrentado con concentraciones crecientes de EPC-SUV. IFABP mostró el típico incremento de la velocidad de transferencia proporcional a la concentración de vesículasceptoras (**Fig. 15 A**). La proteína quimérica $\alpha(1)\text{L}\beta\text{IFABP}$, por otra parte, mostró velocidades de transferencia menores que IFABP. Si bien el incremento de la velocidad de

transferencia en función de la concentración de las vesículas aceptoras se vio claramente atenuado con respecto a IFABP, se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos a distintas concentraciones para ambas proteínas, $p < 0.01$ ANOVA.

Por otra parte, $\alpha(1)\beta$ LFABP no mostró cambios significativos en la velocidad de transferencia en respuesta a la concentración de vesículas (**Fig. 15 B**), comportamiento semejante al de LFABP. Las velocidades de transferencia se vieron modificadas con respecto a las de LFABP, observándose un incremento en aproximadamente 3 veces.

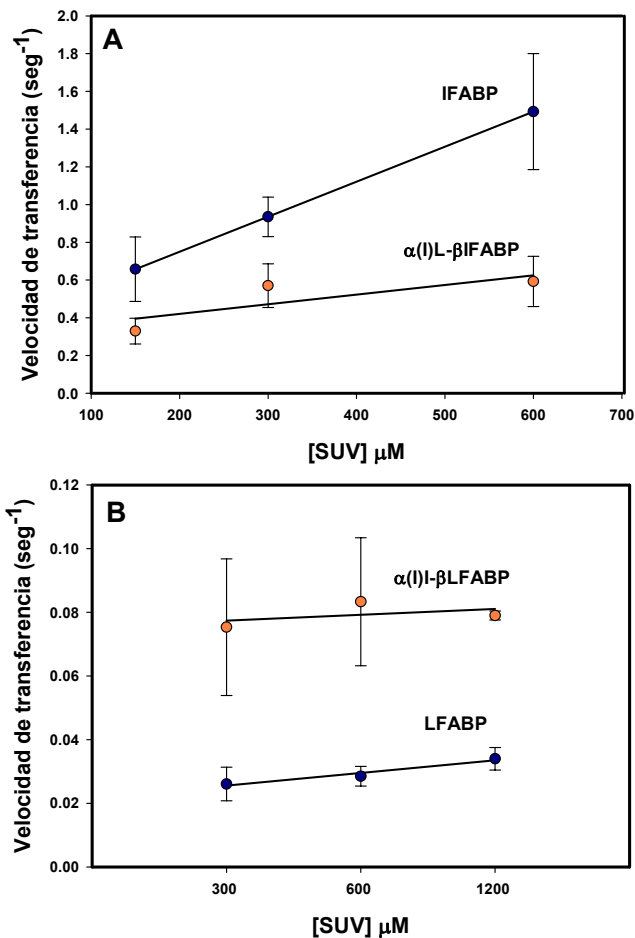


Fig. 15: Efecto de la concentración de vesículas sobre la velocidad de transferencia de 12AO desde las proteínas nativas (círculos azules) y las proteínas quiméricas (círculos naranjas). A. Se midió la transferencia de 1,5 μ M 12AO desde 15 μ M IFABP nativa o 15 μ M $\alpha(1)\beta$ IFABP hacia concentraciones crecientes de EPC/NBD-PC SUV; o B. 0,5 μ M 12AO desde 5 μ M LFABP nativa o 5 μ M $\alpha(1)\beta$ LFABP hacia concentraciones crecientes de EPC/NBD-PC SUV. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

2.4. Efecto de la carga de las vesículas sobre la velocidad de transferencia de AOFA desde las proteínas quiméricas.

La **Figura 16 A** muestra como la velocidad de transferencia del 12AO desde IFABP se incrementa significativamente con la incorporación de 25 mol% de PS o CL en EPC/NBD-PC SUV, como se ha indicado anteriormente (ver Resultados, sección A6). La proteína quimérica $\alpha(1)\beta$ IFABP exhibe un comportamiento diferente, no observándose cambios en su velocidad de transferencia de AOFA al incorporar 25% de PS en las SUV, no obstante el punto

con CL es significativamente mayor que los valores obtenidos con EPC y PS. $p < 0,05$, t-test.

En la **Figura 16 B** se aprecia como la proteína nativa LFABP se mantiene invariable en su velocidad de transferencia en respuesta a la densidad de carga, de acuerdo a un mecanismo de transferencia de tipo difusional. La quimera $\alpha(1)\beta$ LFABP no mostró diferencias en su velocidad de transferencia cuando 25 mol% de PS fue agregado a la composición de las vesículas aceptoras.

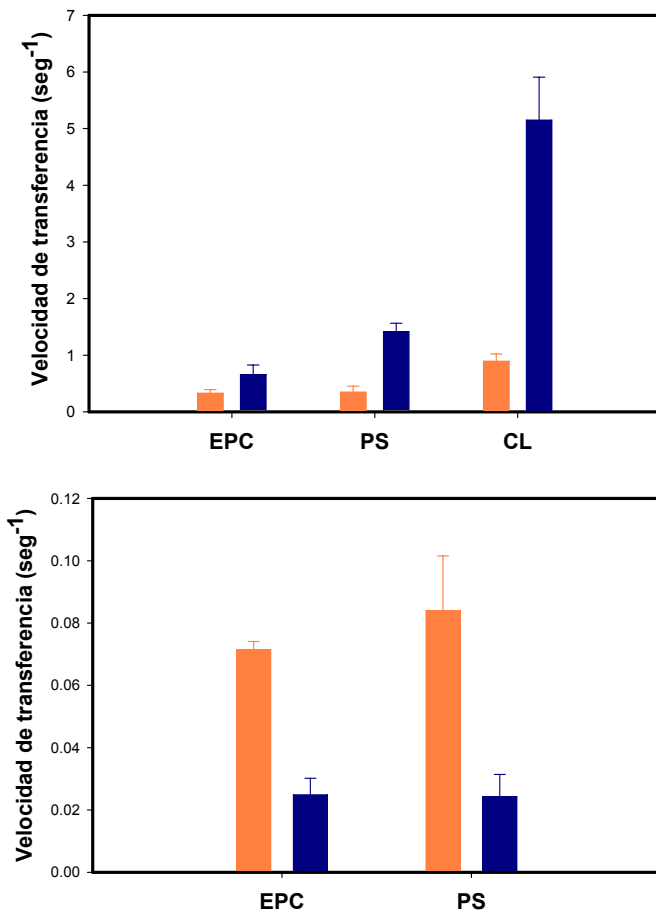


Fig. 16: Efecto de la carga en la transferencia del 12AS desde proteínas nativas (barras azules) y quiméricas (barras naranjas). A) Se midió la transferencia de 1,5 μ M 12AO desde 15 μ M IFABP o 15 μ M $\alpha(1)\beta$ IFABP hacia 150 μ M EPC/NBD-PC SUV conteniendo 25% de PS o CL; B) transferencia de 0,5 μ M 12AO desde 5 μ M LFABP o 5 μ M $\alpha(1)\beta$ LFABP hacia 150 μ M EPC/NBD-PC SUV conteniendo 25% de PS. Los valores representan la media \pm SD de triplicados.

Es interesante notar la importancia de la región $\alpha 1$ en la modulación de la velocidad absoluta de transferencia. Eso se puede observar en ambos experimentos, aún cuando no es capaz de inducir el cambio en el mecanismo de transferencia.

3. Análisis de la interacción de FABP con membranas artificiales mediante el uso de un reactivo fotoactivable.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio como ensayos de competencia con citocromo c (Córsico et al., 1998) han aportado evidencia indirecta de la existencia de interacción física entre FABP y membranas. Con la finalidad de determinar en forma directa la interacción de FABP con membranas se ha utilizado una técnica de “fotocrosslinking” empleando el reactivo fotoactivable con un grupo reactivo trifluorometil diazirina.

En esta serie de experimentos se ensayaron ambas proteínas nativas, la variante obtenida por modificación química (IFABP acetilada), las proteínas quiméricas, así como una variante de IFABP carente de la región α -helicoidal (Kim et al., 1996).

3.1. Detección de el/los dominios y residuos específicos involucrados en la interacción con membranas.

En primera instancia se realizaron experimentos de interacción con LUV utilizando la variante carente de la región α -helicoidal (HL-IFABP) con el objetivo de evaluar la importancia de dicho dominio en la interacción física con membranas. Trabajos previos empleando otros métodos, realizados en nuestro laboratorio, demostraron la importancia de dicha región en la determinación del mecanismo de transferencia “colisional” desde IFABP hacia vesículas aceptoras y en la interacción de la misma con membranas (Córsico et al, 1998; Wu et al., 2001).

Como se puede observar en la **Figura 17**, se probaron membranas de distinta composición, y en ningún caso HL-IFABP muestra interacción alguna con membranas. Por otra parte, IFABP es capaz de interaccionar con membranas y presenta un incremento en la incorporación de marca con el aumento en la carga negativa superficial de las vesículas.

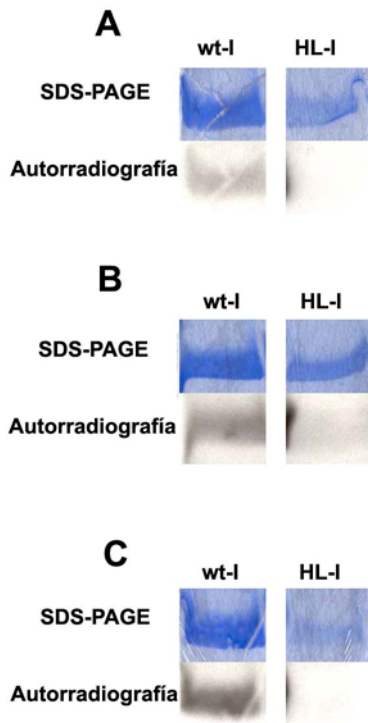


Fig. 17: Fotomarcación de IFABP y HL-IFABP en su forma apo con vesículas de EPC, PS y CL conteniendo ^{125}I -TID-PC en su composición. A) EPC, B) PS y C) CL.

Con el objetivo de profundizar el análisis sobre los dominios involucrados en la interacción de IFABP con membranas se realizaron experimentos de fotoactivación de IFABP nativa seguidos de a proteólisis. Para ello se utilizó el agente BNPS-Skatole, con sitio de corte en el extremo carboxilo terminal de los residuos de triptofano. IFABP posee dos residuos de triptofano uno en posición 6 y el otro en posición 82. De esta manera el corte generó dos fragmentos observables en geles de Tricina/SDS-PAGE, uno de 9,6 kDa, correspondiente a la región alfa helicoidal y gran parte del barril beta; y un fragmento de 5,5 kDa compuesto por el resto del barril. El fragmento de 9,6 kDa muestra una mayor incorporación de marca con respecto al fragmento menor (**Fig. 18**). Utilizando el software ImageJ, provisto por el NIH, se realizó la cuantificación de las bandas

observadas en geles de tricina y autorradiografía. Los resultados de la cuantificación se muestran en la **Figura 18**. Como se puede observar, los porcentajes de ambas bandas producto de la proteólisis son similares indicando que la masa proteica es aproximadamente la misma. Cuando se observan los porcentajes de las bandas correspondientes en la autorradiografía, el fragmento de 9,6 kDa presenta una intensidad 2,6 veces superior a la banda correspondiente a 5,5 kDa.

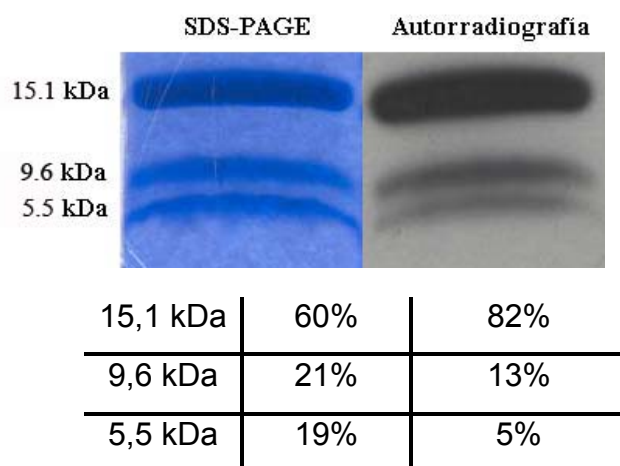


Fig. 18: Proteólisis con BNPS-Skatolato de IFABP luego de su fotomarcación en presencia de vesículas de CL conteniendo ^{125}I -TID-PC en su composición. Se pueden observar, tanto en el gel como en la autorradiografía: la proteína entera 15,1 kDa y ambos fragmentos de 9,6 y 5,5 kDa, producto de la proteólisis. En la tabla ubicada por debajo de la fotografía se muestran los porcentajes de intensidad obtenidos como resultado de la cuantificación efectuada utilizando el programa ImageJ.

Con el objetivo de evaluar el rol de la región αI en la interacción con membranas se realizaron experimentos incubando las proteínas nativas, quiméricas y HL-IFABP con membranas de EPC, PS y CL. La proteína quimérica αI) β IFABP mostró una menor interacción relativa que IFABP en presencia de vesículas de EPC y CL. En el caso de las vesículas de PS, la proteína quimérica parece mostrar una interacción equivalente a la de IFABP. La quimera αI) β LFABP, por otra parte, mostró una interacción menor que LFABP para las tres condiciones. La variante carente de la región alfa-helicoidal (HL-IFABP), no mostró interacción alguna con ningún tipo de membranas (**Fig. 19**) tal como se observara en experimentos anteriores (**Fig. 17**). Cabe resaltar la creciente incorporación de

marca por parte de IFABP concomitantemente con el aumento de la carga superficial de las vesículas. Por otra parte, LFABP mostró un alto nivel de interacción pero se mantuvo invariable frente al incremento de la carga de las vesículas.

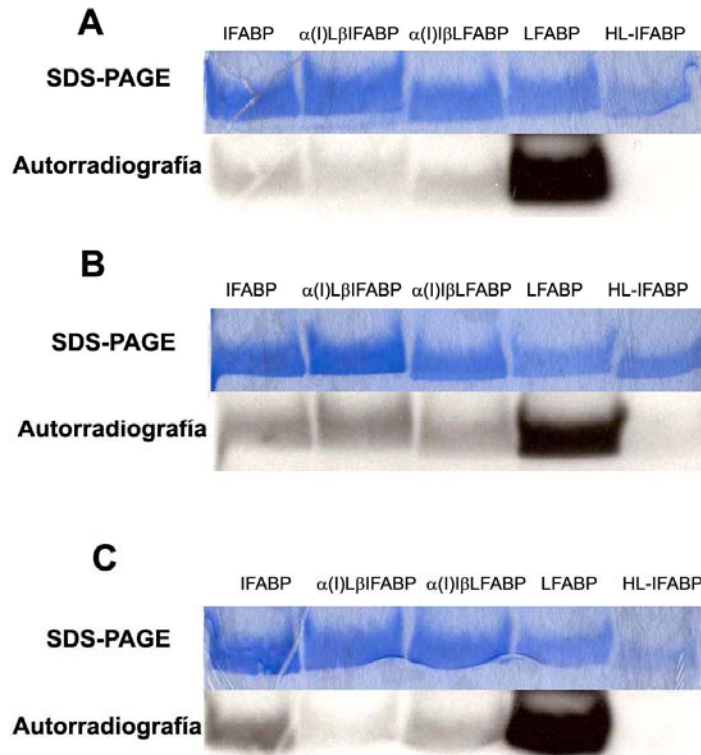
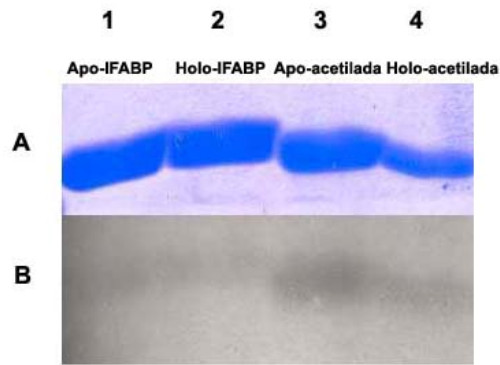


Fig. 19: Fotomarcación de las proteínas nativas I-/LFABP, proteínas quiméricas y la variante HL-IFABP frente a vesículas de EPC, PS y CL. Proteínas nativas y modificadas incubadas con vesículas de EPC (A), de PS (B) y de CL (C). Todas las proteínas se encuentran en su forma apo.

Para evaluar el rol de los residuos de lisina en la interacción de IFABP con membranas se realizaron experimentos de fotoactivación empleando la variante de IFABP acetilada. En la **Figura 20** se observa el resultado de la incubación de IFABP e IFABP acetilada con vesículas de EPC conteniendo 125 I-TID-PC en su composición. Se aprecia una mayor interacción relativa por parte de IFABP

acetilada con respecto a IFABP. Estos resultados corresponden a un solo experimento.



Apo-IFABP	Holo-IFABP	Apo-acetilada	Holo-acetilada
1	1,14	4,44	3,7

Fig. 20: Fotomarcación de las formas apo- y holo- de I- e IFABP acetilada con vesículas de EPC conteniendo ^{125}I -TID-PC en su composición. 1. apo IFABP, 2. holo IFABP, 3. apo IFABP acetilada y 4. holo IFABP acetilada. A) SDS-PAGE; B) autorradiografía. En la tabla ubicada por debajo de la fotografía se muestran los valores relativos a apo IFABP del cociente entre la intensidad de las bandas en la autorradiografía y en el gel, obtenidas como resultado de la cuantificación efectuada utilizando el programa ImageJ. Los datos están normalizados al valor obtenido para Apo-IFABP.



1. Rol de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas artificiales.

Desde su descubrimiento, se ha propuesto la importancia de las FABP en el transporte intracelular de ácidos grasos. Utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia *in vitro*, se ha sugerido que el transporte de los ácidos grasos desde y hacia IFABP ocurre mediante un mecanismo colisional entre IFABP y las vesículas aceptoras (Hsu et al., 1996; Thumser et al., 2000). Más aún, mediante el uso de técnicas bioquímicas y espectroscópicas se demostró la existencia de interacciones directas de IFABP con membranas (Córsico et al., 1998; Wu et al., 2001), fortaleciendo dicha hipótesis. La existencia de interacciones entre IFABP y membranas permite elaborar ciertas hipótesis acerca de la función de dicha proteína en el interior celular. De esta manera, IFABP podría estar involucrada en la extracción de los ácidos grasos de sitios como membrana plasmática y la entrega de los mismos en sitios aceptores específicos, como mitocondria y/o retículo endoplásmico, para su ulterior metabolización. En estudios previos se observó que la velocidad de transferencia de los ácidos grasos desde IFABP es altamente sensible a la carga superficial de las vesículas aceptoras, indicando que la transferencia del ligando desde IFABP estaría regulada por interacciones de tipo iónicas entre los residuos catiónicos superficiales de la proteína y las cargas negativas en la membrana.

En este trabajo hemos analizado la influencia de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre IFABP y membranas fosfolípídicas mediante 1) modificación de la densidad de carga y composición de las vesículas aceptoras, y 2) modificación de la densidad de carga superficial de IFABP. Hemos focalizado nuestra atención en el fosfolípido CL, debido a la drástica estimulación de las velocidades de transferencia de los ácidos grasos desde IFABP (Hsu et al., 1996; Córsico et al., 1998; Córsico et al., 2004) así como también por su bien conocida

tendencia a interactuar con proteínas (Schlatter et al., 2004). La cardiolipina es un fosfolípido singular con una estructura dimérica, ya que su composición consta de cuatro cadenas aciladas y dos cargas negativas. En células eucariotas, está localizada exclusivamente en mitocondria, con aproximadamente un cuarto de su totalidad ubicado en la membrana mitocondrial externa, donde sería capaz de interactuar con proteínas citoplasmáticas (Hovius et al., 1990). En nuestros experimentos, hemos encontrado que el incremento de la concentración de CL de las vesículas aceptoras resulta en un incremento logarítmico de la velocidad de transferencia del ligando desde IFABP. Esto puede ser atribuido a la mayor proporción de cargas negativas, y por ende un incremento en las interacciones electrostáticas con los residuos positivos en la superficie de la proteína, resultando en el aumento de la velocidad de transferencia de los ácidos grasos. Sin embargo, está claro que la densidad de carga no es el único factor responsable del efecto de la CL, ya que vesículas con densidad de carga equivalente pero diferente composición (monolisocardiolipina, dilisocardiolipina) no inducen un incremento de la velocidad de transferencia como el de las vesículas con CL. Más aún, la diferencia en la velocidad de transferencia entre 12AO y 12AS indica que cambios en la estructura del ligando, las cuales no tienen relación con la carga de las membranas o de la proteína, también afecta la velocidad de transferencia aparente. Es importante notar que para un mecanismo de tipo colisional de transferencia del ligando, no esperaríamos ese tipo de efecto causado por las propiedades de la cadena acilada del ligando. Proponemos que este comportamiento ligando-dependiente indicaría algún grado de interacción de los ácidos grasos con el entorno acuoso, probablemente en la superficie de la proteína durante la formación del complejo proteína-membrana. El análogo de ácido graso 12AS por ser menos soluble, muestra velocidades de transferencia más lentas, sin embargo es transferido de manera colisional. Notablemente, encontramos que la diferencia en la velocidad de transferencia de 12AO versus 12AS hacia vesículas zwitterionicas desaparece cuando cantidades crecientes de CL son incorporadas en las vesículas aceptoras, indicando que a medida que la

formación de uniones electrostáticas se fortalece, el efecto de la estructura del ligando se torna menos pronunciada.

El fosfolípido CL, presenta un notorio polimorfismo de fase, pudiendo atravesar por una fase micelar, una lamelar o una fase hexagonal invertida, dependiendo de las condiciones del entorno (Schlame et al., 2000). La fase hexagonal está favorecida por la presencia de cationes divalentes, bajo pH, alta fuerza iónica y un volumen hidrofóbico grande determinado por la naturaleza de las cadenas aciladas (ver review Schlame et al., 2000). En los experimentos realizados en este trabajo no se esperan cambios de fase considerando las condiciones de pH, fuerza iónica, y la ausencia de cationes divalentes (Powell et al., 1985; Cullis et al., 1978; Seddon et al., 1983).

Estudios previos sugieren que en la formación del complejo proteína-membrana también estarían involucradas interacciones hidrofóbicas (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 1998; Wootan et al., 1994). En este trabajo, hemos analizado de manera directa el efecto del volumen hidrofóbico sobre la velocidad de transferencia desde IFABP hacia vesículas conteniendo CL con diferente número de cadenas aciladas. Observamos un llamativo descenso en la velocidad de transferencia de 12AS hacia vesículas conteniendo la misma cabeza polar, conteniendo igual carga, pero menor volumen hidrofóbico. Esto pone en evidencia de que las interacciones hidrofóbicas también serían importantes para el mecanismo de de transferencia del ácido graso de tipo colisional. Una reducción en el volumen hidrofóbico, como en las especies de lisocardiolípinas, también pueden conducir a una fase micelar. Podría ser posible, entonces, que los cambios observados se debieran a la formación de micelas. La formación de micelas determinaría una disminución en el diámetro de las vesículas conteniendo lisocardiolípinas, lo cual no se ha observado. Más aún, la formación de micelas no se ha observado en preparaciones mixtas de fosfolípidos (Pinheiro et al., 1994), y en nuestros estudios todas las vesículas han sido preparadas en presencia de un 75% de PC. La incorporación de CL en vesículas de composición mixta tiene un efecto estabilizador sobre bicapas de PC (Pinheiro et al., 1994; Shibata et al.,

1994), ya que la cabeza polar de la CL estabiliza la red de puentes de hidrógeno intermoleculares que se establece en la superficie de la bicapa.

Cuando se analizaron las velocidades de transferencia desde IFABP acetilada hacia vesículas aceptoras zwitteriónicas, se observó un inesperado incremento en la velocidad de transferencia relativa con respecto a la proteína nativa. Estos resultados difieren con lo observado para la FABP de adipocito acetilada, la cual mostró velocidades de transferencia menores con respecto a la proteína nativa en presencia de vesículas zwitteriónicas (Herr et al., 1995). Es posible que en nuestro caso, la eliminación de los residuos de lisina cargados positivamente haya interrumpido interacciones electrostáticas intramoleculares preexistentes en la superficie de la proteína, resultando en un incremento de las interacciones electrostáticas entre IFABP acetilada y las vesículas zwitteriónicas, comparado con la proteína nativa. Por ejemplo, la lisina 29 y el glutámico 15 forman un puente salino en IFABP nativa; la disrupción de esta unión dejaría al residuo 15 expuesto para interactuar con la superficie catiónica de la cabeza polar colina. Otra posibilidad es que la adición de los grupos acetilos a la molécula de IFABP haya provocado un incremento en el carácter hidrofóbico de superficie de la proteína, promoviendo también un incremento en las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y las membranas zwitteriónicas. El mecanismo de transferencia de tipo colisional clásico fue claramente mantenido, como se pudo comprobar por el incremento proporcional en la velocidad de transferencia del AOFA en función de la concentración de vesículas. En contraste a lo visto con vesículas zwitteriónicas, la transferencia del ácido graso hacia vesículas ácidas fue marcadamente más lento desde IFABP acetilada en comparación con la proteína nativa, en concordancia con lo observado para FABP de adipocito acetilada (Herr et al., 1995). Como se pudo observar, los pequeños cambios en la velocidad de transferencia del ácido graso que acompañaron el incremento en la concentración de las membranas aceptoras, demostraron que IFABP acetilada presenta una disminución en la capacidad de transferir ácidos grasos de manera colisional, hacia membranas cargadas negativamente. Es posible que estos cambios surgieran como resultado de la repulsión entre las cargas negativas de la

superficie de membrana y la superficie con carga negativa neta de IFABP acetilada.

Está generalmente aceptado que el incremento de la fuerza iónica del medio debilita las interacciones electrostáticas entre distintas superficies y estimulan las interacciones hidrofóbicas. El efecto mínimo del incremento de la fuerza iónica, observado tanto para IFABP nativa como para IFABP acetilada, en la velocidad de transferencia de AOFA hacia vesículas zwitteriónicas sugiere que la eliminación de las interacciones electrostáticas por el apantallamiento de cargas provocado por las sales es compensado por un incremento en las interacciones hidrofóbicas. En la proteína acetilada, por otra parte, los grupos acetilos han eliminado las cargas positivas sobre la superficie de la proteína. Por lo tanto, a baja fuerza iónica, los grupos cargados negativamente y los residuos hidrofóbicos (incluyendo los residuos de lisina acetilados) contribuyen a la interacción proteína-membrana. A medida que la fuerza iónica incrementa, la contribución de las interacciones electrostáticas es atenuada. A altas concentraciones de sal, las proteínas nativas y acetilada alcanzan valores de velocidad de transferencia de AOFA similares, esto podría atribuirse a que solo se mantienen las interacciones hidrofóbicas para ambas proteínas.

La velocidad de transferencia del ácido graso hacia vesículas de CL desde IFABP es muy elevada comparada con la observada hacia vesículas zwitteriónicas a baja concentración de sales (Hsu et al., 1996; Córscico et al., 1998; Córscico et al., 2004). Cuando la fuerza iónica del medio aumenta, las interacciones electrostáticas, que son importantes en la transferencia colisional del ligando, están apantalladas, determinando una disminución en la velocidad de transferencia del ácido graso desde la proteína nativa hacia vesículas aniónicas. Por otra parte, el incremento en la fuerza iónica no causó una modificación neta en la velocidad de transferencia de AOFA desde IFABP acetilada hacia vesículas acídicas. Como se dijo anteriormente, a bajas concentraciones de sal, la proteína acetilada no mostró un incremento en la velocidad de transferencia hacia vesículas acídicas, lo cual fue atribuido a un posible efecto repulsivo. Al no presentar interacciones electrostáticas a baja concentración de sal, la velocidad de

transferencia es mantenida por interacciones hidrofóbicas. En este aspecto, es importante resaltar que tanto la transferencia hacia vesículas zwitteriónicas como acídicas a altas concentraciones de sal, desde ambas proteínas, nativa y acetilada tendieron a alcanzar las mismas velocidades de transferencia, indicando que cuando se eliminan las interacciones electrostáticas, las diferencias en comportamiento observadas a fuerza iónica fisiológica también son eliminadas.

En conjunto, estos resultados indican que las interacciones electrostáticas juegan un rol importante en la velocidad de transferencia del ácido graso desde IFABP hacia membranas aceptoras y que las interacciones hidrofóbicas también participan en dicho proceso. En ausencia completa de los residuos superficiales de lisina cargados positivamente, las interacciones hidrofóbicas son suficientes para formar el complejo colisional proteína-membrana con fosfolípidos neutros. Una comparación de los presentes resultados con aquellos de otros miembros de la superfamilia de las FABP que también exhiben un mecanismo de transferencia del ácido graso de tipo colisional, como la de corazón, queratinocito y adipocito, indica que las interacciones hidrofóbicas probablemente juegan un rol más importante en el caso de IFABP. Sin embargo, considerando que la carga superficial de todas las membranas que miran hacia el citosol es negativa, se considera que las interacciones electrostáticas constituyen la fuerza promotora para la transferencia de ácidos grasos en la célula. Más aún, es factible que IFABP mantenga interacciones de tipo electrostático con dominios acídicos de proteínas de membrana, facilitando el transporte direccional intracelular de los ácidos grasos. En el enterocito, IFABP podría estar utilizando dicho mecanismo para entregar ácidos grasos desde y hacia organelas específicas.

2. Rol de la región $\alpha 1$ en la determinación del mecanismo de transferencia de ácidos grasos desde FABP hacia membranas artificiales.

FABP intestinal y FABP hepática, son proteínas intracelulares homólogas que se expresan en enterocitos de la parte proximal del intestino delgado. Existen distintas evidencias que indican que dichas proteínas desempeñan roles relevantes en el transporte y metabolismo de los ácidos grasos, pero las funciones específicas de las mismas permanecen inciertas. Las pequeñas diferencias en su estructura, las diferentes especificidades de unión al ligando, y propiedades de transferencia del mismo, sugieren que cada proteína juega un rol único en el enterocito.

Utilizando el ensayo de transferencia de energía de resonancia *in vitro*, se ha demostrado que el movimiento de AOFA desde LFABP hacia vesículas aceptoras es regulado, en gran parte, por la solubilidad en agua del ácido graso (Hsu et al., 1996, Kim et al., 1992), de acuerdo a un mecanismo de transferencia de tipo difusional. Por otra parte, también se ha demostrado que la transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas fosfolipídicas implicaría la formación de un intermediario en el cual IFABP y la membrana están en contacto (Córsico et al., 1998; ver sección anterior de la Discusión). El mecanismo de transferencia de tipo colisional observado para IFABP también ha sido observado en otros miembros de la familia de las FABP, incluyendo HFABP, AFABP y KFABP (Kim et al., 1992, Wootan et al., 1993, Shaughnessy et al., 2000). Los únicos miembros de la superfamilia que presentan un mecanismo de transferencia de tipo difusional son LFABP, Lb-FABP (Di Pietro et al., 2003) y CRBP II (Herr et al., 1999).

Como se discute en la sección anterior sobre IFABP, la importancia de los residuos catiónicos de superficie juegan un rol fundamental en la formación de interacciones iónicas con membranas fosfolipídicas; el mismo efecto es observado en aquellos miembros de la familia que también presentan un mecanismo de transferencia de tipo colisional. Los marcados efectos de la carga superficial, tanto de la proteína como de la membrana, sobre la velocidad de transferencia de AOFA

sugieren que los residuos cargados positivamente situados en la superficie de las FABP son importantes para la formación de un complejo colisional con la membrana. Las FABP “colisionales” presentan una topología de potenciales electrostáticos de superficie muy similar entre sí; en las mismas se observa un potencial neto positivo en la región α -helicoidal, lo cual fortalece la hipótesis de la importancia de dicho dominio en la interacción con membranas (LiCata et al., 1998). Por otra parte LFABP y Lb-FABP presentan potenciales electrostáticos tanto positivos como negativos en la región α -helicoidal (LiCata et al., 1998; Di Pietro et al., 2003), otorgando un carácter neutro a dicha región, en comparación con las FABP colisionales, lo que determinaría una disminución en las interacciones electrostáticas con membranas cargadas.

El uso de proteínas quiméricas ha sido utilizado exitosamente en numerosos trabajos (Yin et al., 2004; Liou et al., 2002), esta metodología permite revelar en muchos casos la importancia y funcionalidad de dominios aislados de una proteína. La gran similitud de estructura entre I- y LFABP, a pesar de su baja homología de secuencia, convierte a este par de proteínas en excelentes candidatas para la confección de distintas proteínas quiméricas que podrían revelar la funcionalidad, de distintos dominios que las conforman, en la transferencia de AOFA hacia vesículas.

La construcción de un par de proteínas quiméricas por intercambio del dominio α -helicoidal completo entre I- y LFABP (generando α L β IFABP y α L β LFABP) y su posterior análisis demostró la importancia de dicho dominio en la determinación del mecanismo de transferencia en ambas proteínas. La quimera α L β IFABP, en comparación con IFABP, mostró un comportamiento de tipo difusional (Córsico et al., 2004). Por otra parte, la quimera α L β LFABP también mostró cambios drásticos con respecto a LFABP, mostrando un marcado incremento de la velocidad de transferencia de acuerdo a un aumento en la concentración de vesículas zwitteriónicas aceptoras (Córsico et al., 2004). En resumen, estos resultados demostraron que la región α -helicoidal de LFABP es capaz de impartir las propiedades de transferencia difusional, mientras que la

región α -helicoidal de IFABP es capaz de conferir un mecanismo de transferencia de tipo colisional al barril β de LFABP.

Asimismo es importante destacar que las hélices α I de I-, H- y AFABP son anfipáticas, mientras que α I de LFABP y CRBP II no lo son. La participación de hélices anfipáticas en la interacción de diversas proteínas con membranas ha sido bien estudiada, y las características de carga de las mismas son capaces de modular las interacciones de diversas proteínas con membranas (Anantharamaiah et al., 1993). Con el objetivo de evaluar con mayor profundidad las propiedades de dicho dominio, se intercambió la hélice α I entre I- y LFABP, generando las proteínas quiméricas α (I)L β IFABP y α (I)I β LFABP.

Los controles estructurales realizados revelaron que la quimera α (I)L β IFABP no presentó cambios drásticos en su estructura con respecto a las proteínas nativas. Los valores de elipticidad molar y la posición del valor mínimo en el espectro de CD son similares a los de IFABP. Por otra parte el incremento en la hidrofobicidad de la cavidad en comparación a la de IFABP estaría dado por la incorporación de α I de LFABP, ya que la misma posee un mayor número de residuos hidrofóbicos apuntando hacia el interior. Esto evidenciaría la participación del dominio α -helicoidal en la determinación de las propiedades de unión al ligando, estos mismos efectos fueron observados para el par de proteínas quiméricas α L β IFABP y α I β LFABP (Córsico et al., 2004). El valor de K_d para el ácido oleico obtenido para α (I)L β IFABP, utilizando la sonda fluorescente ADIFAB, fue de alrededor de 12 veces superior al obtenido para IFABP denotando una pérdida en la afinidad por dicho ligando. No obstante, el análisis de los datos demostró la existencia de un solo sitio de unión, lo cual refleja que dicha baja en la afinidad puede estar debida a interacciones más débiles del ligando con la cavidad y no a una pérdida de la integridad del bolsillo hidrofóbico. La constante de partición (K_p) representa una manera alternativa de expresar la afinidad de las FABP por un ligando específico en presencia de SUV. De esta manera, el valor obtenido de K_p para α (I)L β IFABP demuestra que la afinidad relativa por el ligando no se ha visto drásticamente afectada, considerando que dicho valor se encuentra entre los valores obtenidos para las proteínas nativas. Estos datos en conjunto

sugieren la posible contribución de la región α -helicoidal en las propiedades de unión de estas proteínas a sus ligandos. En el caso de la proteína quimérica $\alpha(I)\beta$ LFABP se obtuvieron valores de K_p y rendimiento cuántico que se encontraron entre los valores obtenidos para las proteínas nativas, esto determina que la capacidad de unión relativa y transferencia de los ácidos grasos, así como la integridad del entorno del ligando se han mantenido.

Las velocidades de transferencia desde $\alpha(I)\beta$ IFABP hacia vesículas zwitteriónicas resultó ser significativamente menor con respecto a las de IFABP, lo que probablemente indica que la región αI contribuye a la determinación de la velocidad de transferencia. El efecto de la concentración de vesículas aceptoras zwitteriónicas sobre el mecanismo de transferencia desde $\alpha(I)\beta$ IFABP se mostró notablemente atenuado con respecto a IFABP. No obstante se observó un leve incremento de la velocidad de transferencia en respuesta al incremento de la concentración de vesículas aceptoras, sugiriendo que el mecanismo de transferencia de tipo colisional de IFABP no fue eliminado completamente. Recientemente se ha formulado la hipótesis sobre la importancia de un grupo de residuos hidrofóbicos expuestos hacia el solvente que se encuentran cerca de la región portal (Kennedy et al., 2000), este “parche hidrofóbico” parece encontrarse bien conservado en el grupo de las FABP colisionales. Dicha región se encuentra representada por los residuos hidrofóbicos de $\alpha I I$ (Val²⁵, Val²⁶, e Ile³⁰) en apo IFABP formando la única región hidrofóbica de la superficie (Scapin et al., 1992). Los leves aumentos en la velocidad de transferencia observados para $\alpha(I)\beta$ IFABP en respuesta a un aumento en la concentración de vesículas zwitteriónicas podrían estar determinados por la presencia de dichos residuos sumados a los efectos de los residuos de Lys en las posiciones 27 y 29. Estudios recientes, han demostrado la importancia de estos últimos en la modulación del mecanismo de transferencia (Falomir-Lockhart et al., 2006).

La correcta interpretación de estos resultados es dificultosa considerando que no solo implica la ausencia de la hélice anfipática αI propia de IFABP, sino también la presencia de una α hélice no anfipática de su proteína homóloga (LFABP) en su lugar. Estos resultados permiten comprobar que la integridad de la

región α helicoidal de IFABP es esencial en la determinación del mecanismo así como en la velocidad de transferencia.

La incorporación de la región αI de intestino al barril de LFABP provocó un importante incremento de las velocidades de transferencia de la proteína nativa de hígado. Por otra parte, los resultados obtenidos para $\alpha(I)\beta$ LFABP demuestran que la incorporación de la región αI de IFABP es incapaz de impartir el mecanismo de transferencia de tipo colisional del ácido graso a la proteína de hígado. Estos resultados difieren con lo observado para la proteína quimérica $\alpha\beta$ LFABP (Córsico et al., 2004), donde se observa un cambio neto del mecanismo de transferencia del ácido graso hacia SUV de difusional a colisional. Esto permite hipotetizar sobre el posible rol de la región αII de LFABP como responsable del mecanismo de transferencia de tipo difusional de LFABP.

Ambas proteínas quiméricas ven modificadas sus velocidades de transferencia de acuerdo a la región αI incorporada, es decir aproximándose a la velocidad típica de la proteína nativa a la que pertenece dicha región. Estos efectos son equivalentes a los observados por intercambio de la región α -helicoidal completa (Córsico et al., 2004).

El enfrentamiento de ambas proteínas quiméricas con vesículas cargadas negativamente resultó en comportamientos equivalentes a los observados con vesículas zwitteriónicas. En ambos casos las velocidades absolutas de transferencia se han visto modificadas de acuerdo a la región αI incorporada como se ha mencionado anteriormente. La quimera $\alpha(I)\beta$ IFABP perdió la sensibilidad a la carga en comparación al típico incremento mostrado por IFABP, no obstante se observó un aumento significativo de la velocidad de transferencia para vesículas conteniendo CL en su composición, sugiriendo nuevamente el posible mantenimiento parcial del mecanismo de transferencia de tipo colisional. La pérdida de sensibilidad a la carga superficial de las vesículas puede ser debida a la ausencia de la región αI de IFABP, la cual podría actuar como un sensor de carga superficial de las SUV para ser luego la región αII la responsable de hacer efectiva la transferencia del ácido graso. Asimismo, es posible que αI de LFABP ejerza un efecto atenuador de la interacción con membranas cargadas

negativamente. El intercambio de la hélice $\alpha 1$ de IFABP por la de LFABP implica una disminución en el número de cargas efectivas de dicha región considerando que $\alpha 1$ de LFABP posee solo dos residuos cargados (Glu¹⁵ y Lys¹⁹) en contraste con $\alpha 1$ de IFABP que posee exactamente el doble (Glu¹⁵, Lys¹⁶, Glu¹⁹ y Lys²⁰). Esta notable disminución en el número de estos residuos estaría afectando al potencial electrostático positivo encontrado típicamente en la región α helicoidal de IFABP (Li Cata et al., 1998).

La quimera $\alpha(1)\beta$ LFABP resultó insensible a la presencia de carga en las vesículas con PS al igual que LFABP, la cual presentó el típico mecanismo aparente de transferencia del ácido graso de tipo difusional. Estos resultados podrían interpretarse en términos de un efecto inhibitorio ejercido por la región $\alpha 1$ de LFABP en la posible formación de un complejo proteína membrana durante el mecanismo de transferencia frente a vesículas cargadas negativamente. Es notable resaltar que la sola presencia de la región $\alpha 1$ de IFABP es incapaz de otorgar la sensibilidad a la carga observada para IFABP. Sin embargo, es importante considerar cautelosamente los resultados obtenidos con esta proteína quimérica, ya que los efectos observados pueden estar asociados a defectos en el correcto plegamiento de la misma.

3. Análisis de la interacción de FABP con membranas artificiales mediante el uso de un reactivo fotoactivable.

Se analizó la interacción física de FABP nativas y algunas variantes estructurales con membranas, mediante el empleo de un ensayo de “foto-crosslinking”. Estos ensayos se realizaron con la finalidad de: a) detectar dominios específicos involucrados en la formación del complejo proteína-membrana, y b) analizar el tipo de interacciones involucradas. Esta metodología ha sido empleada para el análisis de la interacción de distintas proteínas con membranas brindando importantes resultados (Córsico et al., 2001; Weber et al., 1994; Garner et al., 1998).

Una de las variantes estructurales empleadas fue la proteína mutante de IFABP carente de la región α -helicoidal, HL-IFABP; la cual presenta una estructura secundaria hoja β plegada muy estable y retiene la capacidad de unir ácidos grasos. La misma provee un modelo único para el estudio del rol del dominio α -helicoidal en el mecanismo de transferencia del ligando, en la interacción con membranas y su posible rol *in vivo* (Córsico et al., 1998). La ausencia del dominio α -helicoidal alteró dramáticamente la transferencia del AOFA desde IFABP hacia vesículas de diferente composición. De todas maneras no eliminó por completo el incremento en la velocidad de transferencia de AOFA con el aumento de la concentración de membranas fosfolipídicas zwitteriónicas, indicando que interacciones con membrana, aunque mucho más débiles, se mantienen para HL-IFABP (Córsico et al., 1998). En adición a estos ensayos de transferencia se analizó la interacción de HL- e IFABP con membranas utilizando un ensayo de competencia con citocromo c, dicho ensayo evalúa la capacidad de distintas proteínas de prevenir la unión del citocromo c a membranas. De esta manera se observó una disminución de un 80 % por parte de HL-IFABP en la prevención de la unión del citocromo c a membranas en comparación a IFABP (Córsico et al., 1998). Estos estudios en conjunto, indican que la región α -helicoidal juega un rol crítico tanto en la interacción con membranas como en la determinación del mecanismo de transferencia del ligando desde IFABP hacia membranas.

Con el objetivo de detectar el/los dominios involucrados en la interacción física con membranas se realizaron una serie de experimentos enfrentando vesículas de PC, PS y CL con HL-IFABP. HL-IFABP no mostró incorporación de marca en presencia de ningún tipo de vesícula, indicando muy poca o ninguna interacción neta con membranas. Estos resultados estarían de acuerdo con lo observado mediante ensayos de transferencia de energía de resonancia y ensayos de competencia con citocromo c descritos anteriormente. El hecho de que HL-IFABP no muestre interacción, es indicativo de que esas interacciones mínimas, observadas mediante ensayos de transferencia, no son lo suficientemente estables en el tiempo siendo prácticamente imperceptibles mediante esta técnica.

Los experimentos de proteólisis con el agente skatolato de IFABP luego de su fotoactivación, mostraron una mayor interacción para el péptido conteniendo la región α -helicoidal en comparación con el otro fragmento generado por dicha proteólisis. Estos resultados comprueban la importancia de la región α -helicoidal en la formación del complejo proteína-membrana. El hecho de que el otro fragmento resultante de la proteólisis haya incorporado marca en menor medida podría representar una interacción tardía por dicho dominio con membranas. Esto estaría de acuerdo con un mecanismo de interacción con membranas desarrollado en distintas etapas, donde se postula una interacción inicial entre la proteína y membrana, seguida de una transición conformacional de la proteína desde un estado cerrado a un equilibrio de estados abiertos, en tercera instancia el ácido graso se disocia de la proteína para finalmente incorporarse en la membrana (Hodson et al., 1997; Córscico et al., 1998; Falomir-Lockhart et al., 2006).

La interacción de ambas proteínas quiméricas también fue evaluada mediante la técnica de "fotocrosslinking". Ambas proteínas quiméricas presentan una menor interacción con membranas con respecto a sus proteínas nativas correspondientes. El comportamiento observado para la quimera $\alpha(1)\text{L}\beta\text{IFABP}$ estaría indicando la importancia de la región $\alpha 1$ en la interacción con vesículas sin bien no determina la completa anulación de la formación de los complejos proteína-membrana. La menor interacción observada sentaría nueva evidencia

sobre la importancia de la región α II para mantener la interacción física con membranas. Estos datos se corroboran con lo observado mediante ensayos de transferencia de energía de resonancia con esta proteína quimérica. En el caso de α (I) β LFABP la menor incorporación de marca puede estar indicando que la región α I de LFABP podría cumplir un rol fundamental de interacción con membranas formando un complejo muy estable en el tiempo. La ausencia de dicha región determinaría un complejo menos estable lo cual se vería reflejado en una menor incorporación de marca.

La neutralización de los residuos superficiales de lisina de IFABP no impidió la interacción de la misma con membranas zwitteriónicas resaltando la presencia de interacciones complementarias en la formación del complejo proteína-membrana. Dichas interacciones, como se describió anteriormente en esta discusión, serían de carácter hidrofóbico. Estas observaciones estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de transferencia de energía de resonancia descritos anteriormente.

La incorporación de cargas negativas superficiales en las vesículas determinó un concomitante aumento en la incorporación de marca para IFABP, esta dependencia de la carga es coincidente con lo observado mediante ensayos de transferencia de energía de resonancia. Considerando que la cara citosólica de las membranas celulares presenta carga negativa, estos resultados demuestran de manera directa que la colisión de IFABP con membranas está determinada por interacciones electrostáticas.

Finalmente, se ha observado la interacción física de LFABP con membranas zwitteriónicas y acídicas. Estudios realizados por otros autores sugieren la existencia de interacciones de LFABP con membranas fosfolípídicas en condiciones de baja fuerza iónica (Davies et al., 1999). En nuestros experimentos, empleando el reactivo fotoactivable, se ha trabajado en condiciones de fuerza iónica fisiológica, tal como se trabajó en los experimentos de transferencia de ácidos grasos hacia membranas. Considerando los resultados de nuestros estudios cinéticos, en los que observamos que LFABP emplearía un mecanismo difusional de transferencia de ácidos grasos, estos datos sugerirían

que la transferencia del ligando por parte de LFABP sería independiente de la interacción con membranas. O sea, que las interacciones con membranas no conducirían a la transferencia efectiva de ácidos grasos desde LFABP. Estas observaciones han abierto un nuevo capítulo que determinará una nueva serie de estudios a llevarse a cabo en nuestro laboratorio con el objetivo de caracterizar dicha interacción. Cabe mencionar la posibilidad de que la mayor incorporación de marca observada para LFABP pudiera ser debida a la unión de fosfolípidos conteniendo el grupo fotoactivable, en vez de deberse a la interacción de LFABP con la membrana. Si bien LFABP presenta una amplia especificidad de ligandos (ácidos grasos, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, ácidos biliares, ésteres de Acil-CoA, prostaglandinas, etc) y una estequiometría que la hace única en la familia (Thompson et al., 1999) no existe evidencia consistente sobre la unión de fosfolípidos por parte de LFABP. Además los controles realizados mediante cromatografía de capa fina del reactivo fotoactivable no mostraron signos de degradación alguna, descartando la posibilidad de la presencia de una población libre de ácidos grasos conteniendo grupo reactivo.



Conclusiones

A partir de los resultados del análisis de los factores que gobiernan la transferencia de ácidos grasos desde IFABP hacia membranas se ha determinado que las interacciones electrostáticas juegan un papel fundamental en la determinación de la velocidad y el mecanismo de transferencia del ácido graso desde IFABP hacia membranas aceptoras; y que las interacciones hidrofóbicas también participan en dicho proceso.

Como resultado del intercambio de la región αI entre I- y LFABP, se han obtenido un par de proteínas quiméricas, $\alpha(I)L\beta$ IFABP y $\alpha(I)I\beta$ LFABP, capaces de ligar y transferir ácidos grasos. El análisis de la cinética de transferencia de las proteínas quiméricas ha demostrado la importancia que dicha región posee en la modulación de las velocidades absolutas de transferencia de ácidos grasos en ambas FABP intestinales. Asimismo se ha puesto en evidencia que la región αI de IFABP es de gran importancia en la determinación del mecanismo de transferencia de tipo colisional observado para IFABP, pero es incapaz de impartir dicho comportamiento al cuerpo de LFABP.

El análisis de la interacción física de FABP con membranas ha permitido demostrar la importancia del dominio α -helicoidal completo en la interacción física de IFABP con membranas. Asimismo se ha determinado la importancia de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la formación del complejo proteína-membrana.

Estos estudios han permitido caracterizar con detalle el mecanismo de transferencia descrito para IFABP y complementar los conocimientos sobre el subgrupo de FABP “colisionales”. Más aún, han permitido profundizar sobre las diferencias existentes entre I- y LFABP, lo cual contribuirá al conocimiento de las funciones específicas que cada una de estas proteínas desempeña en el enterocito.

- Abumrad N.A.; Perkins R.C.; Park J.H.; and C.R. Park. (1981). Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J. Biol. Chem.*, **256**: 9183-9191.
- Agellon L.B.; Toth M.J.; and A.B. Thomson. (2002). Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol. Cell. Biochem.*, **239**:79–82.
- Alvite. G., Di Pietro S. M., Santomé J. A. Ehrlich R., Esteves A. (2001). Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1533**: 293-302.
- Anantharamaiah G.M., Jones M.K., and J.P. Segrest. (1993). The Amphipathic Helix. CRC Press, Boca Raton.
- Atshaves B.P., Foxworth W.B., Frolov A., Roths J.B., Kier A.B., Oetama B.K., Piedrahita J.A., and F. Schroeder. (1998). Cellular differentiation and I-FABP protein expression modulate fatty acid uptake and diffusion. *Am. J. Physiol.*, **43**:C633–644.
- Baier L. J.; Sacchettini J. C.; Knowler W. C.; Eads J.; Paolisso G.; Tataranni P. A.; Mochizuki H.; Bennet P. H., Bogardus C.; and M. Prochazca. (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. *J. Clin. Invest.*, **95**: 1281-1287.
- Baier L.J.; Bogardus C.; and J.C. Sacchettini. (1996). A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J.Biol.Chem.*, **271**:10892-10896.
- Banaszak L.; Winter N.; Xu Z.; Bernlohr D.A.; Cowan S.; and T.A. Jones. (1994). Lipid-binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **45**:89-151.
- Bass, N. M. (1988). The cellular fatty acid binding proteins: Aspects of structure, regulation, and function. *Int. Rev. Cytol.*, **3**: 143-184.
- Bass N. M. (1990). Fatty acid-binding protein expression in the liver: its regulation and relationship to the zonation of fatty acid metabolism. *Mol. Cell. Biochem.*, **98**:167-76.
- Besnard P.; Niot I.; Poirier H.; Clément L; and A. Bernard. (2002). New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol Cell Biochem.*, **239**:139–147.
- Bloom W.; and D. W. Fawcett (1995). Bloom-Fawcett Tratado de Histología, duodécima edición. Editorial Interamericana-Mc Graw-Hill.
- Buckland A. G.; and D. C. Wilton. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1483**: 199-216.
- Carrizo C. M., Crovetto C., Barrientos E. B., Córdoba O. L. and J. A. Santomé. Presence of a fatty acid-binding protein in the digestive gland of mollusca (*Platinigera magellanica*). Comunicación oral en XXXVIII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, Noviembre 5-9 de 2002.
- Chan L.; Wei C. F.; Li W. H.; Yang C. Y.; Ratner P.; Pownall H.; Gotto A. M. Jr.; and L. C. Smith. (1985). Human liver fatty acid binding protein cDNA and

- amino acid sequence. Functional and evolutionary implications. *J. Biol. Chem.*, **260**:2629-2632.
- Cistola D.P.; Sacchettini J.C.; Banaszak L.J.; Walsh M.T.; and J.I. Gordon. (1989). Fatty acid interactions with rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins expressed in *Escherichia coli*: A comparative ^{13}C NMR study. *J. Biol. Chem.*, **264**: 2700-2710.
 - Cistola D.P.; Kim K.; Rogl H.; and C. Frieden. (1996). Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochemistry*, **35**:7559-7565.
 - Clérico E. M.; Peisajovich S. G.; Ceolín M.; Ghiringhelli P. D.; and M. R. Ermácora. (2000). Engineering a compact non-native state of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1476**: 203-218.
 - Clérico E.M.; and M. R. Ermacora. (2001). Tryptophan mutants of intestinal fatty acid-binding protein: ultraviolet absorption and circular dichroism studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **395**:215-224.
 - Córscico B.; Cistola D.P.; Frieden C.; and J. Storch. (1998). The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:12174-12178.
 - Córscico B.; Toledo J.; and H. Garda. (2001). Evidence for a central apolipoprotein A-I domain loosely bound to lipids in discoidal lipoproteins that is capable of penetrating the bilayer of phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, **276**: 16978-16985.
 - Córscico B.; Liou H. L.; and J. Storch. (2004). The α -helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry*, **43**: 3600-3607.
 - Crimmins D.; Mc Court D.; Thoma R.; Scott M.; Macke K.; and B. Schwartz. (1990). In situ chemical cleavage of proteins immobilized to glass-fiber and polyvinylidenedifluoride membranes: Cleavage at tryptophan residues with 2-(2'-nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3'-bromodoleine to obtain internal amino acid sequence. *Analytical Biochemistry*, **187**: 27-38.
 - Cullis P. R.; Verkleij A. J.; and P. H. Ververgaert. (1978). Polymorphic phase behavior of cardiolipin as detected by ^{31}P NMR and freeze-fracture techniques. Effects of calcium, dibucaine and chlorpromazine. *Biochim. Biophys. Acta*, **513**: 11-20.
 - Darimont C.; Gradoux N.; Persohn E.; Cumin F.; and A. De Pover. (2000). Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J.Lipid Res.*, **41** :84-92.
 - Davies J.K., Thumser A.E.A., and D.C. Wilton. (1999). Binding of recombinant rat liver fatty acid-binding protein to small anionic phospholipids vesicles results in ligand release: a model for interfacial binding and fatty acid targeting. *Biochemistry*, **38**: 16932-16940.
 - Di Pietro S. M.; Córscico B.; Perduca M.; Monaco H. L.; and J. A. Santomé. (2003). Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid binding protein. *Biochemistry*, **42**: 8192-8203.

- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**:1948-1954.
- Erol E.; Kumar L. S.; Cline G. W.; Shulman G. I.; Kelly D. P.; and B. Binas. (2004). 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 J*, **18**:347–349.
- Falomir-Lockhart L. J.; Laborde L.; Kahn P. C.; Storch J., and B. Córscico. (2006). Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: support for a multistep process. *J. Biol. Chem.* En prensa.
- Freskgard P. O.; Martensson L. G.; Jonasson P.; Jonsson B. H.; and U. Carlsson. (1994). Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*, **33**:14281-14288.
- Friedman R.; Nachliel E.; and M. Gutman. (2006). Fatty acid binding proteins: same structure but different binding mechanisms? Molecular dynamics simulations of intestinal fatty acid binding protein. *Biophys. J.*, **90**: 1535-1545.
- Gangl A.; and R.K. Ockner. (1975). Intestinal metabolism of plasma free fatty acids: Intracellular compartmentation and mechanisms of control. *J. Clin. Invest.* **55**:803-813.
- Garner J.; Durrer P.; Kitchen J.; Brunner J.; and Crooke E. (1998). Membrane-mediated release of nucleotide from an initiator of chromosomal replication, *Escherichia coli* DnaA, occurs with insertion of a distinct region of the protein into the lipid bilayer. *J. Biol. Chem.*, **273**:5167-5173.
- Gill S. C.; and P. H. von Hippel. (1989). Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.*, **182**: 319-326.
- Glatz J. F.; and J. H. Veerkamp. (1983). A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding by proteins. *Anal. Biochem.*, **132**: 89-95.
- Glatz J. F. C.; and G. J. Van der Vusse. (1996). Cellular fatty-acid binding proteins: Their function and physiological significance. *Prog. Lipid. Res.*, **35**: 243-282.
- Gomori G. (1942). A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.*, **27**: 955-960.
- Halldén G.; and G. Aponte. (1997). Evidence of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *J. Biol. Chem.*, **272**: 12591-12600.
- Haunerland N. H., and J.M. Chisholm. (1990). Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1047**:233-238.
- Haunerland N. H.; and F. Spener. (2004). Fatty acid-binding proteins – insights from genetic manipulations. *Prog. Lipid. Res.*, **43**: 328-349.
- Herr F. M.; Matarese V.; Bernlohr D.A.; and J. Storch. (1995). Surface lysine residues modulate the collisional transfer of fatty acid from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry*, **34**:11840-11845.

- Herr F. M.; Aronson J.; and J. Storch. (1996). Role of portal region lysine residues in electrostatic interactions between heart fatty acid binding protein and phospholipid membranes. *Biochemistry*, **35**:1296-1303.
- Herr F. M.; Li E.; Weinberg R. B.; Cook V. R.; and J. Storch. (1999). Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.*, **27**: 9556-9563.
- Hertzfel A.V.; and D.A. Bernlohr. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends. Endocrinol. Metab.*, **11**:175–80.
- Higuchi R.; Krummel B.; and R.K. Saiki. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic. Acids. Res.*, **16**:7351-7667.
- Ho S.Y.; Delgado L.; and J. Storch. (2002). Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **277**:1816-1823.
- Hodsdon M. E.; and Cistola D. P. (1997). Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ¹⁵N NMR relaxation and ¹H exchange. *Biochemistry*, **25**: 2278-2290.
- Hohoff C.; Borchers T.; Rustow B.; Spener F.; and H. van Tilbeurgh. (1999). Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. *Biochemistry*, **38**:12229-12239.
- Hovius R.; H. Lambrechts; K. Nicolay; and B. de Kruijff. (1990). Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1021**: 217-226.
- Hsu K.T.; and J. Storch. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid binding-proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **271**:13317-13323.
- Huang C.; and T. E. Thompson. (1974). Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Method. Enzymol.*, **32**: 485–489.
- Huelsenbeck J.P.; and B. Rannala. (1997). Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, **276**:227-232.
- Jamison R.S.; Newcomer M.E.; and D. E. Ong. (1994). Cellular retinoid-binding proteins: limited proteolysis reveals a conformational change upon ligand binding. *Biochemistry*, **33**:2873-2879.
- Kennedy M.W., and J. Beauchamp. (2000). Sticky-finger interaction sites on cytosolic lipid-binding proteins? *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**:1379-1387.
- Kim H.K.; and J. Storch. (1992). Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles: Effect of ligand and solution properties. *J. Biol. Chem.*, **267**:77-82.
- Kim K.; Cistola D.P.; and C. Frieden. (1996). Intestinal fatty acid-binding protein: The structure and stability of a helix-less variant. *Biochemistry*, **35**:7553-7558.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lehner R.; and A. Kuksis. (1995). Triacylglycerol synthesis by purified triacylglycerol synthetase of rat intestinal mucosa. Role of acyl-CoA acyltransferase. *J Biol Chem.*, **270**:13630-13636.
- Lehninger A.; Nelson D.; and M. Cox. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. Freeman Press.
- LiCata V. J.; and D. A. Bernlohr. (1998). Surface properties of adipocyte Lipid-binding protein: Response to lipid binding, and comparison with homologous proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **33**: 577–589.
- Liou H. L.; and J. Storch. (2001). Role of surface lysine residues of adipocyte fatty acid-binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **40**: 6475-6485.
- Liou H.L.; Kahn P.C.; and J. Storch. (2002). Role of the helical domain in fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid-binding proteins to membranes: analysis of chimeric proteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1806–1815.
- Lowry O. H.; Rosenbrough N. J.; Farr A. L.; and R. J. Randall. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Martin G.G.; Huang H.; Atshaves B.P.; Binas B.; and F. 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. *Biochemistry*, **42**:11520–11532.
- Massey J.B.; Bick D.H.; and H.J. Pownall. (1997). Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys. J.*, **72**: 1732-1743.
- McLaughlin S.; and A. Aderem. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends. Biochem. Sci.*, **20**:272-276.
- Montoudis A.; Delvin E.; Menard D.; Beaulieu J.; Jean D.; Tremblay E.; Bendayan M.; and E. Levy. (2006). Intestinal-fatty acid binding protein and lipid transport in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **339**: 248-254.
- Murota K.; Matsui N.; Kawada T.; Takahashi N.; and T. Fushuki. (2001). Inhibitory effect of monoacylglycerol on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**:1441-1443.
- 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. *J. Nutr.*, **135**:1626-1630.
- Newberry E.; X. Xie; S. Kennedy; X. Han; K. Buhman; J. Luo; R. Gross and N. Davidson. (2003). Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid binding protein gene. *J. Biol. Chem.*, **278**: 51664-51672.
- Ockner R.K.; Manning J.A.; Poppenhausen R.B.; and W.K. Ho. (1972). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, **177**:56-58.

- Pinheiro T. J.; Duralski A. A.; and A. Watts. (1994). Phospholipid headgroup-headgroup electrostatic interactions in mixed bilayers of cardiolipin with phosphatidylcholines studied by ^2H NMR. *Biochemistry*, **33**:4896-4902.
- Poirier H.; Niot I.; Degrace P.; Monnot M.C.; Bernard A.; and P. Besnard. (1997). Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *Am. J. Physiol.*, **273**:289-295.
- Powell G. L.; and D. Marsh. (1985). Polymorphic phase behavior of cardiolipin derivatives studied by ^{32}P NMR and X-ray diffraction. *Biochemistry*, **24**: 2902-2908.
- Prows D.R.; Murphy E.J.; and F. Schroeder. (1995). Intestinal and liver fatty acid binding proteins differentially affect fatty acid uptake and esterification in L-cells. *Lipids*, **30**:907-910.
- Prows D.R.; Murphy E. J.; Moncecchi D.; and F. Schroeder. (1996). Intestinal fatty acid-binding protein expression stimulates fibroblast fatty acid esterification. *Chem. Phys. Lipids.*, **84**:47–56.
- Richieri G.V.; Ogata R.T.; and A.M. Kleinfeld. (1994). Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J. Biol. Chem.* **269**: 23918-23930.
- Sacchettini J.C., Gordon J.I., and L.J. Banaszak. (1989). Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. *J. Mol. Biol.*, **208**:327-39.
- Sacchettini J.C., Scapin G., Gopaul D., 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. Correlation with the structures of the apoprotein and the protein with bound palmitate. *J. Biol. Chem.*, **267**:23534-45.
- Sambrook J.; MacCallum P.; & D. Russell. (2001). Molecular Cloning - laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santome J.A.; Di Pietro S.M.; Cavagnari B.M.; Córdoba O.L.; and E.C. Dell'Angelica. (1998). Fatty acid-binding proteins. Chronological description and discussion of hypotheses involving their molecular evolution. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.*, **4**: 23-38.
- Scapin G.; Gordon J.I.; and J.C. Sacchettini. (1992). Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **267**:4253-4269.
- Schaap F.G.; van der Vusse G. J.; and J. F. C. Glatz. (2002). Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem*, **239**:69–77.
- Schaffer J.E.; and H. F. Lodish. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, **79**:427-436.
- Schlame M.; Rua D.; and M. L. Greenberg. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid. Res.*, **39**:257-288.
- Seddon J. M.; Harlos K.; and D. Marsh. (1983). Metastability and polymorphism in the gel and fluid bilayer phases of dilauroylphosphatidylethanolamine. Two crystalline forms in excess water. *J. Biol. Chem.*, **258**:3850-3854.

- Shaughnessy S.; Smith E. R.; Kodukula S.; Storch J.; and S.K. Fried. (2000). Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2^{-/-}) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte fatty acid binding protein. *Diabetes*, **49**: 904-911.
- Shibata A.; Ikawa K.; Shimooka T.; and H. Terada. (1994). Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1192**:71-78.
- Shields H.M.; Bates M.L.; Bass N.; Best C.J.; Alpers D.H.; and R. Ockner. (1986). Light microscopic immunocytochemical localization of hepatic and intestinal types of fatty acid-binding proteins in rat small intestine. *J. Lipid Res.*, **27**: 549-557.
- Stahl A.; Gimeno R. E.; Tartaglia L.A.; and H. Lodish. (2001). Fatty acid transport proteins: current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.*, **12**: 266-273.
- Steele R.A.; Emmert D.A.; Kao J.; Hodsdon M.E, Frieden C.; and D.P. Cistola. (1998). The three-dimensional structure of a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein. *Protein Science*, **7**: 1332-1339.
- Storch J. and A.M. Kleinfeld. (1986). Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **25**:1717-1726.
- Storch J.; Bass N. M.; and A.M. Kleinfeld. (1989) Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **264**: 8708-8713.
- Storch J.; and N.M. Bass. (1990). Transfer of fluorescent fatty acids from liver and heart fatty acid-binding proteins to model membranes. *J. Biol. Chem.*, **265**:7827-7831.
- Stremmel W.; Lotz G.; Strohmeyer G.; and P.D. Berk. (1985). Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J. Clin. Invest.*, **75**:1068-1076.
- Thompson J. S.; Quigley E.M.; Palmer J.M.; West W.W.; and T.E. Adrian. (1996). Luminal short-chain fatty acids and postresection intestinal adaptation. *JPEN J. Parenter Enteral Nutr.*, **20**:338-343.
- Thompson J.; Winters N.; Terwey D.; Bratt J.; and L. Banaszak. (1997). The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **272**:7140-7150.
- Thompson J.; Ory J.; Reese-Wagoner A.; and L. Banaszak. (1999). The liver fatty acid binding protein – comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem*, **192**: 9-16.
- Thumser E. A.; and J.Storch. (2000). Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J. Lipid Res.*, **41**: 647–656.
- Thumser A. E.; Tsai J.; and J. Storch. (2001). Collision-mediated transfer of long-chain fatty acids by neural tissue fatty acid-binding proteins (FABP): studies with fluorescent analogs. *J Mol Neurosci.*, **16**: 143-150.
- Trotter P.; Ho S.; and J. Storch. (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J. Lipid Res.*, **37**: 336-346.

- Udenfriend S.; Stein S.; Bohlen P.; Dairman W.; Leimgruber W.; and M. Weigele. (1972). Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science*, **178**: 871-872.
- Vassileva G.; Huwyler L.; Poirier K.; and L.B.T.M.J Agellon. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J.*, **14**: 2040-2046.
- Veerkamp J.H.; Peeters R.A.; and R.G. Maatman. (1991). Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1081**:1-24.
- Weber T.; Paesold G.; Galli C.; Mischler R.; Semenza G.; and J. Brunner. (1994) Evidence for H(+)-induced insertion of influenza hemagglutinin HA2 N-terminal segment into viral membrane. *J. Biol. Chem.*, **269**: 18353-18358.
- Weber T.; and J. Brunner. (1995). 2-(Tributylstannyl)-4-[3-(trifluoro-methyl)-3H-3-yl] benzyl alcohol: a block for photolabeling and cross-linking reagents of very high specific radioactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 3084–3095.
- Wootan M.G.; Bernlohr D.A.; and J. Storch. (1993). Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membrane. *Biochemistry*, **32**:8622-8627.
- Wootan M.G.; and J. Storch. (1994). Regulation of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid binding proteins by acceptor membrane lipid composition and structure. *J. Biol. Chem.*, **269**:10517-10523.
- Wu F.; Córscico B.; Flach C. R.; Cistola D.P.; Storch J.; 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**: 1976-1983.
- Xu Z., Buelt M.K., Banaszak L.J., and D.A. Bernlohr. (1991). Expression, purification, and crystallization of the adipocyte lipid binding protein. *J. Biol. Chem.*, **266**: 14367-14370.
- Yin D.; Gavi S.; Wang H.; and C. C. Malbon. (2004). Probing receptor structure/function with chimeric G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.*, **65**: 1323-1332.