



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesis de Maestría – PEDECIBA Biología
Subárea Bioquímica



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Rol de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos en el núcleo del enterocito

Lic. Mariana Suárez

Orientadora:

Dra. Adriana Esteves

Tribunal:

Dr. Ricardo Ehrlich

Dr. Flavio Zolessi

Dr. Matías Möller

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias
Montevideo, Noviembre 2018

Quisiera agradecer especialmente, a todas las personas que han hecho posible este trabajo, que me han acompañado en el correr de este posgrado y desde mis inicios con la pasantía de graduación.

A Adriana por confiar en mí nuevamente y darme un lugar en el laboratorio, dedicarme su tiempo, sus enseñanzas y su paciencia. Por permitirme siempre plantear nuevos desafíos y tener en cuenta mi opinión.

A todos los del 304: Ceci, Gaby y Vale por el apoyo y las tantas sugerencias, a Cora, Claudio, Mailén y Flo por dar una mano siempre que lo necesité.

A la Sección de Bioquímica en general, por la buena onda, los innumerables almuerzos a las risas, y estar siempre a las órdenes.

A Lucía Canclini por enseñarme y ayudarme tanto en los ensayos de cultivo celular como en el resto del trabajo, siempre a disposición de dar una mano.

A todo DGEN del IIBCE, por recibirme para hacer la pasantía en cultivo celular, especialmente a Folle que siempre estuvo totalmente dispuesto a colaborar con su gran experiencia y a Cami por la ayuda día a día.

Al Dr. Mario Ermácora y la Lic. Pamela Toledo por recibirme en la UNQ y ayudarme con los ensayos de difracción circular.

Al Dr. Gerardo Ferrer del IQB por ayudarme con los ensayos de unión a ligando.

A mi familia, mis padres y mi hermano, que me hacen el aguante en todo momento, y sin ellos esto no hubiese sido posible.

A mis amig@s, las de siempre y a todos los que hice en estos casi 9 años desde mis inicios en Facultad de Ciencias.

A la ANII y CAP por las becas de posgrado, PEDECIBA y CSIC por la financiación de las pasantías.

Al los Dres. Ricardo Ehrlich, Flavio Zolessi y Matías Möller por aceptar corregir esta tesis. Personalmente es un honor que científicos de su nivel lean mi trabajo.

A todos los que me apoyaron en este transcurso por la ciencia...

Muchas gracias!!

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. La absorción intestinal como el primer paso en la etiología de las enfermedades vinculadas al metabolismo lipídico	3
2.2. Captura de ácidos grasos en el intestino	4
2.3. Las proteínas de unión a ácidos grasos: FABPs	6
2.3.1. Estructura y función de las FABPs	6
2.3.2. Las FABPs en el intestino	9
2.3.3. Las FABPs en la regulación de la expresión génica	13
2.4. Transporte de proteínas hacia el núcleo	15
2.4.1. Generalidades del transporte núcleo-citoplasma	15
2.4.2. Translocación nuclear de las FABPs	18
2.5. Nuestros modelos experimentales	20
2.5.1. El pez cebra como un modelo útil para el estudio de las FABPs en la absorción	20
2.5.2. Caco-2 como modelo celular	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo General	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Modelado por homología de Fabp2	26
4.2. Mutagénesis dirigida sobre <i>fabp2</i>	26
4.3. Clonado de <i>fabp2</i> y mutantes en pCDNA-EGFP, y purificación de plásmidos para ensayos de cultivo celular	28
4.4. Ensayos de cultivo celular	30
4.4.1. Cultivo de células Caco-2	30

4.4.2.	Transfección en cultivos de células Caco-2	30
4.4.3.	Preparación y ensayos de ácidos grasos para cultivo celular ..	31
4.5.	Expresión de Fabp2 salvaje y mutantes recombinantes	32
4.6.	Purificación de las proteínas recombinantes	33
4.7.	Evaluación de la pureza, diálisis y liofilización	34
4.8.	Dicroísmo Circular de Fabp2 salvaje y mutantes	35
4.9.	Delipidación de Fabps recombinantes	35
4.10.	Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16 de Fabp2 salvaje y mutantes	36
4.11.	Ensayos de expresión de <i>fabp2 in vivo</i>	36
4.11.1.	Cría de peces	36
4.11.2.	Obtención de muestras para estudios de expresión	36
4.11.3.	Extracción de ARN de muestras de intestino	37
4.11.4.	Retrotranscripción del ARN mensajero	37
4.11.5.	PCR en tiempo real	38
5.	RESULTADOS	40
	Estudio de los mecanismos moleculares que regulan el ingreso al núcleo de la proteína Fabp2 de <i>Danio rerio</i>	40
5.1.	Estudios <i>in silico</i>	40
5.2.	Ensayos en cultivos celulares	43
5.2.1.	Mutagénesis dirigida	43
5.2.2.	Clonado de <i>fabp2</i> y mutantes en pCDNA-EGFP, y purificación de plásmidos para cultivo celular	45
5.2.3.	Puesta a punto de las condiciones de transfección	50
5.2.4.	Estudio de la localización celular de Fabp2wt	52
5.2.5.	Estudio de la localización celular de Fabp2wt y los mutantes	54
5.2.5.1.	Fabp2 ^{17K/A²⁹R/A³⁰K/A}	54

5.2.5.2.	Fabp2 ¹⁷ K/A ²⁸ K/A ²⁹ R/A	57
5.2.5.3.	Fabp2 ¹⁷ K/A y Fabp2 ²⁸ K/A ²⁹ R/A	60
5.3.	Estudios de estructura y capacidad de unión al ligando de las proteínas recombinantes	62
5.3.1.	Expresión de Fabp2wt y mutantes recombinantes	62
5.3.2.	Purificación de Fabp2wt y mutantes recombinantes	63
5.3.3.	Estudios estructurales mediante Dicroísmo Circular	70
5.3.4.	Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16	73
	Efecto de la dieta en el nivel de expresión de <i>fabp2</i> en el intestino de <i>Danio rerio</i>	76
5.4.	Extracción de ARN de muestras de intestino de <i>Danio rerio</i>	76
5.5.	Retrotranscripción del ARN mensajero	77
5.6.	PCR en tiempo real	78
6.	DISCUSIÓN	80
	Estudio de los mecanismos moleculares que regulan el ingreso al núcleo de la proteína Fabp2 de <i>Danio rerio</i>	80
6.1.	Estudios <i>in silico</i>	80
6.2.	Ensayos en cultivo celular	82
6.3.	Expresión y purificación de Fabp2wt y mutantes recombinantes	85
6.4.	Estudios estructurales mediante Dicroísmo circular	87
6.5.	Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16	89
	Efecto de la dieta en el nivel de expresión de <i>fabp2</i> en el intestino de <i>Danio rerio</i>	91
7.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	94
8.	BIBLIOGRAFÍA	98
9.	ANEXOS	127

1. RESUMEN

Las FABPs (*fatty acid binding proteins*) son proteínas, que unen ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrofóbicos en forma no covalente. Se distinguen unas de otras, no sólo por su distribución tisular, sino también por la especificidad y afinidad por sus ligandos. La función específica de las FABPs está aún bajo investigación, si bien recientemente se han obtenido hallazgos prometedores.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, hemos localizado a la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (Fabp2) en el núcleo del enterocito de *Danio rerio*. Además, hemos verificado mediante experimentos con peces alimentados con un análogo de ácido graso fluorescente (BODIPY FL C12), que Fabp2 co-localiza a nivel nuclear con este ligando, sugiriendo que es ésta quien lo transporta al núcleo.

Distintas experiencias sugieren que una vez en el núcleo, varios miembros de proteínas a las que pertenecen las FABPs interaccionarían con receptores nucleares para transferirles el ligando unido. Entre estos factores de transcripción se encuentran los PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*). Los PPARs regulan la expresión génica de diversas proteínas involucradas en una variedad de procesos biológicos, incluidos la homeostasis glucídica, activación de macrófagos, diferenciación celular y la regulación de genes involucrados en el mantenimiento y catabolismo de lípidos.

Una de las preguntas que surge sobre la localización nuclear de estas proteínas es cuáles son los mecanismos moleculares que permiten el ingreso a este compartimento. Ninguna de las proteínas de la familia de las FABPs posee en su estructura primaria secuencias consenso denominadas señales de localización nuclear (NLS). Sin embargo, recientemente se ha verificado experimentalmente la presencia de NLS tridimensionales en CRABP-II, FABP4, FABP5, posicionadas en la región helicoidal de estas proteínas. Por otro lado, la activación de la señal sería dependiente del ligando que unen, siendo algunos ácidos grasos promotores de la translocación nuclear, mientras que otros no. Teniendo en cuenta estos resultados y la similitud que existe entre las estructuras de todas las proteínas de esta familia, se ha sugerido la existencia de NLS similares para el resto de las FABPs, descartándose hasta el momento la presencia de esta señal para FABP2.

En el presente proyecto, en primer lugar nos propusimos estudiar el mecanismo molecular por el cual la proteína intestinal Fabp2 de *Danio rerio* ingresa al núcleo. Analizamos *in silico* la presencia de residuos claves en el proceso de activación de la NLS ubicados en la región portal de la proteína, teniendo en cuenta lo descrito para FABP4. Además, hemos localizado residuos básicos ubicados en las hélices αI y αII de esta

proteína, que se posicionan de manera similar a la NLS de FABP4, y por lo tanto podrían formar parte de la señal que regula su ingreso al núcleo. Para verificar esta hipótesis, generamos una serie de mutantes que incluyen distintas combinaciones de los aminoácidos K17, K28, R29 y K30. Mediante ensayos transfectando células Caco-2 estudiamos el comportamiento de las proteínas mutantes respecto a la salvaje, en presencia y ausencia de ligandos inductores de la translocación nuclear. Los resultados obtenidos mostraron que los residuos de K17, K28 y R29 estarían implicados en una NLS funcional. Además, nuestros resultados sugieren que estos aminoácidos actúan de forma cooperativa para regular el ingreso al núcleo.

Paralelamente a los estudios en cultivo celular, se generaron las proteínas mutantes de forma recombinante para comparar su estructura y capacidad de unir ligandos *in vitro*, teniendo como referencia a la forma salvaje de la proteína. Estos estudios se realizaron mediante dicroísmo circular y ensayos de unión a un análogo de ácido graso de cadena larga fluorescente (BODIPY FL C16). Los resultados mostraron que todas las isoformas de Fabp2 son muy similares en términos estructurales y mantienen la capacidad de unir el ligando.

En una segunda instancia, estudiamos el efecto de una dieta con alto contenido lipídico en la transcripción de *fabp2* en el intestino anterior de *Danio rerio*. Se alimentaron peces con yema de huevo y se sacrificaron a distintos tiempos luego de la ingesta. Mediante PCR en tiempo real se verificó que en peces sacrificados una hora y media luego de la ingesta, la presencia del transcripto de *fabp2* aumenta más de ocho veces respecto al control no alimentados. Consideramos este estudio como una primera aproximación para futuros estudios de la regulación de la expresión de este gen, en particular con su relación con receptores nucleares de tipo PPAR

En este trabajo se ha contribuido desde el punto de vista molecular al estudio del rol de FABP2, particularmente obteniendo los primeros indicios de cómo esta proteína ingresa al núcleo, y cómo se regula su expresión respecto a la dieta.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La absorción intestinal como el primer paso en la etiología de las enfermedades vinculadas al metabolismo lipídico.

La obesidad es sin duda uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo debido a su rápida progresión y los efectos nocivos de las enfermedades asociadas (Ogden et al., 2014; Arroyo-Johnson et al., 2016; Buttet et al., 2016). Según la organización mundial de la salud, en el año 2016 alrededor de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos, mientras que más de 340 millones de niños tenían sobrepeso o eran obesos (WHO 2018). En Uruguay, la obesidad en general y la obesidad infantil en particular, son uno de los principales problemas de salud pública que enfrenta el país. La guía alimentaria para la población uruguaya indica que cuatro de cada diez jóvenes de 15 a 24 años y tres de cada diez adolescentes entre 13 y 15 años presentan sobrepeso u obesidad (Ministerio de Salud Pública, 2016). El acceso fácil a alimentos sabrosos y ricos en energía se cree que contribuye en gran medida a esta epidemia (Besnard, 2016). En las dietas occidentales, los lípidos representan más del 40% de la ingesta calórica diaria, mientras que el valor nutritivo recomendado es menor al 10%. Este alto consumo de grasa, asociado con un desbalance nutritivo, contribuye no solamente al aumento de la prevalencia de la obesidad en la población, sino también a la aparición de una serie de enfermedades como la aterosclerosis, diabetes no dependiente de insulina, cáncer de mama y colon, con costos dramáticos para el hombre y la sociedad (Miyares et al., 2014; Hirakawa et al., 2015; Claas y Arnett, 2016, Ramasamy, 2016).

La incidencia del síndrome metabólico (MS) ha crecido enormemente en las últimas décadas (Wild et al., 2004; Lorenzo et al., 2006). El MS es un conjunto de marcadores de riesgo metabólico que incluyen la obesidad abdominal, el elevado nivel de glucosa sanguínea, y alteraciones a nivel del perfil lipídico, los cuales en su totalidad contribuyen al desarrollo de desórdenes cardiovasculares (Gogia et al., 2006; Grundy, 2007). Pacientes que sufren del MS suelen mostrar disturbios en el metabolismo de ácidos grasos (NCEP 2001) con un incremento de niveles de ácidos grasos libres en plasma, lo cual influye negativamente la absorción de glucosa mediada por insulina (Boden, 1999; McGarry et al., 2002). Las alteraciones en los perfiles de lipoproteínas se originan muy probablemente a partir de una elevada producción hepática de partículas de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) ricas en triacilglicerol, que en combinación con un aumento en los flujos de lípidos mediado por la proteína de transferencia de colesterol (CETP) y una lipólisis disminuida mediada por lipoproteínas (LPL), resulta en la hipertrigliceridemia y la baja concentración sérica de HDL (Nordestgaard et al., 1997; Agerholm-Larsen et al., 2000; Pollex y Hegele, 2006). Sin

embargo, se ha vuelto cada vez más evidente que el metabolismo de las lipoproteínas es también regulado por las características de absorción del colesterol y los ácidos grasos en el intestino. Por ejemplo, se ha visto recientemente que los niveles de absorción en el intestino se encuentran inversamente relacionados con el transporte reverso del colesterol transportado desde macrófagos del tejido periférico hacia las heces (Sehayek y Hazen, 2008).

Es por estas razones que se ha realizado una considerable inversión para comprender el papel de los lípidos en la etiología de estas patologías. Sin embargo, a pesar de conocerse que el intestino es responsable de la absorción de las grasas, no han sido totalmente comprendidos los mecanismos involucrados en la captura, transporte intracelular y destino de los lípidos y sus derivados metabólicos en la célula intestinal. La comprensión de los mecanismos moleculares vinculados a estos procesos podrá aportar nuevas estrategias en la lucha contra estos desordenes metabólicos.

2.2. Captura de ácidos grasos en el intestino.

Las grasas obtenidas a través de la dieta son el mayor aporte de lípidos presentes en el lumen del intestino. La hidrólisis de lípidos por los jugos pancreáticos libera grandes cantidades de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) que son absorbidos por los enterocitos a nivel de su membrana apical, mediante mecanismos complejos (Alpers et al., 2000; Wang et al., 2013). La internalización de los ácidos grasos a través membrana plasmática no es un tema completamente entendido. Particularmente, hay un debate sobre el paso limitante en el proceso total de captura, y en qué medida una o más proteínas asociadas facilitan la captura o regulan el destino de los lípidos absorbidos a nivel intestinal (Mansbach y Siddiqi, 2016; Glatz y Luiken, 2017). Se han estudiado tres transportadores de ácidos grasos que cumplen un rol importante en la captura de los mismos. La proteína FABPpm de 40 kDa, localizada periféricamente en la membrana plasmática (Stump et al., 1993), FAT/CD36 una glicoproteína integral de membrana de 88 kDa, con dos dominos transmembrana, también conocida como el receptor scavenger de clase B CD36 (Abumrad et al., 1993), y la proteína integral de membrana transportadora de ácidos grasos subtipo 4 FATP4 de 63 kDa que posiblemente puede impulsar la absorción de ácidos grasos o activarlos al atraparlos dentro de la célula como sus tioésteres de CoA (Stahl et al., 1999; Pei et al., 2004; DiRusso et al., 2005; Pelters et al., 2008; Watkins PA, 2008) (Figura 2.1).

Las proteínas vinculadas a la captura de LCFA, FATP4, FABPpm, Caveolina-1 y CD36/SR-B2 han sido aisladas de la membrana apical del enterocito (Niot et al., 2009; Glatz et al., 2016). Si bien la contribución de los transportadores de membrana en la captura de los LCFA no parece ser su rol principal, estudios *in vivo* sugieren que podrían afectar el destino de los LCFA en el enterocito (Niot et al., 2009; Glatz y Luiken, 2017).

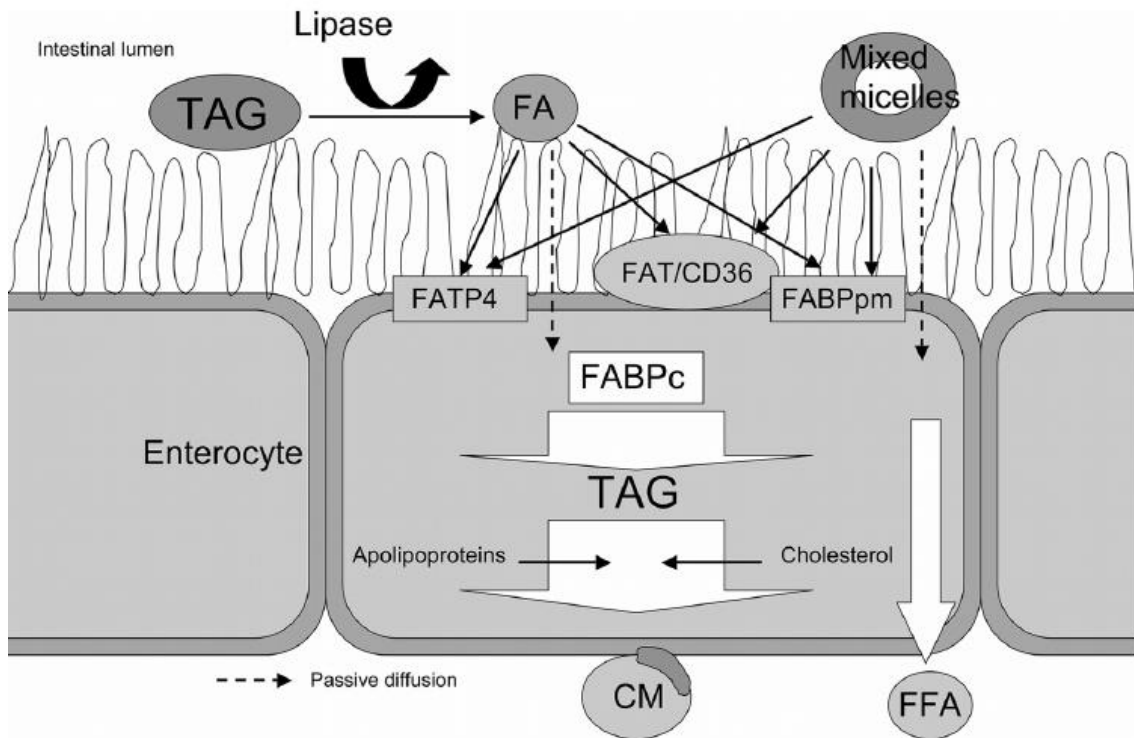


Figura 2.1. Esquema de captura intestinal de ácidos grasos provenientes de la dieta. Los ácidos grasos atraviesan el lumen intestinal. Extraído de Masson et al., 2010.

Se ha sugerido que la mayor parte de los LCFA absorbidos son incorporados en vesículas que contienen además caveolina-1, CD36 y fosfatasa alcalina intestinal. Una vez endocitadas se dirigirían al retículo endoplásmico (Siddiqi et al., 2013). Por otro lado, más recientemente se ha sugerido que dada la concentración de LCFA (micromolar) a nivel del lumen intestinal la participación de las proteínas facilitadoras sería cuantitativamente marginal, adquiriendo la difusión pasiva un rol muy importante (Cifarelli y Abumrad, 2018). La elevada concentración intracelular de proteínas de unión a ácidos grasos, FABPs, a nivel de la membrana apical del enterocito, sugiere que participan en la captura de estos ligandos hidrofóbicos (Alpers et al., 2000). Se ha postulado que los transportadores de membrana actuarían como un punto de anclaje para estas proteínas (Niot et al., 2009; Schwenk et al., 2010; Buttet et al., 2016).

2.3. Las proteínas de unión a ácidos grasos: FABPs.

2.3.1. Estructura y función de las FABPs.

Las FABPs fueron identificadas en 1972 por Ockner y colaboradores y son miembros de la familia de proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBPs, del inglés *intracellular lipid-binding proteins*), que también incluye las proteínas de unión a retinol y ácido retinoico (CRBP y CRABP, del inglés *cellular retinol-binding protein* y *cellular retinoic acid-binding protein*, respectivamente) (Hauerland y Spener, 2004). Son proteínas tejido específicas, de baja masa molecular (14-15 kDa), típicamente de entre 127 y 134 residuos aminoacídicos, que unen de forma no covalente ligandos hidrofóbicos, principalmente LCFA y otros ligandos no polares (Ockner et al., 1972; Alpers et al., 1984; Bernlohr et al., 1984; Chan et al., 1985; Lowe et al., 1985; Billich et al., 1988; Narayanan et al., 1988; Siegenthaler et al., 1993; Fujita et al., 1995; Shimizu et al., 1997). Estas proteínas además tienen una distribución filogenética muy amplia (Hertzel y Bernlohr, 2000; Esteves y Ehrlich, 2006; Lucke et al., 2006; Smathers et al., 2011; Venkatachalam et al., 2017).

Las FABPs poseen una estructura terciaria altamente conservada que consiste en dos hojas β antiparalelas con cinco hebras cada una, formando un barril β , dentro del cual se posicionan los ligandos. En el interior del barril, aminoácidos cargados positivamente interactúan con el anión carboxilo de los ácidos grasos (Coe y Bernlohr, 1998). Particularmente, se ha visto que los residuos de Triptófano 83 (W83), Arginina 106 (R106) y Glutamina 116 (Q116) de FABP2 son importantes para la unión del carboxilato del ligando (Eads et al., 1993). Además, un motivo corto de hélice-vuelta-hélice conecta las hebras β A y B y también tiene un importante rol en la transferencia del ligando desde y hacia membranas artificiales (Kaczocha et al., 2009; Storch y Thumser, 2010) (Figura 2.2). A pesar de la similitud de estructura terciaria de estas proteínas, en general comparten entre el 20 y 70% de identidad a nivel de su estructura primaria (Chmurzyńska, 2006; Storch y Thumser, 2010), sugiriendo la posibilidad de funciones específicas entre las distintas FABPs.

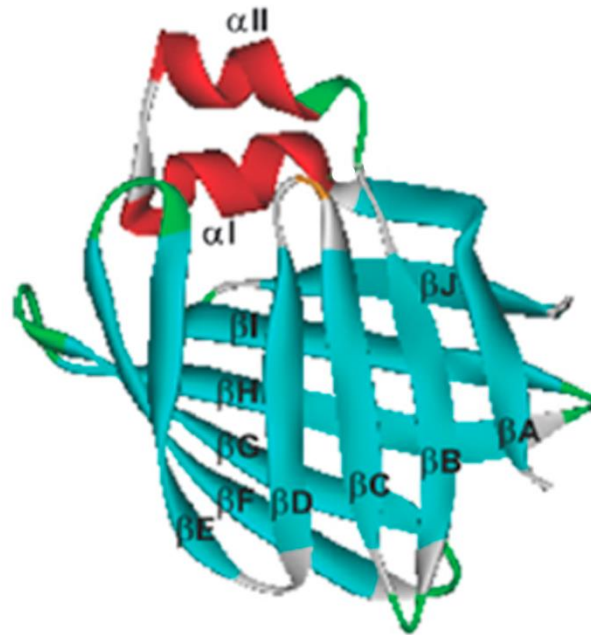


Figura 2.2. Estructura tridimensional de FABP2 humana resuelta mediante NMR (3IFB). En cintas, se señalan las hebras β y las hélices α . Modificado de Storch y McDermott, 2009.

Las FABPs están expresadas en mayor abundancia en tejidos involucrados en el metabolismo activo de lípidos, tales como hígado, intestino, corazón y adipocitos. Han sido identificados 12 subtipos en vertebrados, cada uno nombrado en un principio de acuerdo al tejido en donde predomina: L-FABP (hígado), I-FABP (intestino), H-FABP (corazón/musculo), A-FABP (adipocito), E-FABP (epidermis), Il-FABP (ileon), B-FABP (cerebro), T-FABP (testículo), y My-FABP (mielina). Aún cuando su nomenclatura especifique un tejido en particular, actualmente se conoce que cada miembro de esta familia de proteínas se expresa en más de un tejido. Actualmente se tiende a emplear una nomenclatura en la que se le asigna un número a cada una luego de la sigla FABP; por ejemplo FABP1 para la forma hepática y FABP2 para la intestinal (Hertzell y Bernlhor, 2000).

En términos generales la función de estas proteínas estuvo vinculada al transporte de ácidos grasos hacia los distintos organelos de acuerdo a las necesidades de cada tejido (Gordon y Lowe, 1985). Estudios posteriores indicaron que se distinguen unas de otras, no solo por su distribución tisular, sino también por la especificidad y afinidad por sus ligandos sugiriendo funciones específicas. Algunos de sus miembros estarían implicados en la modulación del crecimiento y proliferación celular, en la provisión de energía metabólica, así como en la regulación de la expresión génica e inmunidad celular (Glatz y Veerkamp, 1985; Madsen et al., 1992; Yang Y, et al. 1994; Shimizu et al., 1997; Wang et al., 2003). Mas aún, se ha postulado que la diversidad funcional se genera a través de las interacciones con lípidos que permiten sustentar la

homeostasis facilitando la señalización entre células y órganos (Hotamisligil y Bernlohr, 2015).

La función específica de cada una de las FABPs está aún bajo investigación, si bien en los últimos años se han obtenido avances importantes, particularmente centrados en la FABP hepática (FABP1), y la de adipocito (FABP4) (Gillilan et al., 2007; Neeli et al., 2007; Smith et al., 2008; Hostetler et al., 2009; Atshaves et al., 2010; Siddiqi et al., 2010; Huang et al., 2016; Zamarreno et al., 2017; Ge et al., 2018, Zeng et al., 2018).

Se ha sugerido que algunas FABPs además de su función de transporte de ácidos grasos entre organelos, cumplen un rol nuclear participando en respuestas biológicas y transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico a través de la unión a receptores de hormonas nucleares (NHRs) y otras moléculas de señalización extracelulares (De Santis et al., 2004; Furuhashi y Hotamisligil, 2008), así como moduladores del metabolismo (Figura 2.3) (Li et al., 2012; Kawaguchi et al., 2016). El movimiento de ácidos grasos en las células es un proceso complejo y dinámico que tiene efectos en varios aspectos de las funciones celulares pudiendo ser responsable de la modulación del crecimiento celular y proliferación (Amiri et al., 2018).

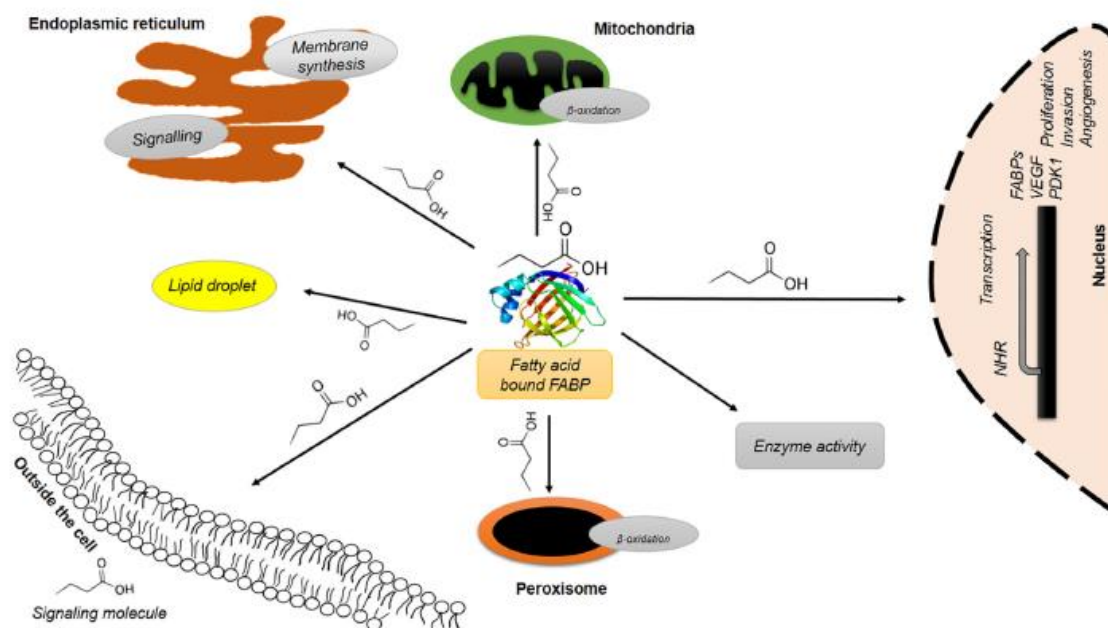


Figura 2.3. Esquema de procesos biológicos que involucran FABPs y ácidos grasos. Extraído de Amiri et al., 2018.

Se ha reportado que algunas FABPs están relacionadas con el desarrollo de procesos oncológicos, estando sobre reguladas en células tumorales en cáncer de

próstata, vejiga y riñón (Kawaguchi et al., 2016; Tölle et al., 2011), y pueden ser utilizadas como marcadores tumorales en algunos casos (Boiteux et al., 2009).

2.3.2. Las FABPs en el intestino.

Las células intestinales son las responsables del procesamiento e hidrólisis de los productos lipídicos de la dieta. La absorción intestinal de los lípidos es altamente eficiente en la cual se capturan más del 95% de los lípidos de la dieta (Caspary, 1992). Para este proceso es crítica la presencia de proteínas que capturen y transporten ácidos grasos en el citoplasma (Storch y Córscico, 2008). Dentro del enterocito, a lo largo de las vellosidades intestinales se encuentran presentes varias isoformas de FABPs, no siendo así en las regiones de las criptas intestinales (Guilmeau et al., 2007).

En el enterocito se expresan la forma hepática, intestinal e ileal. La FABP hepática (L-FABP o FABP1) fue la primera en ser identificada dentro de la familia. Como su nombre sugiere fue inicialmente localizada en el hígado, pero más tarde se encontró que estaba presente en intestino y riñón (Storch y Córscico, 2008). La FABP intestinal (I-FABP o FABP2) también está presente en el enterocito, y a diferencia de la FABP1 es específica de este tejido. Aunque ambas proteínas comparten solo un 29% de similitud de secuencia, su estructura terciaria es altamente similar (Gordon y Lowe, 1985; Lowe et al., 1987; Bass, 1988; Storch y Córscico, 2008). En humanos, la cantidad de FABP1 expresada en el intestino es mayor que la de FABP2 (Levy et al., 2009; Pelsers, et al. 2003), pero sin embargo en ratones se ha observado niveles similares de expresión (Levy et al., 2009; Pelsers et al., 2003; Bass et al., 1985). Además de la FABP1 y FABP2, en la región distal del intestino se ha evidenciado la presencia de la FABP ileal (II-FABP o FABP6) con mayor afinidad los ácidos biliares que por los ácidos grasos (Zimmerman et al., 2001), obteniéndose constantes de disociación en el rango de micromolar (Fujita et al., 1995; Miller y Cistola, 1993). La expresión de la FABP6 aumenta en respuesta a la presencia de ácidos biliares (Ono, 2005; Grober, 1999; Hwang et al., 2002). Además, se ha observado que en ratones *knock out* para esta proteína incrementa la excreción fecal de ácidos biliares y no hay cambios en la expresión de FABP1 en el intestino (Praslickova et al., 2012), sugiriendo la ausencia de solapamiento funcional entre ambas proteínas.

La FABP1 se encuentra presente a lo largo de todo el intestino, pero su mayor expresión es a nivel del duodeno y yeyuno (Agellon et al., 2002). La FABP1 es la única proteína de la familia que tiene dos sitios de unión a ácidos grasos, y por lo tanto tiene mayor capacidad de unión que el resto de las FABPs. Esta proteína también puede unir otros tipos de lípidos como lisofosfolípidos, monoacilgliceroles, ácidos grasos unidos a coenzima A (CoA) y prostaglandinas (Storch y Córscico, 2008). Se ha demostrado mediante el uso de membranas artificiales, que esta proteína es capaz de transferir

ácidos grasos hacia la membrana por un mecanismo difusional, a diferencia de la mayoría de las FABPs que interactúan directamente con la membrana mediante un mecanismo colisional (Hsu y Storch, 1996; Storch et al., 2002). En cuanto a la localización subcelular de esta proteína, se ha visto que es dependiente del estado de alimentación. Luego de la ingesta, la FABP1 se localiza extensamente sobre el citosol, y en cambio, en estado de inanición se localiza en la región más apical de la célula (Alpers et al., 2000). Por otro lado, se ha visto que en el promotor de FABP1 se encuentra una región denominada elemento de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE), y por lo tanto su expresión estaría regulada mediante receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Issemann et al., 1992). Además, se ha reportado que en ausencia de FABP1 se reduce la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Erol et al., 2004; McIntosh et al., 2009) y en el intestino (Lagakos et al., 2011; Gajda et al., 2013).

En cuanto a la FABP2, a diferencia de la FABP1, en mamíferos se expresa solamente en las células intestinales. Esta proteína se expresa a lo largo de todo el intestino delgado, siendo máxima su expresión en el yeyuno (Sacchettini et al., 1990). Así como la FABP1, la FABP2 se encuentra distribuida sobre todo del citosol del enterocito luego de la ingesta, y en la región apical durante la inanición (Alpers et al., 2000).

La FABP2, así como la mayoría de los miembros de su familia, tiene un único sitio de unión a ligando, y posee alta afinidad por los ácidos grasos saturados e insaturados. Se ha reportado que posee menor afinidad que FABP1 por los ácidos grasos insaturados (Richieri et al., 1994; Lowe et al., 1987; Richieri et al., 2000). No se ha observado que esta proteína tenga la capacidad de unir otros ligandos lipídicos. A diferencia de FABP1, se ha reportado que FABP2 transfiere los ácidos grasos a membranas artificiales a través de un mecanismo colisional (Hsu y Storch, 1996). Particularmente, la región hélice-vuelta-hélice de la FABP2 contiene varios residuos cargados positivamente que interactúan con las cargas negativas de las cabezas de los fosfolípidos de estas membranas (Franchini et al., 2008). Ensayos utilizando una variante de FABP2 en la cual se sustituyeron las hélices α por las de FABP1 mostraron que disminuye la tasa de transferencia y la transferencia de ácidos grasos se da por un mecanismo difusional (Franchini et al., 2008). Por el contrario, cuando en la FABP1 se sustituyen las hélices por las de FABP2 se evidencia un mecanismo de transferencia colisional (Córsico et al., 2004; Franchini et al., 2008). Por lo tanto, las hélices de FABP2 son necesarias para la interacción directa con la membrana y la transferencia del ligando (Córsico et al., 2004; Hsu y Storch, 1996). Más recientemente se ha reportado que las FABPs colisionales, podrían interactuar también con éstas a través de aminoácidos cargados positivamente posicionados en el barril β del lado opuesto a las hélices α (Zamarreño et al., 2017).

La expresión de FABP2 en el intestino está influenciada por la hormona PYY (péptido tirosina tirosina), la cual es liberada por las células intestinales en respuesta a lípidos en el intestino (Hallden y Aponte, 1997). En ratones, la expresión de FABP2 en el intestino no incrementa en respuesta a la ablación de FABP1 y viceversa (Lagakos et al., 2011; Newberry et al., 2003; Vassileva et al., 2000). Las diferencias entre FABP1 y FABP2 y la falta de mecanismos compensatorios a falta de una u otra, sugieren que estas proteínas juegan roles distintos en el enterocito (Figura 2.4). Si bien las funciones de las FABPs intestinales se encuentran en estudio, actualmente se conoce más sobre FABP1 que de FABP2.

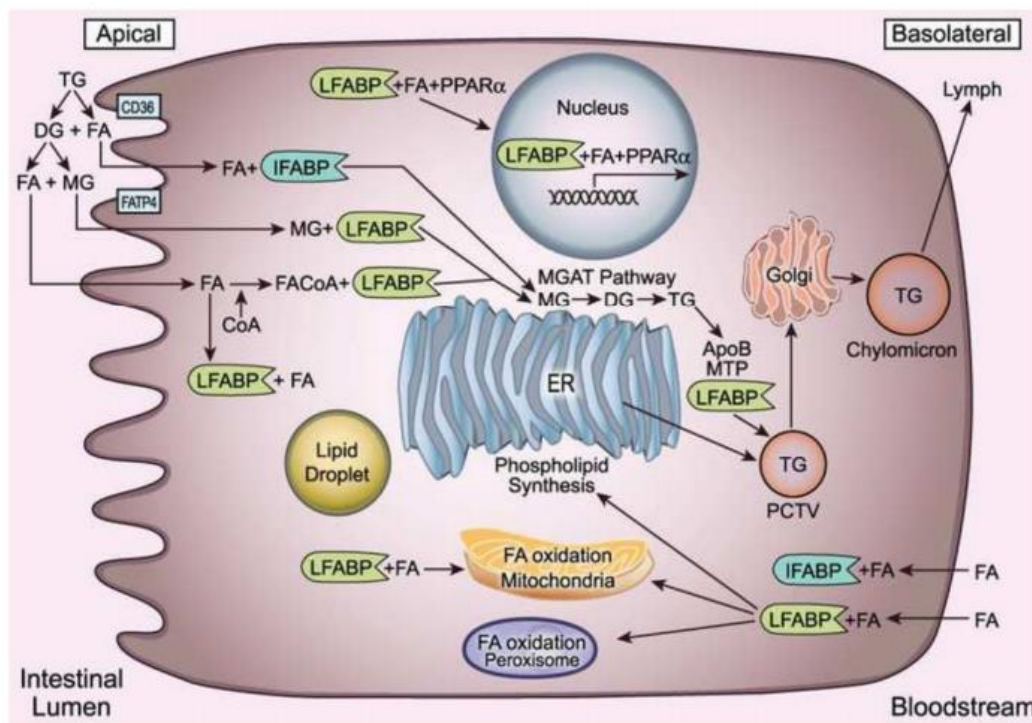


Figura 2.4. Esquema de las funciones de FABP1 y FABP2 en el enterocito. Extraído de Gajda y Storch, 2015

Los niveles elevados de estas FABPs en las vellosidades intestinales en respuesta a dietas con alto contenido lipídico, y la necesidad de un transportador intracelular soluble de moléculas hidrofóbicas sugieren un rol activo en el transporte intracelular de los ácidos grasos absorbidos, dirigiéndolos hacia los distintos compartimentos subcelulares (Storch y Córscico, 2008; Lagakos et al., 2011; Gajda et al., 2013; Huang et al., 2016).

La co-existencia de ambas proteínas en el intestino como ya se indicara, sugieren funciones diferentes. Si bien estas proteínas tienen una estructura tridimensional superponible, difieren en el número y variedad de ligandos que transportan, estabilidad

frente a la desnaturalización térmica, sensibilidad al pH así como el mecanismo de transferencia desde y hasta membranas modelo, modulación frente a diferentes efectores, localización a lo largo del intestino y patrón de desarrollo (Kim y Storch, 1992; Hsu y Storch, 1996; Thompson et al., 1997; Thumser y Storch, 2000; Dube et al., 2001, Levy et al., 2009; Hughes et al., 2015). Estudios con ratones *fabp2* *-/-* han mostrado alteraciones en el metabolismo del enterocito sin afectar la absorción lipídica, mientras que en ratones *fabp1* *-/-* no se observaron modificaciones en el metabolismo intestinal de ácidos grasos (Lagakos et al., 2011; Gadjia et al., 2013). Resultados de otros autores generan incertidumbre sobre los efectos de la eliminación de FABP1 en el modelo murino (Rodríguez Sowicki et al., 2017). Se ha propuesto que la FABP1 juega un rol importante en el ensamblado de las vesículas transportadoras de quilomicrones (PCTVs) desde el retículo endoplásmico, hacia el aparato de Golgi para su exportación (Siddiqi et al., 2010). En cuanto al rol de FABP2 en el enterocito se han vertido diferentes propuestas. Por un lado se ha propuesto a través de ensayos con células Caco-2, que esta proteína juega un rol en la síntesis de TAG y fosfolípidos (Levy et al., 2009), mientras que ensayos con células cultivos con células HIEC-6 indican que la FABP2 no participa en la esterificación de ácidos grasos en TAG y fosfolípidos (Montoudis et al., 2006; Montoudis et al., 2008). Ambas proteínas han sido inmunolocalizadas en las mitocondrias de enterocitos y hepatocitos sugiriendo también un rol en la β oxidación (Erol et al., 2004; Montoudis et al., 2008; Karsenty et al., 2009; Levy et al., 2009).

En el caso de FABP2 se ha reportado que no está involucrada en la formación de quilomicrones (Neeli I, et al. 2007; Siddiqi S, et al. 2010), y se ha propuesto que participa en la captura de ácidos grasos desde el lumen intestinal, y el tráfico dentro del enterocito entre organelos (Alpers DH, et al. 2000). Más recientemente se ha visto que Fabp2 se transloca al núcleo del enterocito de *D. rerio*. Además, se verificó que en peces alimentados con un análogo de ácido graso fluorescente (BODIPY FL C12), esta proteína co-localiza con el ligando en el núcleo de las células intestinales, sugiriendo un rol en el metabolismo nuclear (Esteves et al., 2016).

2.3.3. Las FABPs en la regulación de la expresión génica.

Hay un creciente interés en elucidar los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos beneficiosos y adversos de los alimentos y sus componentes. Desde la identificación de las FABPs se conoce que los niveles de las FABPs intestinales aumentan su expresión en respuesta a una dieta rica en grasas y aumenta la expresión de enzimas claves de la β oxidación (Ockner y Manning, 1972; Ockner y Manning, 1976). En los años 70 se desconocían los mecanismos moleculares que vinculaban la dieta, las FABPs y el catabolismo de los lípidos. Debieron pasar más de 30 años para que comenzara a conocerse que los nutrientes impactan en la expresión génica a través de la activación o supresión de factores de transcripción específicos (Muller et al., 2003; Desvergne et al., 2006). Se ha demostrado que el receptor nuclear PPAR α tiene un rol clave en la regulación de la expresión génica mediada por la dieta, en el intestino (Bunger et al., 2007). Los PPARs forman parte de una subfamilia de receptores nucleares (NRs), cuyos activadores endógenos incluyen a los LCFA. Drogas antidiabéticas e hipolipidémicas como los fenofibratos y thiazolidinediones son también activadores de estos receptores. Estos receptores (subtipos α , γ y δ) regulan la transcripción de genes que codifican para enzimas vinculadas al metabolismo energético (Kersten et al., 2000; Francis et al., 2003; Rakhshandehroo et al., 2010, Lamichane et al., 2018). Para hacer efectiva su acción, además de unirse a su ligando, los PPARs deben heterodimerizarse tanto con alguno de sus subtipos, como con los receptores RXR o LXR los cuales son activados por ácido 9-cis retinoico y ácidos grasos respectivamente. Esto ocurre debido a que el LBD (dominio de unión al ligando), además de unir el ligando, tiene funciones de dimerización. Una vez formado el complejo activo, éste se une al ADN en regiones específicas de los promotores de los genes blanco, los elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE), (Tontonoz et al., 1994; Lemberger et al., 1996). Estas secuencias PPRE se encuentran hacia el extremo 5' de los genes blanco, y generalmente poseen la siguiente secuencia: AGGTCANAGGTCA (Chan et al., 2010). PPAR α se expresa en varios tejidos, siendo los niveles de expresión en el intestino de los más altos reportados. En particular, PPAR α está presente en el intestino y el hígado, y cuando une ligandos tales como LCFA y fibratos, aumenta la transcripción de genes involucrados en la oxidación de lípidos (Nakamura et al., 2014). Se ha determinado que en el genoma de varios organismos están presentes elementos respuesta de PPAR, HNF4a, y NF- κ B, demostrándose además, que responde a fenofibrato (Torra et al., 2002; You et al., 2017).

Experimentos con células Caco-2 adicionadas con bezafibrato así como en ratones alimentados con dietas con alto contenido en grasas, aumenta la expresión de

genes vinculados a la oxidación de ácidos grasos. Se observó también que el aceite de oliva administrado con bezafibrato suprime la lipidemia postprandial (Kimura et al., 2011, Colin et al., 2013). Entre los genes blanco de PPAR α se encuentra varios genes de la β oxidación: Acil-CoA oxidasa, Enoil-CoA-hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa, entre otros. Son también blanco de estos receptores en el hígado, los genes que codifican para las FABPs hepática, de enterocito, cardíaca, adipocito, y epitelial (Rakhshandehroo et al., 2010). La inducción de la expresión de FABP1 y FABP2 por PPAR α en el intestino se ha analizado a través de diferentes aproximaciones. Se ha observado que aumenta los niveles de transcripción de *fabp1* y *fabp2* en el intestino, luego de la administración de clofibrato (Bass et al., 1985). Para el caso de *fabp1* se demostró mediante ensayos de transactivación, el efecto del receptor PPAR δ sobre la región 5' del gen (Poirier et al., 2001). Los mismos autores demostraron que la inducción de este gen es independiente de PPAR α en el intestino de ratones *knock out*. Por otro lado, empleando también en ratones *knock out*, se observó que la expresión de *fabp2* en el intestino es dependiente de PPAR α (Fujishiro et al., 2002).

La identificación de la FABP1 en el núcleo de los hepatocitos junto con la co-localización con el receptor nuclear PPAR α ha aumentado el interés en las FABPs (Bordewick et al., 1989; Wolfrum et al., 2001; Hostetler et al., 2009). Se ha demostrado que FABP1 interacciona con PPAR α y más recientemente se demostró que también interacciona con HNF4a, un receptor de hormonas esteroideas que promueve la transcripción de genes involucrados con la inflamación en el hígado e intestino (Hostetler et al., 2009; McIntosh et al., 2009; McIntosh et al., 2013; Babeu y Boudreau, 2014). Por este motivo, se propone que las FABPs cederían sus ligandos a estos receptores, activándolos. En células COS-7 en presencia de PPAR α , el ácido oleico provoca la traslocación de FABP1 y FABP2 al núcleo. Ensayos de transactivación demostraron que el ácido oleico activa al receptor induciendo la expresión de un gen reportero. El efecto se magnifica cuando están presentes las FABPs, sugiriendo que son éstas quienes le transfieren el ácido oleico al receptor activándolo. Similares resultados se obtuvieron empleando agonistas de PPAR α , siendo el fenofibrato activador del receptor a través de FABP2 y el ácido fenofíbrico a través de FABP1. Es así que las FABPs, junto a los PPARs adquieren un papel clave en la regulación de las vías metabólicas involucradas en mantener el balance energético y en especial participando en la oxidación de las grasas. Por otro lado, dada la especificidad tisular de las FABPs podrían actuar selectivamente sobre los PPARs hecho que puede ser explotado terapéuticamente para promover la selección celular de agonistas de PPARs (Hughes et al., 2015).

2.4. Transporte de proteínas hacia el núcleo.

2.4.1. Generalidades del transporte núcleo-citoplasma.

Una de las características que define a las células eucariotas es la segregación de la síntesis de ácidos nucleicos dentro de un compartimento membranoso, el núcleo. La envoltura nuclear es una doble membrana contigua, que presumiblemente evolucionó a partir del retículo endoplásmico (RE). Se ha sugerido que la unión de las vesículas del RE a la cromatina durante la mitosis puede asegurar una división equilibrada del RE a las dos células hijas. En este sentido, durante la evolución temprana las vesículas del RE comenzaron a fusionarse encerrando la superficie de la cromatina. Sin embargo, el cierre completo sería letal y, por lo tanto, se necesitarían proteínas para mantener los orificios en la envoltura, los cuales poseen un tamaño suficiente para permitir el paso de los ribosomas y las moléculas de ARNs. Si bien estos orificios originalmente no eran más que pasajes abiertos para permitir la difusión, actualmente se definen como los complejos de poros nucleares (NPC del inglés *nuclear pore complex*), y son posiblemente las estructuras proteicas más grandes en las células eucarióticas (Reichelt et al., 1990). Estos complejos involucrados en la compartimentalización celular proveen la posibilidad de la regulación de la importación y exportación de proteínas de una forma altamente controlada.

El NPC está compuesto de múltiples copias de 30 familias de proteínas diferentes, entre las cuales se encuentran más de 400 denominadas nucleoporinas. En vertebrados hay 2.000 a 4.000 NPC por núcleo (Adam S, 2001). El NPC es una gran estructura proteica de aproximadamente 120 MDa en humanos (Doye y Hurt, 1997; Rout et al., 2000; Schwartz, 2016). En el NPC se distinguen un anillo citoplasmático y uno nuclear. Del anillo citoplasmático se proyectan ocho filamentos de carácter proteico hacia el citoplasma. Desde el anillo nuclear se proyectan también ocho filamentos que se unen a un anillo distal proteico, formando la canasta nuclear hacia el nucleoplasma (Ryan y Wentz, 2000, Alberts et al., 2002; Schwartz, 2005; Lim y Fahrenkrog 2006; Alber et al., 2007). Asociado a esta estructura se encuentran las láminas nucleares formadas por filamentos intermedios que se sitúan en la periferia del nucleoplasma en contacto con la cara interna de la envoltura nuclear (Beck y Hurt, 2017). En el interior de la estructura de rueda se ubican regiones ricas en fenilalanina-glicina formando una región hidrofóbica en el canal del NPC (Alber et al., 2007; Terry et al., 2007) y reforzado por repeticiones de glicina-leucina-fenilalanina-glicina de otras nucleoporinas (Lim y Fahrenkrog, 2006).

La estructura del NPC es consistente para permitir el transporte y difusión pasiva de pequeñas moléculas capaces de acomodarse en el canal del NPC, cuyas dimensiones son 9 nm de diámetro y 45 nm de longitud (Keminer y Peters, 1999). Por lo tanto, teóricamente solo aquellas proteínas con un diámetro inferior al del NPC podrían difundirse a través de él en pocos minutos. Sin embargo, se sabe que no es así, por ejemplo, las subunidades ribosomales poseen un diámetro de 25 nm y pueden ser transportadas por el NPC (Doye y Hurt, 1997; Feldherr y Akin, 1997). Este hecho plantea la pregunta y la necesidad de comprender cómo funciona el NPC flexionándose y discriminando las moléculas que se transportan a través de él. Hasta el momento se sabe que para llevar a cabo este proceso colaboran varias proteínas motoras, ATPasas o GTPasas, entre los componentes del NPC.

El tránsito nucleocitoplasmático se ha diversificado funcional y mecanísticamente, sirviendo no solo para permitir la replicación basal, la transcripción y el procesamiento de su maquinaria, sino también en la regulación del ciclo celular, activación y represión de la transcripción, ritmo circadiano, entre otros procesos. La diversificación del transporte nucleocitoplásmico ha evolucionado por una ruta diferente de la tomada para la translocación de iones y pequeñas moléculas a través de las membranas. Para estas moléculas, las células han desarrollado numerosos canales que abarcan la bicapa de la membrana. Sin embargo, se ha visto mediante estudios de microscopía electrónica, la genética de las levaduras y su bioquímica, que los NPC parecen ser idénticos entre sí y permiten el paso de diversos tipos de carga que deben cruzarse entre los compartimentos nuclear y citoplásmico (Dworetzky, et al. 1988; Yang et al., 1998; Rout et al., 2000). La selectividad de este transporte se basa en parte a la estructura del NPC, pero adicionalmente depende de una variedad de proteínas transportadoras solubles. Estas proteínas están diseñadas para reconocer las moléculas destinadas a ser translocadas para permitir este proceso de forma eficiente. Se han logrado rápidos avances en la identificación y el análisis de estos transportadores solubles y de los factores accesorios que ayudan a su función (Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999; Damelin y Silver, 2000; Fahrenkrog et al., 2000; Rout et al., 2000; Macara, 2001).

Por otro lado, la búsqueda de señales específicas que regulan la translocación nuclear surgió de la observación de que ciertas proteínas mayores al tamaño límite apto para el transporte por difusión pasiva (50 kDa), pueden estar presentes en el núcleo. Experimentos clásicos con Nucleoplasmina proporcionaron los primeros indicios de la existencia de una señal de localización nuclear (NLS), y la primer señal descrita para la importación fue identificada en el antígeno T del virus SV40 (Dingwall et al., 1982; Kalderon et al., 1984a). Esta secuencia rica en lisinas (PKKKRK) y la encontrada en nucleoplasmina KRPAATKKAGQAKKKLD (Robbins et al., 1991), son los prototipos de

NLS monopartita y bipartita, y actualmente se sabe que están presentes en muchas proteínas. Estas proteínas que poseen la NLS pueden ser transportadas a través de los poros nucleares dado que pueden ser reconocidas por receptores solubles que llevan a cabo el proceso. Experimentos de fraccionamiento celular permitieron identificar factores solubles que pueden en conjunto con el ATP, reconstituir la importación nuclear (Adam y Gerace, 1991; Moore y Blobel, 1993). Uno de estos factores son las importinas α , (también llamadas karioferina α , Kap α o PTAC58) que pueden unirse directamente a la NLS formando un complejo importina α -carga (Adam y Gerace, 1991; Adam y Adam, 1994; Gorlich et al., 1994; Moroianu et al., 1995). En la importina α , el sitio de unión a la NLS se encuentra en un bolsillo interno recubierto de residuos conservados de triptófanos y asparaginas. Existen dos sitios de unión, uno mayor al cual se pueden unir NLS monopartitas y al otro la región N-terminal de una NLS bipartita (Conti y Kuriyan, 2000). Sin embargo, las importinas α no traspasan el NPC como monómeros, sino que para cumplir su función deben heterodimerizarse con la importina β , y es esta última quien permite la translocación a través del poro (Macara, 2001).

Como característica en común, las importinas tienen la habilidad de unirse a las nucleoporinas. Además, forman complejos con Ran GTPasas para regular la unión de las cargas. Ran es el miembro más abundante dentro de la superfamilia Ras de GTPasas, constituyendo cerca del 0,4% del total de las proteínas celulares (Bischoff y Ponstingl, 1991). Así como otros miembros de esta superfamilia, Ran funciona como un interruptor molecular, el cual cambia de conformación si se encuentra unido a GDP o GTP. La conversión entre estas dos formas es regulada por un factor intercambiador de guaninas (RanGEF) y una proteína activadora de GTPasas (RanGAP) (Bischoff y Ponstingl, 1991; Bischoff et al., 1994; Becker et al., 1995). La clave para entender cómo funciona esta regulación se basa en que RanGEF se encuentra a nivel nuclear y RanGAP en el citoplasma (Hopper et al., 1990). Esta asimetría crea un gradiente de Ran-GTP a través del NPC, y provee la información direccional de la importación y exportación nuclear (Gorlich et al., 1996). Una característica clave de las importinas es que la unión de Ran-GTP y la unión de la carga se excluyen mutuamente, por lo que la carga puede unirse a la importina en el citosol, donde las concentraciones de Ran-GTP probablemente sean muy bajas, y se liberan dentro del núcleo, donde las concentraciones son más altas (Figura 2.5). La afinidad de la importina por Ran-GTP es 10.000 veces mayor que por Ran-GDP, y por lo tanto este interruptor molecular es sumamente eficiente e implica un cambio conformacional en este transportador.

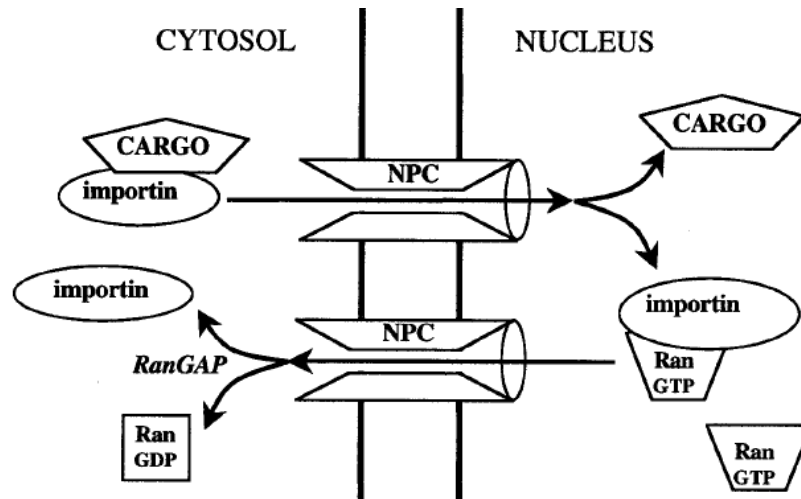


Figura 2.5. Mecanismo de la importación nuclear por la interacción directa con transportadores proteicos. Ran-GTP está presente en altas concentraciones a nivel nuclear, donde promueve el desensamblaje del complejo importina-carga. El complejo formado por importina-Ran-GTP regresa al citoplasma, donde el GTP es hidrolizado, liberándose Ran-GDP. Extraído de Macara, 2001.

A pesar de haberse logrado descifrar algunos de los mecanismos de translocación nuclear, han aparecido varias proteínas que no contienen este tipo de NLS monopartita o bipartita, y pueden ingresar al núcleo mediante mecanismos alternativos o a través de la formación de complejos con otras proteínas que sí las contienen. Varias señales que se apartan de la clásica han sido identificadas (Picard et al., 1987; Michael et al., 1997; Walther et al., 2005). Un ejemplo es la proteína hnRNP1 la cual se ha visto que ingresa por la presencia de una secuencia rica en glicinas y asparaginas denominada M9, la cual no es reconocida por importinas α . Esta secuencia M9 se ha visto que puede ser reconocida por otras proteínas, las transportinas 1 (karioferinas $\beta 2$) que se encuentra relacionada con la importina β (Pollard et al., 1996).

2.4.2. Translocación nuclear de las FABPs.

Se ha detectado por medio de microscopía confocal de células vivas, e inmunomicroscopía confocal y electrónica, la presencia de FABP1 y FABP2 en el núcleo de enterocitos, FABP3 en cardiomiocitos, FABP5 y CRABP-II, en células en cultivo e *in vivo* (Borchers et al., 1989; Hellendie et al., 2000; Budhu y Noy, 2002; Esteves et al., 2016). Si bien es claro que varios miembros de la familia de las FABPs pueden entrar al núcleo, el mecanismo por el cual lo realizan no es tan claro. Se ha manejado la posibilidad que la entrada de las FABPs con su ligando se realice a través del poro nuclear dado que sus tamaños lo permiten (Schroeder et al., 2008). También se ha sugerido que la proteína ingresa sin el ligando y lo une una vez en la matriz nuclear (Schroeder et al., 2008). Por otro lado, si bien estas proteínas no cuentan con la secuencia consenso de localización nuclear en su estructura primaria que sugieran la participación de importinas, se identificó en primer lugar una NLS tridimensional funcional en la proteína

de unión a ácido retinoico II (CRABP-II) formada por los tres residuos básicos K21, R29 y K30 (Sessler y Noy, 2005). Señales muy similares a esta se verificaron experimentalmente para FABP4 y FABP5 compuestas por K21, R30 y K31, y K24, R33 y K34 respectivamente, localizados en la región helicoidal de las proteínas (Ayers et al., 2007, Gillilan et al., 2007; Armstrong et al., 2014). En este sentido se ha propuesto que otras proteínas pertenecientes a las iLBPs podrían contener este tipo de señal (Armstrong et al., 2014) (Figura 2.6). Los autores determinaron además, que la activación es ligando específica en tanto para FABP4 la troglitazona y el ácido linoleico son capaces de activar la señal, y no el ácido oleico. El efecto no activador podría ser específico del modelo celular empleado ya que en otros, el ácido oleico promueve la translocación nuclear de algunas FABPs (Hughes et al., 2015).

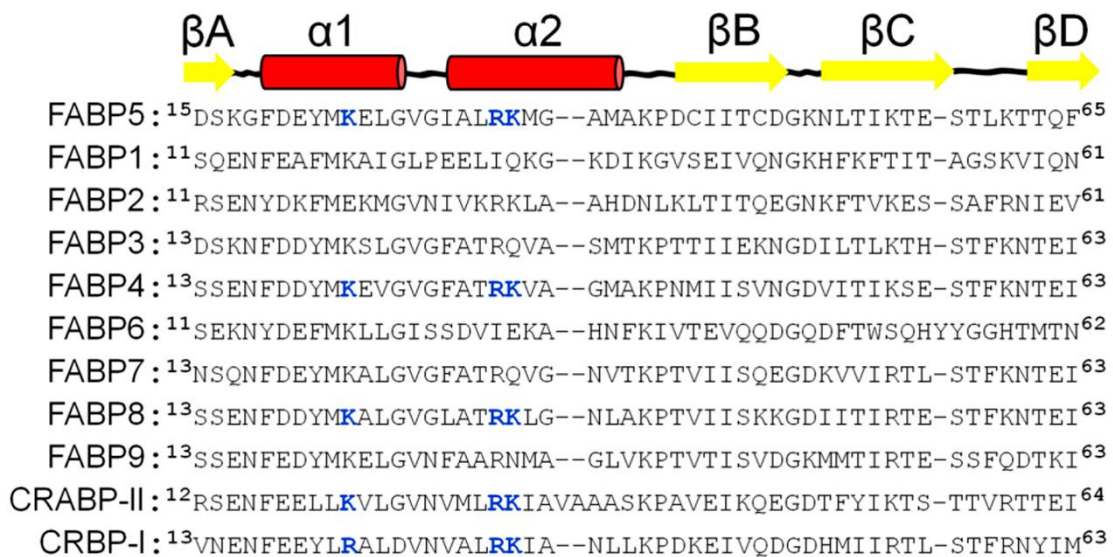


Figura 2.6. Alineamiento de FABP1-9 y CRABP-I y II, posicionados según la estructura secundaria. Se destacan en azul los aminoácidos propuestos para formar la NLS tridimensional. Modificado de Armstrong et al., 2014).

Alineamientos con secuencias de proteínas cuya localización nuclear se ha verificado experimentalmente como FABP1, FABP2 y FABP3, sugieren una señal de este tipo en una región estructuralmente similar. Por otro lado, hay evidencias mediante ensayos de *western blot*, que indican que la relocalización nuclear de FABP1 y FABP2 no tendría lugar a través del sistema importinas por carecer hasta el momento de una la señal consenso, sugiriendo mecanismos independientes a esta vía (Hughes et al., 2015).

2.5. Nuestros modelos experimentales.

2.5.1. El pez cebra como un modelo útil para el estudio del rol de las FABPs en la absorción y transporte de ácidos grasos.

Un organismo modelo es una especie ampliamente estudiada, por lo general debido a que es fácil de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio y tiene ventajas experimentales particulares. Se utilizan para obtener información acerca de otras especies (incluyendo los humanos) que son más difíciles de estudiar directamente. Son ejemplo de ellos *Sacharomices cereviciae*, *Caenorabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus*, y *Rattus norvegicus* entre otras. Por otro lado, los estudios *in vitro* no pueden recrear los mecanismos complejos que regulan los procesos metabólicos *in vivo*, por lo que el empleo de un organismo vivo es invaluable para estudios metabólicos.

Nuestro grupo de investigación ha elegido al pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para el estudio de la FABP1 y FABP2 en la absorción y transporte de ácidos grasos. El optar por este sistema ante otros modelos mamíferos se debe a razones éticas, económicas, biológicas, genéticas y fisiológicas que apoyan esta elección. Un gran cuerpo de evidencia demuestra que el pez cebra puede servir como un "vertebrado canónico" no solo en biología del desarrollo sino también en el estudio de enfermedades humanas (Seth et al., 2013, Santoro et al., 2014, Astone et al., 2017; Yoganantharjah y Gibert, 2017; Danilova et al., 2018; Völkel et al., 2018). El pez cebra posee los mismos órganos digestivos que los humanos. El hígado, el intestino, el páncreas exocrino y endocrino y la vesícula biliar están presentes en él (Stainier et al., 1995). La formación de estos órganos digestivos y los de los vertebrados superiores está controlada por programas de desarrollo similares al de los mamíferos (Pack et al., 1996). La composición celular de los órganos digestivos del pez cebra también es similar a la de los mamíferos, al igual que la morfología de los enterocitos y su composición de organelos. El epitelio intestinal está compuesto por enterocitos, células endocrinas y células caliciformes (Carten y Farber, 2009). La maquinaria vinculada al tránsito de lípidos en el enterocito y el hepatocito está altamente conservada en los metazoarios al igual que la regulación transcripcional de las células intestinales (Schlegel y Gut, 2015; Lickwar et al., 2017).

Notablemente, patologías del pez cebra muestran a menudo trastornos similares a los de enfermedades humanas, haciendo de éste un sistema sobresaliente para estudiar enfermedades hepato biliares, gastrointestinales y pancreáticas (Zhao y Pack, 2017). Por ejemplo, muchas de las características de la enfermedad del hígado graso, que en los humanos es típicamente causado por el síndrome metabólico o el abuso de alcohol, así como diabetes tipo II, inflamación intestinal o síndromes raros como el de

Alagille, son similares en el pez cebra. Varios estudios que involucran alteraciones en el metabolismo lipídico se han realizado utilizando como modelo de estudio el pez cebra, como los trabajos del laboratorio de K.C Sadler (New York University Abu Dhabi) sobre sus estudios acerca de la enfermedad hepática vinculada al alcohol (ADL) (Schlegel, 2012, Vacaru et al., 2014; Howarth et al., 2014; Goessling y Sadler, 2015; DeRossi et al., 2016; Bambino et al., 2018) y los del equipo de S. A. Farber (Carnegie Institution, Department of Embryology, Baltimore, USA) sobre la fisiología y tránsito intracelular de lípidos (Sadler et al., 2013; Anderson et al., 2016; Otis et al., 2017; Quinlivan y Farber, 2017). Muchos ensayos novedosos se han desarrollado y se siguen desarrollando para estudiar las enfermedades humanas en el pez cebra (Yoganantharjah y Gibert, 2017). Vale la pena mencionar además, que la mayoría de los genes de *D. rerio* están conservados en mamíferos, habiéndose identificado un 70% de genes ortólogos (Howe et al., 2013).

El pez cebra se ha utilizado como modelo no mamífero en el rastreo de drogas, moléculas y condiciones fisiológicas que modulan la transcripción de genes vinculados al metabolismo lipídico, la síntesis de lipoproteínas y la acumulación de gotas lipídicas en el enterocito (Farber et al., 2001; Marza et al., 2005; Anderson et al., 2011; Sadler et al., 2013; Seth et al., 2013; Santoro, 2014; Schlegel et al., 2015). Además, este organismo constituye un modelo óptimo para el estudio de las condiciones de los síndromes humanos de absorción deficiente o la distribución de drogas lipofílicas desde la luz intestinal al sistema circulatorio. La mucosa intestinal es un sistema muy atractivo para evaluar el destino intracelular de los ácidos grasos exógenos. Entre los candidatos a transportar los ácidos grasos en los enterocitos de *Danio rerio* se encuentran la FABP de tipo intestinal (Fabp2¹), la de tipo hepático (Fabp1) y la de tipo ileal (Fabp6).

El patrón de expresión cefalocaudal de las FABPs en el intestino de los mamíferos se conserva a través de la evolución (André et al., 2000; Haunerland y Spener, 2004; Venkatachalam et al., 2013; Gajda y Storch, 2015). Este patrón se conserva notablemente en el pez cebra, en el que el dominio de expresión de *fabp1* y *fabp2* se restringe al intestino anterior, mientras que los transcritos de *fabp6* se encuentran en el intestino posterior (Levy et al., 2009; Domenichiello et al., 2015). Las secuencias reguladoras en cis que dirigen la expresión *fabp2* están conservados en el pez cebra y mamíferos (Her et al., 2004). Es de destacar que las proteínas FABP1 y FABP2 humanas presentan una similitud del 88% y 90% en su estructura primaria, respectivamente con las de *D. rerio*.

¹ la nomenclatura que se emplea para nombrar las proteínas del pez cebra es la definida para esta especie y difiere de la empleada en otros vertebrados (primera letra mayúscula y las restantes minúsculas).

Resultados recientes de nuestro grupo de investigación han demostrado que tanto Fabp2 como Fabp1 se localizan en el núcleo del enterocito de *Danio rerio*, sugiriendo por primera vez a través de estudios *in vivo* con análogos de ácidos grasos, que estas proteínas serían las responsables de la translocación nuclear de ácidos grasos ingeridos con la dieta (Esteves et al., 2016). Nuestra elección en este modelo no sólo se basa en las numerosas publicaciones que apoyan el uso de *D.rerio* mencionadas anteriormente, su fácil mantenimiento en menor espacio y a menor costo que otros vertebrados, junto con razones éticas, y económicas sino que por la experiencia y las herramientas moleculares que el equipo de investigación ha generado durante el trabajo con este modelo (Canclini, 2010; Suárez, 2015; Esteves et al., 2016).

2.5.2. Caco-2 como modelo celular.

En la década del 70, varias líneas celulares fueron establecidas a partir de tumores gastrointestinales con el propósito de estudiar los mecanismos del desarrollo del cáncer y los efectos de la citoterapia. En parte, debido a la heterogeneidad de las células epiteliales intestinales primarias tanto en morfología como en función, es decir, enterocitos del intestino delgado, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth y células M, era necesario diferenciar las células tumorales en tipos de células más especializadas. Varias de estas líneas celulares pudieron ser parcialmente diferenciadas por adición de factores sintéticos o biológicos en los medios de cultivos. Una de las líneas establecidas, Caco-2, fue la única en diferenciarse espontáneamente al alcanzar la confluencia celular. Caco-2 (Cancer coli-2) fue obtenida a partir de un paciente con adenocarcinoma colorrectal por Jorgen Fogh en el Instituto de Investigaciones de Cáncer Sloan-Kettering (Fogh et al., 1977).

Los primeros estudios revelaron que las células Caco-2 expresan propiedades morfológicas y funcionales características de enterocitos del intestino delgado. Cuando los cultivos alcanzan la confluencia, las células comienzan a polarizarse adquiriendo el borde en cepillo con las microvellosidades. Además, se forman las uniones estrechas entre células adyacentes, y comienzan a expresar enzimas típicas de los enterocitos como N-aminopeptidasas, sucralosa-isomaltasa y dipeptidilpeptidasa IV. Sin embargo, también se encuentran presentes en las células Caco-2 distintos marcadores colonocíticos (Engle et al., 1998).

Desde el establecimiento de esta línea celular, su uso se ha propagado en un gran número de laboratorios alrededor del mundo. Según las diferentes condiciones de cultivo y números de pasaje, las células Caco-2 adquieren diferentes propiedades. La expresión de diferentes marcadores típicos de los enterocitos, cambian con el incremento del número de pasajes (Artursson et al., 2001). Además, parámetros como

la resistencia transepitelial (TEER) y la tasa de proliferación también se ha reportado que aumentan con el número de pasaje (Briske Andersson et al., 1997). Se ha documentado que, debido al pasaje tardío, estas células pueden comenzar a crecer en multicapas, fenómeno que afecta las medidas de TEER, y hacer comparaciones con resultados basados en células en pasajes tempranos puede ser difícil.

Las células Caco-2 se diferencian espontáneamente expresando características morfológicas (epitelio columnar polarizado) y funcionales de enterocito maduros. Los cultivos de Caco-2 polarizados muestran valores de resistencia transepitelial (TEER) cuatro veces mayores comparados con las monocapas de HT29. Además, esta línea expresa mayor cantidad de receptores, transportadores, y enzimas metabólicas como aminopeptidasas, esterasas y sulfatasas, las cuales se encuentran en el epitelio normal. A pesar de esto, recientes estudios sugieren que existen variaciones entre los perfiles de expresión génica entre las líneas celulares transformadas como Caco-2 o HT29 y las células del tejido normal. Además, inesperadamente también se han encontrado diferencias en los perfiles de expresión génica entre las líneas celulares Caco-2 y HT29 (Bourgine J, et al. 2012).

Frecuentemente, con el propósito de mimetizar las condiciones estéricas de un cultivo *in vivo*, las células Caco-2 pueden ser cultivadas sobre filtros permeables. Este tipo de cultivo ayuda a mejorar su morfología y diferenciación funcional. Se ha documentado que las monocapas polarizadas de Caco-2 representan una correlación fiable para estudios de absorción de drogas y otros compuestos después de la captura en humanos. Varios estudios han comparado los coeficientes de permeabilidad de Caco-2 con datos de absorción en humanos y se encontró una alta correlación, particularmente si los compuestos son internalizados por mecanismos de transporte celulares pasivos (Artursson y Karlsson, 1991; Cheng et al., 2008; Sun et al., 2008).

El epitelio intestinal normal se compone de varios tipos de células, y las diferencias en los perfiles de expresión génica no solo se observan en el epitelio de la mucosa a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, sino también a lo largo del eje de la cripta-vellosidad (Anderle et al., 2005). Por lo tanto, es claro que los datos obtenidos por análisis *in vitro* en el modelo celular Caco-2 pueden no ser directamente comparables con la situación *in vivo*. Aun así, este modelo de epitelio intestinal posee varias ventajas como la simplicidad y reproducibilidad permitiendo la comparación de resultados interlaboratorio.

Los análisis en cultivos celulares ofrecen una alta variedad de nuevas posibilidades en distintas disciplinas científicas. Particularmente las células Caco-2 proveen información sobre las bases biológicas y bioquímicas de la barrera de la mucosa intestinal, pero también pueden ser utilizadas para descifrar información valiosa sobre la absorción de medicamentos y componentes dietéticos relevantes para la industria farmacéutica y alimentaria. Por este motivo, esta línea celular ha sido ampliamente

utilizada en distintas aplicaciones como: el estudio de mecanismos y efectos de la microbiota, digestión de alimentos en la función de la barrera del epitelio intestinal (Shimizu M, 2010), elucidar vías de señalización involucradas en el transporte de drogas u otros componentes alimenticios (Knipp et al., 1997), entre otros.

La expresión de las FABPs intestinales en las células Caco-2 depende de su estado de diferenciación. La FABP1 se expresa en pequeñas cantidades, pero a medida que se diferencian su expresión aumenta significativamente (Trotter y Storch, 1991). En cuanto a FABP2 su nivel de expresión es casi indetectable sin ser influenciado por su estado de diferenciación (Rodríguez Sawicki et al., 2017). Esta línea celular tanto en su estado diferenciado como indiferenciado, ha sido utilizada en numerosos estudios en lo que respecta a la investigación sobre FABPs y su rol en el metabolismo lipídico (Trotter y Storch, 1991; Baier et al., 1996; Dube et al., 2001; Poirier et al., 2001; Rodríguez Sawicki et al., 2017). Se ha observado, que en cultivos de células Caco-2 suplementadas con benzafibrato, agonista de PPAR α , aumenta la expresión de genes vinculados con la oxidación de ácidos grasos (Kimura et al., 2011), evidenciando la importancia de este tipo de receptores en el metabolismo lipídico y su relación con las FABPs. Particularmente en ensayos de transactivación en esta línea celular en su estado indiferenciado, se ha estudiado el nivel de transcripción de FABP1 dependiente de la activación de PPAR α , δ y γ (Poirier et al., 2001). Además, se ha evidenciado que FABP2 participa en la síntesis de triacilglicéridos y fosfolípidos (Levy et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Contribuir en la comprensión de las funciones de las proteínas intestinales, utilizando como modelo de estudio el pez cebra (*Danio rerio*). Particularmente nos centraremos en el análisis de los mecanismos moleculares que permiten el ingreso al núcleo de Fabp2, y como cambia su expresión en respuesta a la dieta.

3.2. Objetivos Específicos.

- Realizar la búsqueda *in silico* de una señal de localización nuclear (NLS) tridimensional en Fabp2 de *D. rerio*.
- Determinar *in vitro* la existencia de una NLS en Fabp2 utilizando cultivos de la línea celular Caco-2.
- Determinar el efecto del ácido oleico y el ácido palmítico sobre la localización celular de Fabp2 y mutantes.
- Expresar y purificar la proteína Fabp2 y los mutantes generados recombinantes.
- Determinar si se produjeron cambios estructurales y funcionales relevantes en las proteínas mutantes.
- Estudiar *in vivo* el efecto de una dieta alta en contenido graso sobre la expresión del gen de *fabp2*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Modelado por homología de Fabp2

Se realizaron modelos por homología reemplazando las cadenas laterales de Fabp2 de *Danio rerio* por las de FABP2 de *Rattus norvegicus* sin ligando (Protein Data Bank ID 1IFC) y unida a ácido palmítico (Protein Data Bank ID 2IFB); y de *Homo sapiens* unida a ácido oleico (Protein Data Bank ID 2MO5). La identidad de secuencia observada entre Fabp2 de *D. rerio* y FABP2 de *R. norvegicus* y *H. sapiens* corresponde a 67.2 y 66.9% respectivamente, por lo cual son aptos para realizar el modelado por homología. Todos los modelos se realizaron en la plataforma online SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Las imágenes mostradas y las superposiciones de estructuras se generaron en el software Swiss PDB View v4.1.

4.2. Mutagénesis dirigida sobre *fabp2*.

De acuerdo a la bibliografía, las proteínas de esta familia podrían tener una señal de localización nuclear tridimensional, conformada por residuos básicos localizados en las hélices de las proteínas. En base a ello seleccionamos una serie de residuos como posibles integrantes de dicha señal, así como varias combinaciones de ellos que incluyen K17, K28, R29 y K30.

Los codones que codifican para los aminoácidos K17, R29 y K30 fueron sustituidos por codones que codifican para Alaninas empleando el kit “QuickChange II Site Directed Mutagenesis kit” (Agilent Technologies). La mutagénesis se realizó mediante dos reacciones sucesivas de PCR en las cuales primero se mutó el codón que codifica para Lisina en la posición 17 (K → A) y posteriormente se mutaron los correspondientes a Arginina 29 (R → A) y Lisina 30 (K → A). Como molde para las reacciones se utilizó el constructo *fabp2*wt-pET5a (Esteves et al., 2016). La primera reacción se llevó a cabo utilizando 45 ng de *fabp2*-pET5a, 125 ng de oligonucleótidos *forward* (5'-GCACGCAATGAGAACTACGAGGCCTTCATGGAACAAATGGGCGTC-3') y *reverse* (5'-GACGCCCATTTGTTCCATGAAGGCCTCGTAGTTCTCATTGCGGTC-3'), dNTPs (10 mM) y 2.5 U de *PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase* (2.5 UE/μL), en un volumen total de reacción de 50 μL. El procedimiento utilizado incluyó un primer paso de activación a 95°C por 30 segundos seguido de 16 ciclos de 95°C durante 30 segundos para la desnaturalización, 55°C por 1 minuto para el *annealing* y 68°C durante 5.5 minutos para la extensión. Asimismo, se realizó la reacción de mutagénesis control que recomienda el kit para verificar su efectividad siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron utilizados para transformar mediante *heat shock* células quimiocompetentes de la cepa DH5α de *E. coli*. Las células fueron sembradas en placas conteniendo LB-agar con 100 μg/mL de ampicilina (resistencia que le confiere el vector

pET5a) y crecidas durante 16 horas a 37°C. En particular para la reacción control de la mutagénesis que utiliza el plásmido pWhitescript, se suplementó el medio de cultivo con 50 µg/ml de X-gal y 1 mM de IPTG.

Se seleccionaron 10 colonias y se inocularon en medio líquido LB conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron durante 16 horas a 37°C y 200 rpm. Se purificó el ADN plasmídico mediante el uso del PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). La eficiencia de la mutagénesis fue determinada mediante secuenciación de dichos ADN confirmando la presencia de *fabp2*^{17K/A}-pET5a.

El plásmido conteniendo la mutación adecuada fue utilizado como molde para la segunda reacción de mutagénesis. En este caso la secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue:

5'-
GAACAAATGGGCGTCAACATGGTGAAAGCCGCCCTGGCTGCCCATGACAACCTG-3'

(forward) y 5'-
CAGGTTGTCATGGGCAGCCAGGGCGGCTTTCACCATGTTGACGCCCATTTGTTC-3' (reverse).

La reacción de PCR se realizó como se describió previamente a excepción de que se realizaron 18 ciclos en vez de 16 por tratarse de la sustitución de más de un aminoácido. Nuevamente la eficiencia de la mutagénesis fue determinada mediante secuenciación confirmando la presencia de *fabp2*^{17K/A²⁹R/A³⁰K/A}-pET5a.

Posteriormente se propuso la generación de otros mutantes de NLS. Para ello se realizaron distintas combinaciones de los posibles aminoácidos que podrían estar involucrados en dicha señal. Se generó un mutante por sustitución nucleotídica de los codones que codifican a K17, K28 y R29 nuevamente por Alaninas. Para ellos se utilizó como molde de la reacción de mutagénesis el plásmido verificado previamente denominado *fabp2*^{17K/A}-pET5a utilizando los oligonucleótidos *forward* 5'-GAACAAATGGGCGTCAACATGGTGCCGCCAAACTGGCTGCCCATGACAACCTG-3' y *reverse* 5'-CAGGTTGTCATGGGCAGCCAGTTTGGCGCCACCATGTTGACGCCCATTTGTTC-3' siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se verificó por secuenciación obteniéndose el plásmido *fabp2*^{17K/A²⁸K/A²⁹R/A}-pET5a.

En el caso del mutante por sustitución nucleotídica de K28 y R29 por alaninas se utilizó como molde para la reacción de mutagénesis el constructo original *fabp2*^{wt}-pET5a y los oligonucleótidos descritos previamente como segunda reacción del *fabp2*^{17K/A²⁸K/A²⁹R/A}-pET5a. Finalmente se verificó por secuenciación la efectividad de la mutagénesis obteniéndose el plásmido *fabp2*^{28K/A²⁹R/A}-pET5a.

4.3. Clonado de *fabp2* y mutantes en pCDNA3-EGFP y purificación de plásmidos para ensayos de cultivo celular

Se clonaron en el vector pCDNA3-EGFP (Addgene) las regiones codificantes tanto de *fabp2* de *D. rerio* en su forma salvaje así como las variantes generadas previamente. Este vector permite clonar regiones codificantes cuyo producto proteico resultará una proteína de fusión a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) hacia el extremo carboxilo terminal (Figura 4.1). Para la construcción de dichos plásmidos optamos por la adición de una región *linker* de cuatro repeticiones de los aminoácidos glicina-alanina entre la región codificante de *fabp2* (tanto la salvaje como las mutadas) y la de *egfp* para otorgarle flexibilidad a la unión y permitir el plegado independiente de cada proteína.

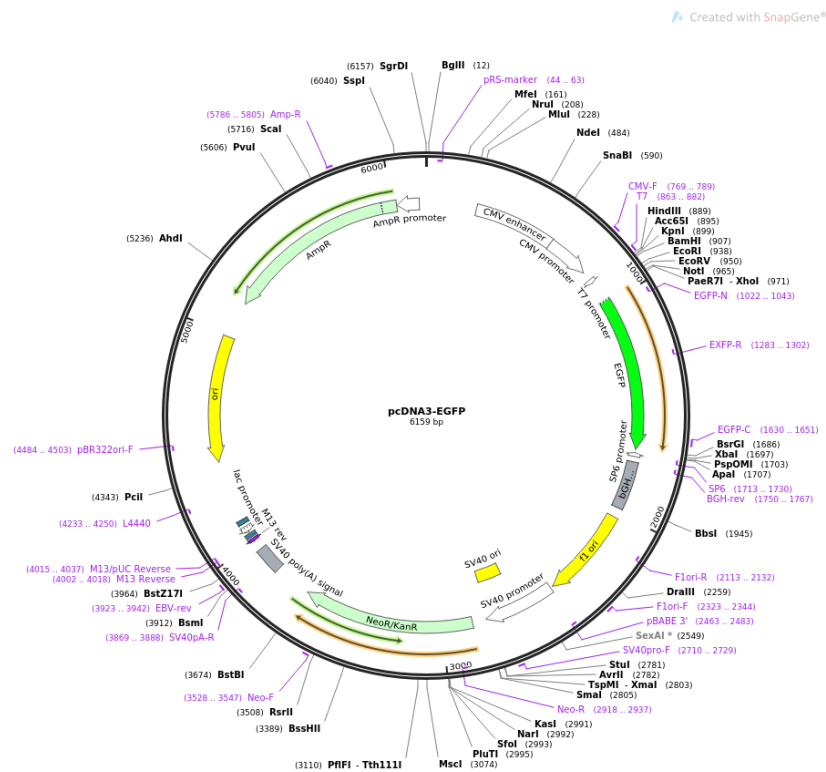


Figura 4.1. Esquema del vector pCDNA3-EGFP (Addgene).

Para todas las variantes de *fabp2* el clonado se realizó entre los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *XhoI* que se encuentran en el sitio múltiple de clonado del vector. Para ello se utilizaron oligonucleótidos *forward* que contenían en su extremo 5' nucleótidos adicionales que constituyen la secuencia blanco de la enzima *BamHI*. Los oligonucleótidos *reverse* se diseñaron de manera que contuviesen nucleótidos adicionales su extremo 5' que contiene la secuencia GCCGC por repetición cuatro veces, seguida de la secuencia reconocida por la enzima *XhoI*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, conteniendo dNTPs una concentración final de 0.3 mM para cada dNTP, oligonucleótidos *forward* y *reverse* a una concentración final de 0.3 μ M cada uno, 0.5 U de KAPA HiFi DNA Polymerase

(Biosystems) en el *buffer* adecuado conteniendo 2 mM de MgCl₂ y 10 ng de ADN molde. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-CCG**GGATCC**ATGACCTTCAACGGGACCTGG-3' (*forward*) y 5'-CCG**CTCGAG**GCCGCGCCGCGCCGCGCCGCGCAGCCCTTGAAAATCCTCT-3' (*reverse*). Las letras en negrita marcan la secuencia blanco de las enzimas *Bam*HI (GGATCC) y *Xho*I (CTCGAG) utilizadas en el posterior clonado de los fragmentos amplificados. La región subrayada del oligonucleótido *reverse* representa la región *linker*. La reacción de PCR consistió en una primera etapa de activación a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos para desnaturalización, 62°C por 30 segundos para el *annealing* y 72°C por 30 segundos. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 3 minutos. Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, en *buffer* TAE 1X y visualizados mediante tinción con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) observados utilizando el equipo FastGene Gelpic LED Box (Genetics). Dichos fragmentos fueron extraídos del gel de agarosa 1% para ser purificados utilizando el Universal DNA Purification Kit (TIANGEN). Los fragmentos purificados fueron ligados en el vector pCR-blunt (Invitrogen), que ya se encuentra de forma lineal y con los extremos romos adecuados para clonar los fragmentos generados por la Taq polimerasa empleada. Este vector posee el gen *ccdB* fusionado con el extremo C-terminal del LacZ α , el cual es letal para las células, ya que interacciona con las ADN girasas bacterianas involucradas en el correcto superenrollamiento del ADN. La ligación del fragmento de PCR al vector, interrumpe esta construcción LacZ α *ccdB*, impidiendo la expresión del gen letal, y por lo tanto esto asegura que sólo sean viables aquellas células que poseen el inserto. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 sembradas en placas de LB-agar con 50 μ g/mL de Kanamicina incubándose durante 16 horas a 37°C.

Posteriormente se seleccionaron varias colonias para su análisis. Cada una de ellas fue inoculada en medio líquido LB con dicho antibiótico cultivándose en agitación por 16 horas a 37°C y 200 rpm. Estos cultivos se utilizaron para la purificación de ADN plasmídico mediante miniprep alcalina (ver anexo). Posteriormente se confirmó la inserción del fragmento de interés mediante PCR utilizando los oligonucleótidos descritos previamente analizando los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1%. Una vez confirmada la presencia del inserto se sometieron los plásmidos generados, así como también el plásmido comercial pCDNA3-EGFP a la doble digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI (New England, Biolabs) y *Xho*I (Invitrogen). La digestión se realizó en dos pasos separados dado los diferentes *buffers* que utilizan ambas enzimas. En primer lugar, se realizó la digestión con *Bam*HI durante 1 hora a 37°C, se analizó en gel de agarosa 1% y se purificó el plásmido lineal mediante el Universal DNA Purification Kit (TIANGEN). Posteriormente se realizó la digestión con *Xho*I durante 1 hora a 37°C. Los plásmidos sometidos a la doble digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y el inserto y el vector digeridos fueron escindidos y purificados del gel teñido con SYBR Safe, utilizando el kit comercial ya mencionado.

Para la ligación se utilizó la ligasa T4 (Thermo Scientific) en las siguientes cantidades: 36,5 ng de inserto, 50 ng de vector, 1 μ L de T4 ligasa y 2 μ L del *buffer* de ligasa en un volumen final de 20 μ L. Se utilizó una relación inserto:vector de 10:1 moléculas de cada uno. La mezcla se dejó toda la noche a 4°C. La reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α competentes. A continuación, se realizaron cultivos en medio líquido de algunas colonias, y se confirmó la presencia de cada inserto mediante PCR empleando como molde el ADN plasmídico y posterior secuenciación, utilizando el servicio de Macrogen. Finalmente, se realizó la purificación de los plásmidos a mediana escala mediante el PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen), utilizando cultivos de 50 mL crecidos 16 horas a 37°C a 200 rpm. La concentración de los plásmidos fue determinada mediante el NanoDrop LITE Spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.4. Ensayos de cultivo celular

4.4.1. Cultivo de células Caco-2

En primer lugar se pusieron a punto las condiciones para el cultivo en monocapa de células Caco-2 para los ensayos de transfección. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable bajo la dirección del Dr. Gustavo Folle y la Dra. Lucía Canclini. Las células fueron cedidas por la Dra. Mariela Bolatti de la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo.

En base a la bibliografía consultada para la línea celular Caco2 se optó por utilizar como medio de cultivo DMEM *High Glucose* (Capricorn) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Capricorn), penicilina 100 U/mL y estreptomina 125 μ g/mL. Como medio de congelamiento para preservar la línea celular se utilizó 90% de suero fetal bovino y 10% DMSO en ampollas crio-resistentes, tanto en freezer -80°C como en nitrógeno líquido.

4.4.2. Transfección en cultivos de células Caco-2

Todos los ensayos de transfección fueron realizados en placas de 24 pocillos sobre vidrios de 16 mm² colocados en el fondo del pocillo para facilitar la posterior fijación y tinción. Se utilizó el método de lípidos catiónicos Lipofectamina[®]. Se evaluaron distintas condiciones, variando tiempos de cultivo (24 y 48 horas) y el número de células por pocillo (1×10^5 y 2×10^5). Además, se utilizó distintas cantidades de Lipofectamina (Invitrogen) recomendadas por el fabricante, siendo éstas 0.75, 1.25 y 1.75 μ L, y cantidades variables de ADN plasmídico a transfectar. También se probaron distintos tiempos de incubación luego de la transfección (24, 48 y 72 horas) hasta el fijado de las

células. Finalmente se optó por utilizar un cultivo de 24 horas con 1×10^5 células por pocillo, utilizando 1 μg de ADN, 1.25 μL de Lipofectamina (LTX) y 48 horas de incubación luego de la transfección.

La transfección se llevó a cabo incubando durante 25 minutos a temperatura ambiente 100 μL de medio de cultivo Opti-MEM, 2 μL de PLUS™ Reagent, 1.25 μL de LTX y 1 μg de plásmido. Paralelamente, se lavaron suavemente cultivos en monocapa de 24 horas con PBS y se agregó 500 μL de medio de cultivo completo (DMEM *High Glucose* 10 % SFB) sin antibiótico. Transcurrido el tiempo de incubación de la mezcla previa, se agregó al cultivo 100 μL de la misma, y se incubó en estufa de cultivo a 37°C por 48 horas.

Como control negativo se realizó el ensayo en las mismas condiciones mencionadas pero sin el agregado de ADN, y como control positivo se transfectó con el plásmido pCDNA3-EGFP sin inserto.

Las células transfectadas se lavaron con PBS a 37°C y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS en agitación y finalmente un último lavado con DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluido en PBS. Posteriormente los vidrios con la monocapa celular se retiraron de los pocillos y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje ProLong Gold Antifade (Invitrogen).

Cada experimento se realizó por duplicado y fueron visualizados mediante microscopía confocal utilizando los equipos Olympus BX61-Fluoview FV300 y Zeiss LSM 800. A partir de las imágenes capturadas se realizó la cuantificación de la relación núcleo/citoplasma de 30 células individuales transfectadas para cada condición, utilizando el software Fiji (Image J). Finalmente se realizó el análisis estadístico mediante el test t de Student para medias independientes.

4.4.3. Preparación y ensayos de ácidos grasos para cultivo celular.

Se realizaron ensayos de transfección en los cuales se suplementaron las células transfectadas con ácido oleico-seroalbúmina bovina (OA-BSA) (Sigma O3008) y con ácido palmítico-seroalbúmina bovina (PA-BSA) generado a partir de ácido palmítico (Sigma P5585). Para la solubilización y conjugación del ácido palmítico con BSA se utilizó un protocolo modificado del reportado por Seti et al., 2009. El protocolo consistió en preparar 1 mL de una solución 10 mM de ácido palmítico en etanol absoluto por pesada directa y una vez solubilizado agregar 1 mL de NaOH 10 mM en PBS. A continuación, se evaporó el etanol utilizando el Savant SpeedVac SC100. Posteriormente se agregó BSA (Sigma A7030) en concentración final 100 mg/mL y se homogeneizó. Finalmente, la solución preparada 10 mM de PA-BSA se desgaseó con nitrógeno para evitar la oxidación de los ácidos grasos.

Tanto OA-BSA como PA-BSA fueron utilizados como suplemento en cultivos de células Caco-2 transfectadas con los plásmidos conteniendo *fabp2* tanto en su forma salvaje como para los mutantes generados. Los ácidos grasos se utilizaron en una concentración final de 10 μ M. La transfección se realizó como ya se describiera, pero transcurridas las 48 post-transfección se lavaron las células con PBS y se agregó 1 mL de medio de cultivo sin SFB ni antibióticos y 1 μ L de OA-BSA o PA-BSA 10 mM. Se incubaron los cultivos, a 37° C, 5% CO₂ por 24 horas y posteriormente se continuó con la fijación, tinción y visualización como se describió previamente.

4.5. Expresión de Fabp2 salvaje y mutantes recombinantes.

La expresión de las proteínas recombinantes Fabp2wt, Fabp2^{17K/A²⁹R/A³⁰K/A}, Fabp2^{17K/A²⁸K/A²⁹R/A}, Fabp2^{17K/A} y Fabp2^{28K/A²⁹R/A} se realizó utilizando el vector pET5a en el cual se encontraba clonada inicialmente la región codificante de *fabp2*, y sobre el cual se realizaron todas las mutaciones. Los plásmidos fueron utilizados para transformar células *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) Star. Esta cepa posee el gen ARNpol T7 bajo el control del promotor lacUV5. Además, para evitar la degradación de la proteína de interés durante la purificación esta cepa es deficiente en las proteasas lon y ompT. BL21 (DE3) Star es también deficiente en ARNasa E, por lo que los ARNm expresados en esta cepa poseen una vida media mayor. Una vez transformadas las bacterias, se confirmó la presencia de cada inserto mediante PCR usando el plásmido purificado como molde e iniciadores adecuados.

La expresión y purificación de las proteínas se realizó en base a Esteves et al., 2016, con algunas modificaciones dado el grado de pureza requerido para los ensayos posteriores.

Cada clon confirmado de células *E. coli* BL21 (DE3) Star conteniendo cada uno de los plásmidos correspondientes se plaqueó en medio sólido LB-agar con 100 μ g/mL de ampicilina para utilizar como inóculo en la expresión de las proteínas recombinantes. Las colonias crecidas en LB-agar se inocularon 250 mL de ZYM5052 (ver anexo) (Studier et al., 2005) con 100 μ g/mL. El cultivo fue incubado a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 20 horas.

Transcurrido este tiempo se centrifugaron los cultivos a 5000xg a 4°C por 10 minutos para colectar las células, y se congelaron por 16 horas. Se descongelaron y fueron resuspendidas en *buffer* de lisis (Tris-HCl 30 mM pH 8.3, NaCl 500 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 1mM) manteniendo una relación de 5 mL por cada gramo de pellet. A continuación, se realizó la lisis celular mediante sonicación (Sonic Ruptor 250 OMINI INTERNATIONAL) en hielo realizando 3 ciclos de 6 minutos de 50% de pulsos al 50% de amplitud. Posteriormente se realizó una incubación con DNasa y RNasa 20 μ g/mL (Invitrogen) durante una hora a temperatura ambiente en agitación y se centrifugó a 15000xg a 4°C durante 20 minutos para obtener la fracción soluble.

4.6. Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las cinco proteínas recombinantes se realizó mediante 3 pasos: una precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico.

Como primer paso, la fracción soluble resultante de la inducción de las proteínas se precipitó con sulfato de amonio al 30% (ver anexo), durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación. La mezcla se centrifugó a 15000xg y 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante recuperado se precipitó posteriormente con sulfato de amonio al 50% (ver anexo) a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 15000xg y 4°C durante 15 minutos. La fracción soluble recuperada (aproximadamente 20 mL) se dializó con membrana de diálisis (Sigma D9777) contra 2 L de Tris-HCl 30mM pH8.3, a 4°C durante 16 h realizando un cambio a las 8 h. Luego se concentraron las muestras hasta un volumen de 5 mL en membrana de diálisis con polietilenglicol 8000 (Sigma P5413).

La fracción concentrada se sometió a una cromatografía de exclusión molecular. Dicha cromatografía se realizó utilizando una columna de 26 x 600 mm (HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare), con un volumen total de lecho de 320 mL. Tanto la elución como los lavados previos y posteriores se realizaron con bomba peristáltica a un flujo de 1 mL/min. En primer lugar, se lavó la resina con cuatro volúmenes de columna de agua desionizada filtrada, y luego se equilibró con dos volúmenes de Tris-HCl 30mM pH8.3, NaCl 150 mM. Las muestras concentradas fueron filtradas con filtros de acetato de celulosa (Sartorius 11107—45 y 11107—25) así como también la fase móvil. Una vez sembrada la muestra se descartaron los primeros 100 mL para luego coleccionar fracciones de 3 mL utilizando un colector automatizado (Frac-920, GE Healthcare). Todas las fracciones fueron analizadas mediante absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro UV-1800 Shimadzu, y los picos del cromatograma fueron evaluados por electroforesis SDS-PAGE 15% visualizados mediante tinción con Azul Coomassie.

Se verificó mediante electroforesis el grado de pureza de las proteínas recombinantes identificándolas por su masa molecular aparente. A aquellas fracciones que contenían la proteína de interés se les realizó un espectro de absorción en luz ultravioleta en el rango entre 240 y 340 nm y fueron conservadas a -20°C hasta el próximo paso de purificación.

Finalmente se realizó el último paso de purificación mediante una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna HiTrap 5 mL Q XL (GE Healthcare). En este caso se utilizó como fase móvil el *buffer* Tris-HCl 5 mM pH 7. La elución se realizó por gradiente creciente de NaCl. Las fracciones conservadas del paso anterior de purificación se descongelaron y se diluyeron 1/6 para disminuir el NaCl contenido en las muestras y mantener el Tris-HCl a la misma concentración que la fase móvil. Además, se llevó el pH de las muestras a pH 7 por el agregado gota a gota de HCl concentrado monitoreado por pHmetro.

La matriz se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris-HCl pH 7 5mM y se sembró la muestra utilizando bomba peristáltica a un flujo constante de 1 mL/min. Los pasos posteriores se realizaron utilizando el equipo automatizado para cromatografías líquidas ÄKTAprime (GE Healthcare) también a un flujo constante de 1 mL/min. Se lavó la columna con 5 volúmenes de Tris-HCl pH 7 5mM y se comenzó un gradiente de NaCl en 2 pasos: de 0-50% de NaCl en 25 mL, de 50-100% de NaCl en 10 mL. Durante los lavados y elución se colectaron fracciones de 0.75 mL. Aquellas fracciones que correspondieron a los picos visualizados en el cromatograma que devuelve el equipo se evaluaron mediante SDS-PAGE 15% así como también la fracción que no se unió a la matriz y los lavados, verificando la presencia de la proteína de interés por peso molecular. Nuevamente se juntaron las fracciones que contenían la proteína recombinante y se realizaron espectros de absorción en el rango ultravioleta. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su posterior uso.

4.7. Evaluación de la pureza, diálisis y liofilización

Las proteínas purificadas fueron analizadas por dicroísmo circular para evaluar si las mutaciones provocaron cambios conformacionales en las proteínas. Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Mario Ermácora (Universidad de Quilmes, Bs As, Argentina). Para realizar este estudio fue necesario definir el grado de pureza de las proteínas de acuerdo a un criterio definido por el Dr. Ermácora. Para ello se realizó un análisis semicuantitativo mediante electroforesis utilizando diluciones seriadas al décimo partiendo de entre 20 y 30 µg y asumiendo que una proteína deja de detectarse con Azul Coomassie por debajo de 0.1 µg se calcula el porcentaje de cada contaminante como $100 \cdot 0.1 / \mu\text{g}$ de proteína total de la muestra en la que ya no se observa contaminante. Un valor de pureza del 98% (2% de contaminante) o mayor es correcto para realizar dicroísmo circular, dado que los contaminantes significativos que posean alto contenido de residuos aromáticos podrían interferir en los resultados.

Luego de confirmar el nivel de pureza adecuado, se dializaron las proteínas contra agua desionizada dado que el Tris contenido en las muestras interfiere en los ensayos de dicroísmo circular (CD), en particular en el CD lejano. Finalmente, se liofilizaron las muestras para facilitar el transporte a la Universidad Nacional de Quilmes donde se realizaron los estudios de CD.

4.8. Dicroísmo circular de Fabp2 salvaje y mutantes.

Los ensayos de CD se realizaron en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, con la colaboración del Dr. Mario R. Ermácora y la Lic. Pamela Toledo.

Las proteínas liofilizadas se resuspendieron en *buffer* fosfato de sodio 5mM pH 7, NaF 100 mM. Las medidas se realizaron en un espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco Corporation, Japan) a 20°C. Previamente se calibró el equipo siguiendo las recomendaciones del fabricante. El CD lejano se realizó midiendo entre 185 y 235 nm en celda de cuarzo de 0.1 cm y aproximadamente 15 μ M de muestra. Para el CD cercano se escaneó aproximadamente 30 μ M de muestra, en el rango de 250 a 320 nm, en celda de 1.0 cm. La velocidad de escaneo se seteó de 20 nm/min para el CD lejano y 50 nm/min para el CD cercano, con un tiempo de respuesta de 1 s, colectando los datos cada 0.2 nm y 1 nm de ancho de banda. Para cada muestra se tomaron cinco espectros los cuales fueron promediados y suavizados utilizando el polinomio de cuarto grado de Savitzky-Golay. Finalmente, para comparar los espectros de cada proteína, se normalizó por la concentración por cada enlace peptídico para el CD lejano, y la concentración proteica total para el CD cercano.

4.9. Delipidación de Fabps recombinantes.

Para retirar los ligandos hidrófobos unidos a la proteína se realizó una cromatografía de afinidad utilizando Lipidex (Hidroxyalkoxipropil-Dextran, Type VI, Sigma H6258).

La resina (1 gr) se dejó toda la noche con 6 mL de etanol absoluto. Se retiró el exceso de etanol y se agregaron 5 volúmenes de Tris-HCl 30 mM pH 8.2, y NaCl 1M. Se dejó decantar la matriz y se retiró el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 4 veces y en el último lavado se empaquetó la resina en columna. Previo a la delipidación a cada una de las proteínas recombinantes se les aumentó la concentración de NaCl a 1M. A continuación, se agregó la solución de proteína a la resina y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. Las cinco proteínas recombinantes fueron delipidadas en paralelo utilizando distintas columnas.

Transcurrida la incubación, se eluyó cada proteína por gravedad y se conservó a -20°C. Se realizó una segunda elución por el agregado de 1 volumen de columna de *buffer* Tris-HCl 30 mM pH 8.2 NaCl 1M y nuevamente se guardó a -20°C.

El producto final se dializó contra Tris-HCl 30 mM pH 8.3, para retirar el NaCl de la muestra. Se empleó membrana de diálisis con un punto de corte de 14 kDa (Sigma D9777). La dosificación de las proteínas delipidadas se realizó mediante absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción molar teórico.

4.10. Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16 de Fabp2 salvaje y mutantes.

Con el objetivo de evaluar las propiedades de unión de las cinco Fabp2 producidas se realizaron ensayos de unión empleando el ligando fluorescente BODIPY FL C16 (Invitrogen). La solución stock de BODIPY FL C16 1mM se preparó en DMSO, a partir de la cual se realizó la solución de trabajo 3 μ M. Se realizaron espectros de absorción y emisión del BODIPY FL C16 diluido en etanol y *buffer* Tris 30 mM pH 8.3. El mismo *buffer* se utilizó en los ensayos con proteínas. A partir de éstos, se obtuvo las longitudes máximas de excitación y emisión adecuados para las condiciones de trabajo. Los ensayos de unión se realizaron en un espectrofluorímetro Chronos FD Fluorescence Lifetime Spectrometer a 25°C en oscuridad en celda de cuarzo, esperando 2 minutos entre cada medida. Para el diseño del ensayo se utilizó una concentración final fija de proteína 0.5 μ M, y BODIPY FL C16 en concentraciones variables crecientes de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 0.7 y 1 μ M.

Todas las medidas se realizaron en duplicado en 300 μ L de volumen final. Los datos se analizaron realizando curvas de saturación de las proteínas. Las curvas de cada proteína fueron corregidas por el valor de intensidad de fluorescencia correspondiente a la emisión del BODIPY FL C16 en *buffer* (ver anexo).

4.11. Ensayos de expresión de *fabp2* in vivo.

4.11.1. Cría de peces

Se utilizaron peces cebra adultos salvajes de la línea TAB-5, cedidos por el Instituto Pasteur de Montevideo. Durante la realización del experimento se mantuvieron en peceras termostatzadas de 25 L con agua mili Ro aireada, suplementada con 0.5 mL/L de una solución stock de 80 g/L de sales marinas. El pH y la conductividad se mantienen constantes en el rango de 6.5 - 7 y 200 - 250 μ S/cm² respectivamente. La temperatura de las peceras se mantuvo constante a 27°C bajo un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas.

4.11.2. Obtención de muestras para estudios de expresión

Se emplearon peces cebra adultos sacrificados luego de media hora, una hora y media, tres, cuatro, seis y diez horas de alimentados. El grupo control se mantuvo 24 horas sin comer (no alimentados). El resto de los grupos se mantuvieron 24 horas sin comer y luego alimentados con yema de huevo seca en polvo, durante el tiempo indicado. Se emplearon grupos de 5 peces por grupo.

Los peces se sacrificaron de acuerdo con el protocolo aprobado por la CHEA N° 240011-000984-17 “Sacrificio y posterior disección de intestino de pez cebra adulto para estudios de absorción lipídica” diseccionando el intestino anterior. Los intestinos fueron homogeneizados en Trizol y mantenidos a -80°C hasta su uso.

4.11.3. Extracción de ARN de muestras de intestino anterior de *Danio rerio*.

Se aisló ARN total de 5 intestinos anteriores para cada condición utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los 5 intestinos de cada condición fueron resuspendidos en 1 mL de Trizol y se realizó la lisis mecánica con homogenizador para eppendorfs (Pellet Pestle Sigma). Se agregó cloroformo con lo cual se forma una mezcla capaz de ser separada por centrifugación en dos fases, acuosa y orgánica. Se aisló la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol. Finalmente se lavó el ARN con etanol 75% y se solubilizó en H₂O libre de nucleasas.

Posteriormente se digirió con DNAsa (RQ1 RNasa Free Promega), incluyendo un inhibidor de RNasas (RNase OUT, Invitrogen) y se incubó 1 hora a 37°C. A continuación, se agregó agua y fenol, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa donde se encontraba el ARN. El mismo se precipitó con acetato de sodio 3 M y etanol y se dejó durante 16 horas a -20°C. Finalmente se centrifugó, se lavó el precipitado con etanol y se resuspendió en 10 µL de H₂O libre de nucleasas.

Una vez obtenido los ARNs se analizaron por electroforesis en agarosa 1% utilizando todos los reactivos libres de nucleasas y los materiales tratados con agua DEPC.

4.11.4. Retrotranscripción de ARN mensajero

Para generar el ADN copia (cDNA) se realizó la retrotranscripción del ARN utilizando oligonucleótidos de deoxy-timidina (oligo dT), y transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen). Para ello, 5 µg de ARN molde fue incubado durante 5 minutos a 65 °C con 50 ng de oligo dT, 1 µL de dNTPs 10 mM y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 13 µL. Luego se agregaron 4 µL de *buffer* de reacción 5x *First-Strand Buffer* para la transcriptasa reversa Superscript III, 1 µL de DTT 0.1 M, 1 µL del inhibidor RNaseOUT, y 1 µL de la enzima (200 unidades enzimáticas). La mezcla se incubó durante 50 minutos a 50°C. A continuación, se inactivó la enzima por calor incubando por 15 minutos a 70°C. Finalmente se agregó 1 µL de RNasa H para la degradación del ARN utilizado como molde.

4.11.5. PCR en tiempo real

Para evaluar los niveles de *fabp2* bajo las distintas condiciones alimentarias se realizó una cuantificación relativa por PCR en tiempo real (qPCR). Para cada condición se realizaron 3 réplicas técnicas. Se empleó el gen del Factor de elongación 1 α (*eef1a1*) como normalizador (*housekeeping*).

Fueron empleados 25 ng de cDNA de cada condición, como molde para amplificar los genes seleccionados en la reacción de qPCR utilizando un par específico de cebadores para cada gen. Todas las determinaciones se hicieron utilizando SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit (Bioline). Este kit contiene la sonda fluorescente SYBR Green, *hot start* DNA polimerasa, el *buffer* específico y los dNTPs necesarios para la reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10 μ L, conteniendo los cebadores en una concentración final de 0.4 μ M. El primer paso de la reacción es una incubación a 95°C durante 2 minutos para activar la polimerasa, y luego 40 ciclos a 95°C por 5 segundos para desnaturalizar el cDNA molde, 62°C durante 15 segundos para la hibridación de los cebadores y 60°C durante 15 segundos para la extensión. La elección de la temperatura de hibridación debió ponerse a punto para aumentar la especificidad de los cebadores.

Debido a que se utilizó la química SYBR Green como sistema de detección, fue posible realizar curvas de disociación de los amplicones generados para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Los datos obtenidos fueron procesados en una primera instancia con el Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST software versión 2.0.4.

Los cebadores específicos fueron diseñados con la herramienta online Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 4.1). Se generaron cebadores específicos para *fabp2* y como normalizador el gen *eef1a1*, cuya eficacia fue comprobada previamente (Esteves et al., 2016).

Se realizaron las curvas estándar y se calcularon las eficiencias (ver anexo) para cada par de cebadores utilizando como molde cDNA para el gen *eef1a1* y el plásmido *fabp2*-pET5a para la amplificación de *fabp2*. Las concentraciones ensayadas se realizaron por diluciones seriadas al cuarto, a partir de 35 ng.

Tabla 4.1. Cebadores empleados en ensayos de qPCR. Fw: *forward*; Rev: *reverse*.

Descripción	cebador	Secuencia 5' -3'	T _m (°C)
<i>fabp2</i>	qfabp2_Fw	CGACCGCAATGAGAACTACGAG	64.0
	qfabp2_Rev	TCTGCTCCAGGGTGATCTTCAG	64.0
<i>eef1a1</i>	qEf1a_Fw	CCCTCAATCACACCGTTCCAAA	62.1
	qEf1a_Rev	AGTAGAGTGCCCAGGTTTAGAGA	62.9

La determinación de los valores relativos de ARN se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2011) utilizando como condición calibradora los cDNA generados a partir de las muestras de intestino del grupo de peces no alimentados. Para el cálculo el primer valor de ΔCT se obtuvo normalizando los valores contra el gen *eef1a1*, y en segunda instancia el $\Delta\Delta CT$ se calculó en relación a la condición calibradora.

5. RESULTADOS

En este trabajo los resultados se han dividido dos grandes secciones con enfoques distintos pero complementarios, para estudiar por un lado cómo la Fabp2 de *D. rerio* ingresa al núcleo del enterocito, y por otro analizar cómo se regula su expresión respecto a la dieta.

Estudio de los mecanismos moleculares que regulan el ingreso al núcleo de la proteína Fabp2 de *Danio rerio*.

5.1. Estudios *in silico*.

Antecedentes de nuestro grupo de investigación, han evidenciado la presencia de Fabp2 en el núcleo del enterocito de *D. rerio*. Sin embargo, esta proteína no contiene la clásica señal de localización nuclear descrita en Dingwall et al., 1982 y Kalderon et al., 1984b formada por una sucesión de residuos básicos en la secuencia primaria. Por otro lado, se ha reportado que proteínas de la familia a la que pertenece Fabp2 tienen una NLS tridimensional a nivel de las hélices α . Dado que no se ha reportado la estructura tridimensional de la proteína en estudio, se realizó un modelo por homología utilizando como referencia la estructura de la apo FABP2 de rata (1IFC.pdb) con la cual posee un 67.2 % de identidad de secuencia (Figura 5.1). La desviación de la media cuadrática (RMSD) entre las distancias entre los carbonos α y la cadena principal fue de 0.079 Å y 0.114 Å entre el modelo generado y la estructura utilizada como molde.

Al mismo tiempo, se realizaron modelos por homología utilizando como molde estructuras de FABP2 unida a ligandos. Para este caso se utilizaron las estructuras de FABP2 de humano unida a ácido oleico (2MO5.pdb) y de rata unida a ácido palmítico (1IFB.pdb). Se obtuvieron valores de RMSD entre carbonos α y cadena principal de cada modelo con su correspondiente molde de 0.093 Å y 0.143 Å; y 0.124 Å y 0.163 Å respectivamente.

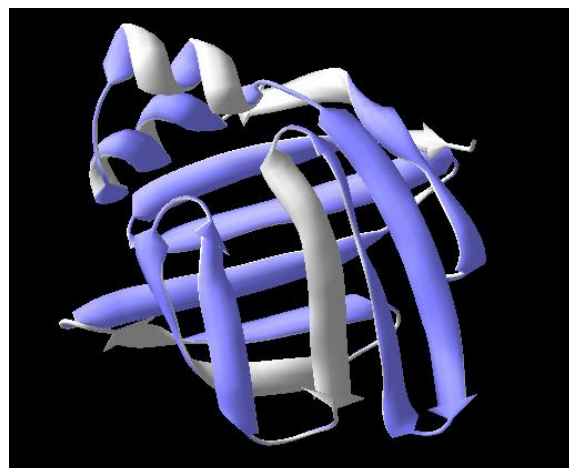


Figura 5.1. Modelo por homología de Fabp2 de *D. rerio* a partir de FABP2 de *R. norvegicus* (1IFC.pdb).

La superposición de nuestro modelo con el de FABP4 reportado (1LIB.pdb) mostró que los aminoácidos Lisina 17 (K17), Arginina 29 (R29) y Lisina 30 (K30) se posicionan de manera muy similar a la de la señal descrita (K21, R30, K31), a pesar que el alineamiento de secuencias aminoacídicas no lo mostraban (Figura 5.2).

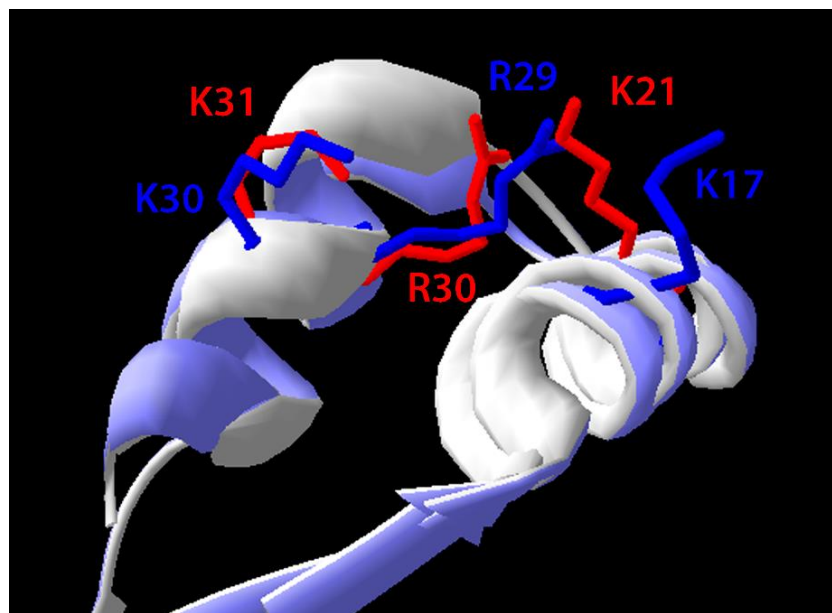


Figura 5.2. Alineamiento de estructuras de FABP4 (1LIB) y el modelo de Fabp2 de *D. rerio*. Se destacan la NLS descrita para FABP4 en rojo, y la propuesta para Fabp2 en azul.

Los mismos autores que describieron la señal tridimensional, analizaron si la misma era dependiente del ligando, encontrando que ciertos ligandos activaban la señal mientras que otros no lo hacían. Observaron que en estructuras de FABP4 unida a ácidos grasos no activadores, los ligandos sobresalen desde su sitio de unión a través de la región portal provocando el cambio de posición de la Fenilalanina 57 (F57) hacia una posición que los autores definieron como abierta. Por otro lado, la unión a ligandos activadores posicionan a la F57 en una conformación cerrada. El estado apo de la FABP4 muestra una posición intermedia de F57 entre el estado abierto y cerrado (Gillian et al., 2007). En base a este antecedente, analizamos si la translocación nuclear de Fabp2 se podría regular en base a este cambio conformacional, dado que en Fabp2 hay una Fenilalanina (F56), posicionada en la misma región que F57 de FABP4. De acuerdo al modelado de Fabp2 mediante homología con la estructura cristalográfica de FABPs intestinales unidas a ácido oleico (PDB 2MO5) y a ácido palmítico (PDB 2IFB), se observó que ambos ligandos favorecen la conformación cerrada de F56 (Figura 5.3), lo cual sugiere que se trata de ligandos activadores.

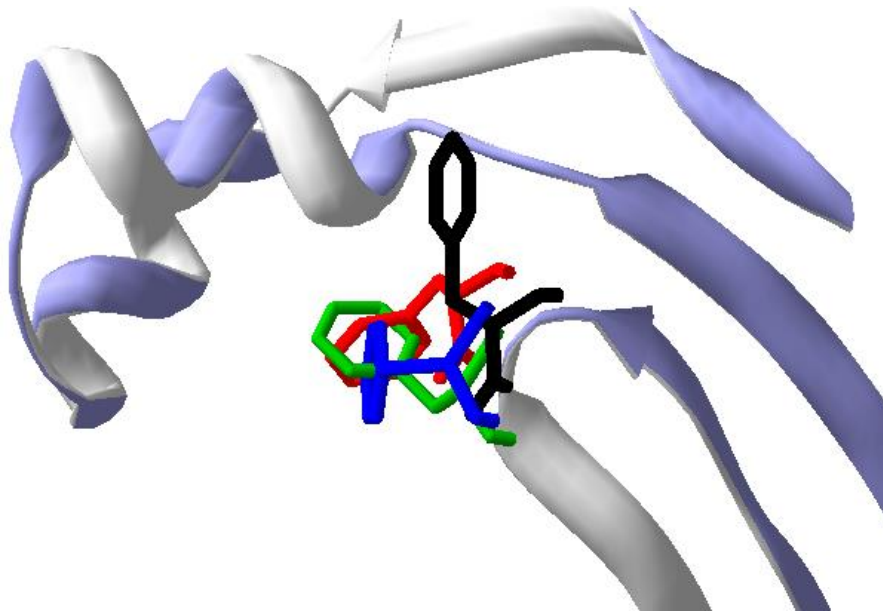


Figura 5.3. Superposición de modelos de Fabp2 con distintos ligandos y FABP4. Se muestra en negro FABP4-ácido oleico (PDB 1LIB), en rojo FABP4-ácido linoleico (PDB 2Q9S), en azul y verde modelo por homología de Fabp2 de *D. rerio* realizado con FABP2-ácido oleico (PDB 2MO5) y FABP2-ácido palmítico (PDB 2IFB) respectivamente.

En FABP4, la posición cerrada inducida por ligandos activadores, la F57 establece contacto con la Valina 32 de la hélice α II, quedando en posición paralela y empujándola hacia afuera. En cambio, en la conformación abierta observada para la unión de ligandos no activadores, F57 empuja la V32 hacia el lado opuesto. A su vez, la V32 está adyacente a los residuos K31 y R30 que forman parte de la NLS de FABP4, lo que sugiere que podrían influir sobre estos residuos, cuando la proteína se une a ligandos activadores (Gillilan et al., 2007). En este sentido, realizamos la búsqueda *in silico* de residuos que respondan a este mecanismo en el modelo realizado de FABP2 unido a ligandos. Se encontró que la Leucina 31, se ubica de forma muy similar a la V32 de FABP4, posicionándose también paralelamente. Asimismo, las distancias entre F57 y V32 de FABP4 y F56 y L31 de FABP2 son también semejantes (Figura 5.4). Estos resultados apoyan la presencia de una NLS en Fabp2, que se comporte de forma similar a la descrita para otras proteínas de la familia.

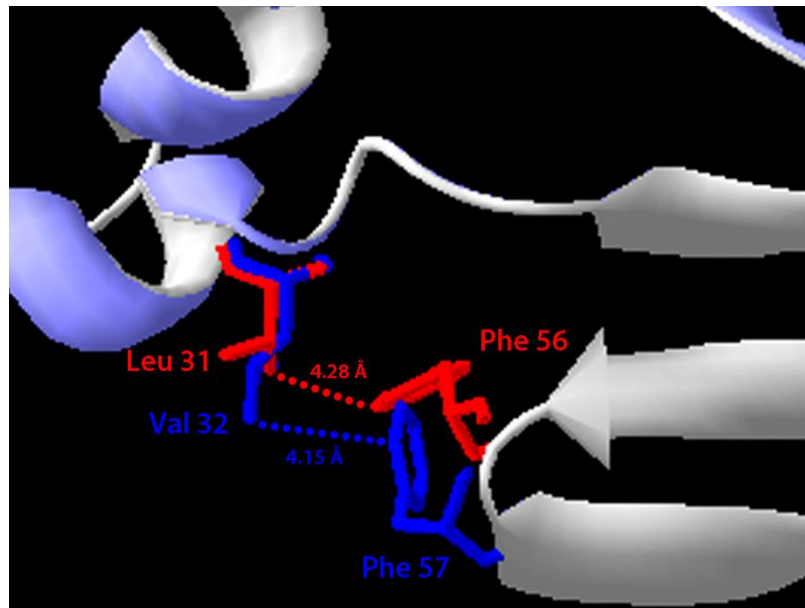


Figura 5.4. Superposición de Fabp2 modelada con ácido oleico y FABP4. Se muestra en azul la F57 y V32 de FABP4-ácido oleico (PDB 1LID), y en rojo la F56 y L31 de Fabp2-ácido oleico. Se destacan las distancias entre los aminoácidos.

5.2. Ensayos en cultivos celulares

Analizamos el efecto de las posibles señales de localización de la proteína Fabp2 transfectando en la línea celular Caco-2 la forma salvaje de esta proteína y cada uno de los mutantes generados. Estudiamos además, como afectaban los ligandos ácido palmítico y oleico a la señal. Para ello previamente fue necesario realizar las mutaciones puntuales y generar los constructos necesarios.

5.2.1. Mutagénesis dirigida

Si bien el modelo nos indica como posible NLS los residuos K17, R29 y K30, consideramos también realizar construcciones con K28 por ser otro aminoácido básico que se encuentra en la misma región que los anteriores.

Se realizaron mutaciones en el gen de *fabp2* sobre los codones que codifican estos aminoácidos seleccionados como posibles NLS, mediante mutagénesis dirigida, en varias combinaciones. Los mutantes fueron generados en pasos sucesivos de reacciones de PCR sobre la región codificante del gen clonado en el vector pET5a. La eficacia de las reacciones de mutagénesis fue determinada mediante secuenciación. La Figura 5.5 muestra la secuencia de los mutantes alineadas con la secuencia de la forma salvaje .

<i>fabp2wt</i>	ATGACCTTCAACGGGACCTGGAAGTCGACCGCAATGAGAACTACGAGAAGTTCATGGAA	60
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	ATGACCTTCAACGGGACCTGGAAGTCGACCGCAATGAGAACTACGAG G CCTTCATGGAA	60
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	ATGACCTTCAACGGGACCTGGAAGTCGACCGCAATGAGAACTACGAG G CCTTCATGGAA	60
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	ATGACCTTCAACGGGACCTGGAAGTCGACCGCAATGAGAACTACGAG G CCTTCATGGAA	60
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	ATGACCTTCAACGGGACCTGGAAGTCGACCGCAATGAGAACTACGAGAAGTTCATGGAA	60

<i>fabp2wt</i>	CAAAATGGGCGTCAACATGGTGAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACCTGAAGATCACC	120
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	CAAAATGGGCGTCAACATGGTGAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACCTGAAGATCACC	120
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	CAAAATGGGCGTCAACATGGTGAAAAG G CC C CTGGCTGCCCATGACAACCTGAAGATCACC	120
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	CAAAATGGGCGTCAACATGGTG G CC G CAAACTGGCTGCCCATGACAACCTGAAGATCACC	120
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	CAAAATGGGCGTCAACATGGTG G CC G CAAACTGGCTGCCCATGACAACCTGAAGATCACC	120

<i>fabp2wt</i>	CTGGAGCAGACCCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACACTGGAA	180
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	CTGGAGCAGACCCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACACTGGAA	180
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	CTGGAGCAGACCCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACACTGGAA	180
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	CTGGAGCAGACCCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACACTGGAA	180
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	CTGGAGCAGACCCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACACTGGAA	180

<i>fabp2wt</i>	ATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGACGGCACTGAGCTCACA	240
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	ATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGACGGCACTGAGCTCACA	240
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	ATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGACGGCACTGAGCTCACA	240
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	ATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGACGGCACTGAGCTCACA	240
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	ATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGACGGCACTGAGCTCACA	240

<i>fabp2wt</i>	GGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGACAACCGGA	300
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	GGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGACAACCGGA	300
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	GGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGACAACCGGA	300
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	GGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGACAACCGGA	300
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	GGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGACAACCGGA	300

<i>fabp2wt</i>	AAGGTACTAACACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTGTACAGAGCTATAGCTAT	360
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	AAGGTACTAACACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTGTACAGAGCTATAGCTAT	360
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	AAGGTACTAACACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTGTACAGAGCTATAGCTAT	360
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	AAGGTACTAACACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTGTACAGAGCTATAGCTAT	360
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	AAGGTACTAACACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTGTACAGAGCTATAGCTAT	360

<i>fabp2wt</i>	GATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCT	396
<i>fabp2¹⁷K/A</i>	GATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCT	396
<i>fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A</i>	GATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCT	396
<i>fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A</i>	GATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCT	396
<i>fabp2²⁸K/A²⁹R/A</i>	GATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCT	396

Figura 5.5. Control de eficacia de mutagénesis dirigida. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de *fabp2wt*, *fabp2¹⁷K/A*, *fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A*, *fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A* y *fabp2²⁸K/A²⁹R/A*. En rojo se destacan los nucleótidos mutados según corresponda.

5.2.2. Clonado de *fabp2* y mutantes en pDCNA3-EGFP y purificación de plásmidos para ensayos de cultivo celular

Las regiones codificantes de *fabp2* y la de los mutantes fueron amplificadas mediante PCR, a partir de los clones que contienen los fragmentos correspondientes (Figura 5.6). Para las reacciones de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos que incluyen los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, y en particular en el cebador reverso el *linker* de glicina-alanina. Por lo tanto, el tamaño esperado para el amplicón de cada uno de las variantes es de 432 pares de bases.

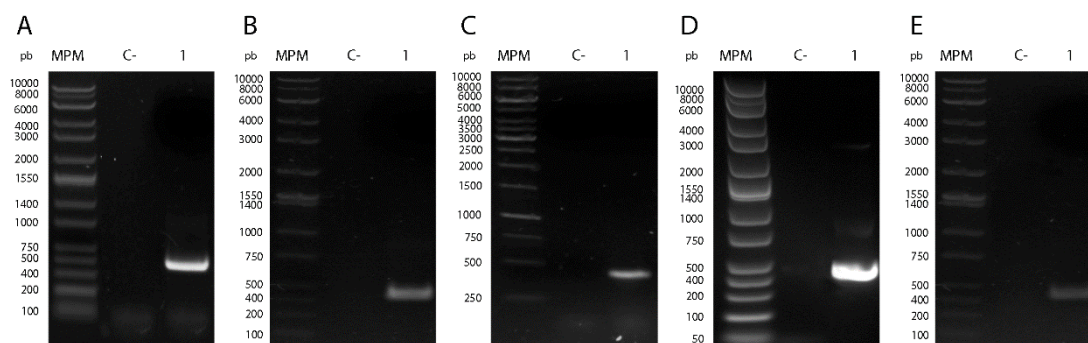


Figura 5.6. Amplificación de *fabp2*_{wt} y mutantes a partir de los clones en pET5a. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR. MPM: marcador de peso molecular, C-: control negativo de la PCR, 1: producto de amplificación de los clones según corresponda: **A:** *fabp2*_{wt}, **B:** *fabp2*^{17K/A}, **C:** *fabp2*^{17K/A^{29R}/A^{30K}/A}, **D:** *fabp2*^{17K/A^{28K}/A^{29R}/A}, **E:** *fabp2*^{28K/A^{29R}/A}.

A continuación, los fragmentos fueron clonados en el vector pCR Blunt, y posteriormente digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I y ligados al vector pCDNA3-EGFP. Se seleccionaron 3 clones para cada variante y se analizó la presencia del inserto mediante amplificación por PCR sobre los plásmidos purificados de cada clon, utilizando los oligonucleótidos mencionados previamente (Figura 5.7).

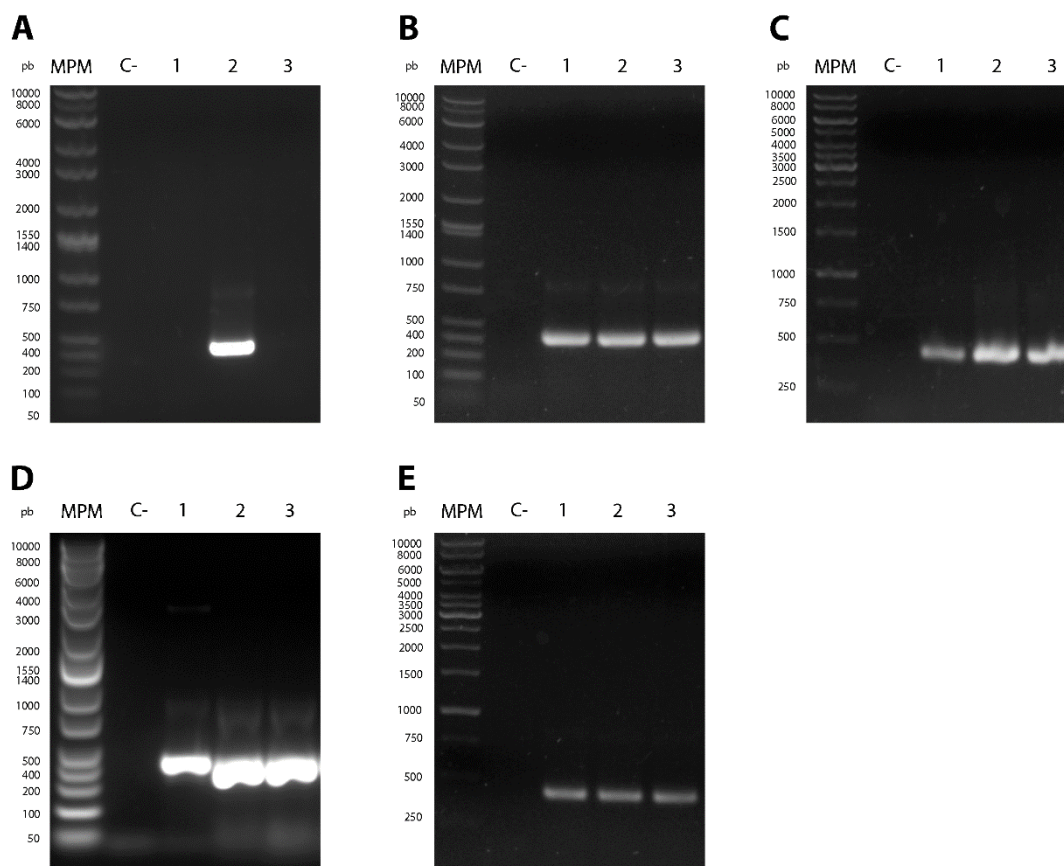


Figura 5.7. Clonado de *fabp2wt* y mutantes en pCDNA3-EGFP. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR. MPM: marcador de peso molecular, C-: control negativo de la reacción, 1-3: producto de amplificación según corresponda. **A:** *fabp2wt*, **B:** *fabp2^{17K/A}*, **C:** *fabp2^{17K/A^{29R/A^{30K/A}}}*, **D:** *fabp2^{17K/A^{28K/A^{29R/A}}}*, **E:** *fabp2^{28K/A^{29R/A}}*.

Se determinó que todos los clones fueron positivos para las variantes analizadas, a excepción de la isoforma salvaje, en la cual sólo un clon contenía el inserto. La secuenciación de los clones seleccionados confirmó la presencia de las regiones codificantes de *fabp2wt*; *fabp2^{17K/A}*; *fabp2^{17K/A^{29R/A^{30K/A}}}*; *fabp2^{17K/A^{28K/A^{29R/A}}}* y *fabp2^{28K/A^{29R/A}}* en el marco de lectura adecuado para la expresión correcta de las proteínas de fusión a EGFP (Figura 5.8).

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	<u>GGATCCATGACCTTCAACGGGACCTGGAAAAGTCGACC</u> CAATGAGAACTACGAGAAGTTC	60
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	<u>GGATCCATGACCTTCAACGGGACCTGGAAAAGTCGACC</u> CAATGAGAACTACGAGGCGCTTC	60
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	<u>GGATCCATGACCTTCAACGGGACCTGGAAAAGTCGACC</u> CAATGAGAACTACGAGGCGCTTC	60
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	<u>GGATCCATGACCTTCAACGGGACCTGGAAAAGTCGACC</u> CAATGAGAACTACGAGGCGCTTC	60
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	<u>GGATCCATGACCTTCAACGGGACCTGGAAAAGTCGACC</u> CAATGAGAACTACGAGAAGTTC	60

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	ATGGAACAAATGGGCGTCAACATGGTAAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACTGAAG	120
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATGGAACAAATGGGCGTCAACATGGTAAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACTGAAG	120
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATGGAACAAATGGGCGTCAACATGGTAAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACTGAAG	120
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATGGAACAAATGGGCGTCAACATGGTAAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACTGAAG	120
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATGGAACAAATGGGCGTCAACATGGTAAAAAGGAAACTGGCTGCCCATGACAACTGAAG	120

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	ATCACCTGGAGCAGACCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACA	180
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATCACCTGGAGCAGACCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACA	180
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATCACCTGGAGCAGACCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACA	180
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATCACCTGGAGCAGACCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACA	180
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	ATCACCTGGAGCAGACCGGAGACAAGTTCAACGTGAAGGAAGTCAGCACTTTCGGCACA	180

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CTGGAATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGAGGGCACTGAG	240
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTGGAATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGAGGGCACTGAG	240
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTGGAATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGAGGGCACTGAG	240
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTGGAATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGAGGGCACTGAG	240
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTGGAATTAACCTTACTCTGGGCGTCACCTTTGACTATTCTCTGGCAGAGGGCACTGAG	240

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CTCACAGGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGAC	300
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTCACAGGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGAC	300
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTCACAGGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGAC	300
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTCACAGGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGAC	300
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	CTCACAGGATCCTGGGTCATAGAGGGAGACACGCTCAAGGGGACTTTCACACGCAAGGAC	300

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	AACGGAAGGTAATAACAACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTTGACAGAGCTAT	360
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AACGGAAGGTAATAACAACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTTGACAGAGCTAT	360
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AACGGAAGGTAATAACAACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTTGACAGAGCTAT	360
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AACGGAAGGTAATAACAACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTTGACAGAGCTAT	360
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AACGGAAGGTAATAACAACAGTCAGGACTATCGTTAATGGTGAACCTTGACAGAGCTAT	360

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	AGCTATGATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCTGCCGGCCGGCGCCGGC	420
<i>fabp2</i> ^{17K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AGCTATGATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCTGCCGGCCGGCGCCGGC	420
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AGCTATGATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCTGCCGGCCGGCGCCGGC	420
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AGCTATGATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCTGCCGGCCGGCGCCGGC	420
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R} / <i>A</i> -pCDNA3_EGFP	AGCTATGATGGAGTCGAGGCCAAGAGGATTTTCAAGAGGGCTGCCGGCCGGCGCCGGC	420

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GCCGGCCTCGAGATGGT	480
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GCCGGCCTCGAGATGGT	480
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	GCCGGCCTCGAGATGGT	480
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	GCCGGCCTCGAGATGGT	480
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GCCGGCCTCGAGATGGT	480

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GTCGAGCTGGACGGCGACGTA	540
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GTCGAGCTGGACGGCGACGTA	540
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	GTCGAGCTGGACGGCGACGTA	540
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	GTCGAGCTGGACGGCGACGTA	540
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GTCGAGCTGGACGGCGACGTA	540

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GATGCCACCTACGGCAAGCT	600
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GATGCCACCTACGGCAAGCT	600
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	GATGCCACCTACGGCAAGCT	600
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	GATGCCACCTACGGCAAGCT	600
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GATGCCACCTACGGCAAGCT	600

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CCCTGGCCACCCTCGTGACC	660
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	CCCTGGCCACCCTCGTGACC	660
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	CCCTGGCCACCCTCGTGACC	660
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	CCCTGGCCACCCTCGTGACC	660
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	CCCTGGCCACCCTCGTGACC	660

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GACCACATGAAGCAGCAGACT	720
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GACCACATGAAGCAGCAGACT	720
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	GACCACATGAAGCAGCAGACT	720
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	GACCACATGAAGCAGCAGACT	720
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GACCACATGAAGCAGCAGACT	720

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CGCACCATCTTCTTCAAGG	780
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	CGCACCATCTTCTTCAAGG	780
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	CGCACCATCTTCTTCAAGG	780
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	CGCACCATCTTCTTCAAGG	780
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	CGCACCATCTTCTTCAAGG	780

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GGCGACCCCTGGTGAACCG	840
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GGCGACCCCTGGTGAACCG	840
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	GGCGACCCCTGGTGAACCG	840
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	GGCGACCCCTGGTGAACCG	840
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	GGCGACCCCTGGTGAACCG	840

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	ATCCTGGGGCACAAGCTGG	900
<i>fabp2^{17K}</i> /A-pCDNA3_EGFP	ATCCTGGGGCACAAGCTGG	900
<i>fabp2^{17K/A^{29R}}</i> /A ^{30K} /A-pCDNA3_EGFP	ATCCTGGGGCACAAGCTGG	900
<i>fabp2^{17K/A^{28K}}</i> /A ^{29R} /A-pCDNA3_EGFP	ATCCTGGGGCACAAGCTGG	900
<i>fabp2^{28K/A^{29R}}</i> /A-pCDNA3_EGFP	ATCCTGGGGCACAAGCTGG	900

<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC	960
<i>fabp2</i> ^{17K} /A-pCDNA3_EGFP	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC	960
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{29R}/A^{30K}} /A-pCDNA3_EGFP	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC	960
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{28K}/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC	960
<i>fabp2</i> ^{28K/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	AAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC *****	960
<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG	1020
<i>fabp2</i> ^{17K} /A-pCDNA3_EGFP	GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG	1020
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{29R}/A^{30K}} /A-pCDNA3_EGFP	GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG	1020
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{28K}/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG	1020
<i>fabp2</i> ^{28K/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG *****	1020
<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAACAAAGACCCCAACGAGAAGCGC	1080
<i>fabp2</i> ^{17K} /A-pCDNA3_EGFP	CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAACAAAGACCCCAACGAGAAGCGC	1080
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{29R}/A^{30K}} /A-pCDNA3_EGFP	CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAACAAAGACCCCAACGAGAAGCGC	1080
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{28K}/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAACAAAGACCCCAACGAGAAGCGC	1080
<i>fabp2</i> ^{28K/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAACAAAGACCCCAACGAGAAGCGC *****	1080
<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	GATCACATGGTCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACCAA	1140
<i>fabp2</i> ^{17K} /A-pCDNA3_EGFP	GATCACATGGTCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACCAA	1140
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{29R}/A^{30K}} /A-pCDNA3_EGFP	GATCACATGGTCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACCAA	1140
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{28K}/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	GATCACATGGTCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACCAA	1140
<i>fabp2</i> ^{28K/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	GATCACATGGTCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCCGGGATCCTCTCGGCATGGACCAA *****	1140
<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	CTGTACAAGTAA	1152
<i>fabp2</i> ^{17K} /A-pCDNA3_EGFP	CTGTACAAGTAA	1152
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{29R}/A^{30K}} /A-pCDNA3_EGFP	CTGTACAAGTAA	1152
<i>fabp2</i> ^{17K/A^{28K}/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	CTGTACAAGTAA	1152
<i>fabp2</i> ^{28K/A^{29R}} /A-pCDNA3_EGFP	CTGTACAAGTAA *****	1152

Figura 5.8. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de *fabp2wt*-pCDNA3_EGFP; *fabp2*^{17K}/A-pCDNA3_EGFP; *fabp2*^{17K/A^{29R}/A^{30K}}/A-pCDNA3_EGFP; *fabp2*^{17K/A^{28K}/A^{29R}}/A-pCDNA3_EGFP y *fabp2*^{28K/A^{29R}}/A-pCDNA3_EGFP). En rojo se destacan las mutaciones realizadas; subrayados los sitios de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I; en azul el *linker* de glicina-alanina y en verde la secuencia codificante para la EGFP.

Finalmente se realizó la purificación y dosificación de los plásmidos a mediana escala para cada uno de los clones seleccionados. Las concentraciones obtenidas se detallan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Dosificación de preparaciones plásmidicas conteniendo la región codificante de *fabp2wt* y mutantes en el vector pCDNA3-EGFP.

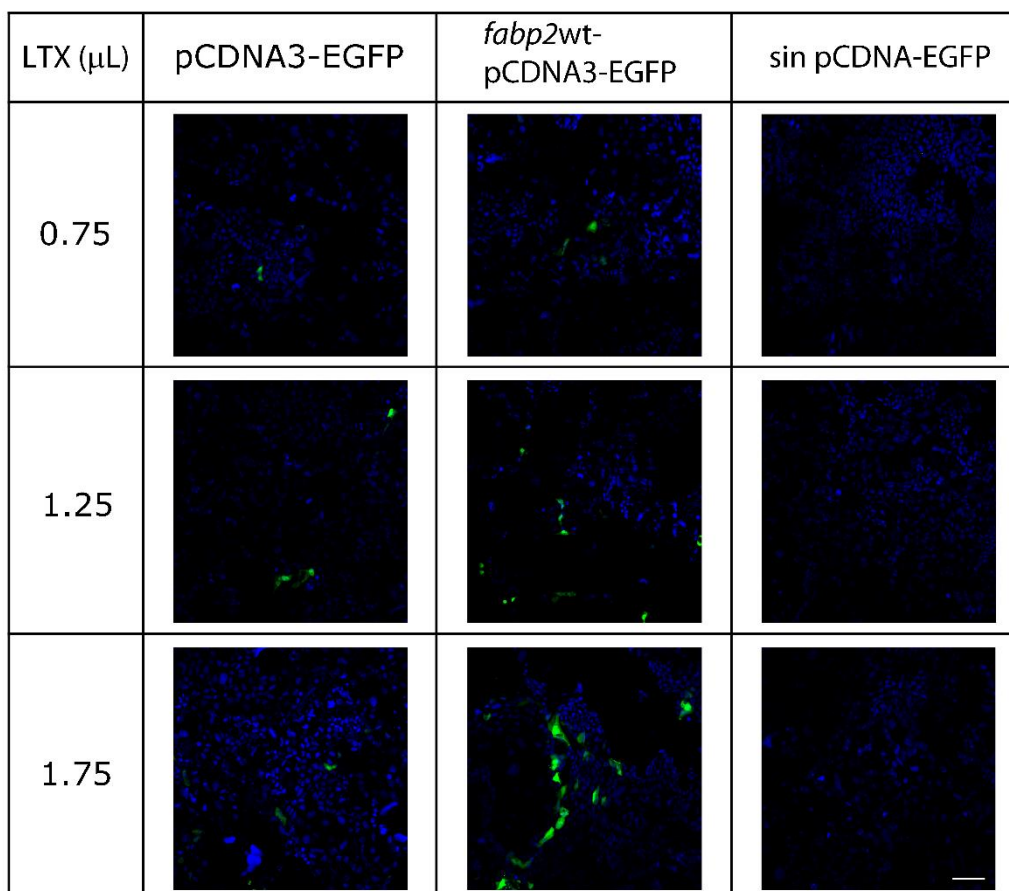
Plásmido	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
<i>fabp2wt</i> -pCDNA3_EGFP	0.53
<i>fabp2</i> ^{17K/A} -pCDNA3_EGFP	0.70
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁹R/A³⁰K/A} -pCDNA3_EGFP	0.85
<i>fabp2</i> ^{17K/A²⁸K/A²⁹R/A} -pCDNA3_EGFP	1.87
<i>fabp2</i> ^{28K/A²⁹R/A} -pCDNA3_EGFP	0.80

5.2.3. Puesta a punto de condiciones de transfección

Para la optimización de los experimentos de transfección se ensayaron diferentes condiciones variando parámetros como el tiempo de incubación del cultivo previo a la transfección, el número de células por pocillo, la cantidad de lipofectamina y el tiempo de incubación post transfección. En base a las pruebas realizadas se optó por utilizar cultivos en monocapa de 24 horas respecto a 48 horas, dado que no se observaron grandes cambios en las dos condiciones ensayadas. En cuanto a la cantidad de células, se optó por emplear 1×10^5 células por pocillo, dado que un mayor número de células resultó en una menor eficiencia de transfección.

Los tiempos de incubación post transfección mostraron diferencias en cuanto a la tasa de transfección. En los cultivos incubados por 24 horas, la transfección fue casi nula tanto para el control positivo (pCDNA-EGFP) como para el plásmido con la forma salvaje de *fabp2*. En cambio, los cultivos incubados 48 horas fueron positivos para los mismos plásmidos ensayados, y la eficiencia de transfección dependió del volumen de lipofectamina utilizado, evaluado cualitativamente (Figura 5.9 A y B). Para los cultivos incubados 72 horas luego de la transfección, los resultados fueron muy similares a los obtenidos a las 48 horas, por lo tanto, se optó por utilizar esta última para reducir los tiempos experimentales. Vale mencionar que en las transfecciones con el plásmido pCDNA-EGFP, se observa la expresión de EGFP tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. Probablemente esto se deba a la sobreexpresión de esta proteína lo que provoca fugas a nivel nuclear, incluso en ausencia de una NLS específica (Sessler et al., 2005). Este control positivo fue incluido en todos los ensayos posteriores, verificándose que la localización de EGFP no se altera en respuesta a los cambios realizados.

A



B

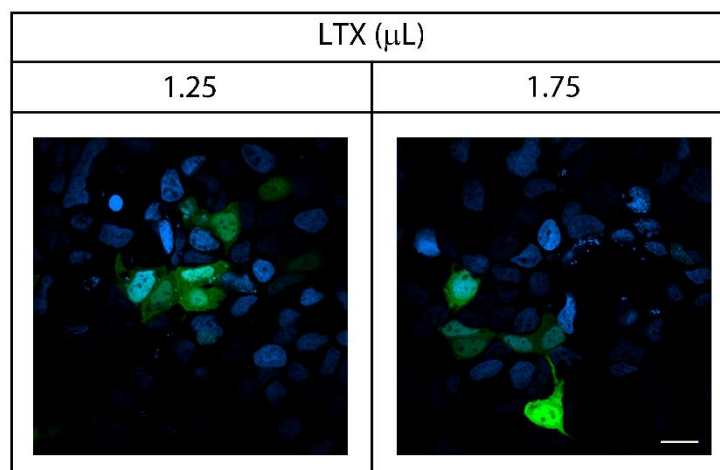


Figura 5.9. Evaluación de la eficiencia de transfección en células. Transfecciones de cultivos de 24 horas de células Caco-2 con 1 μg de plásmido según corresponda e incubados 48 horas previo a la fijación. **A:** Transfecciones utilizando 0.75, 1.25 y 1.75 μL de LTX, con los plásmidos pCDNA3-EGFP (control positivo), *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP y sin adición de plásmido (control negativo). Barra 100 μm . **B:** Transfecciones con el plásmido *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP utilizando 1.25 y 1.75 μL de LTX (Lipofectamina) a mayor aumento. Azul: DAPI, Verde: EGFP o proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μm .

De acuerdo a las cantidades de Lipofectamina empleadas, se consideró adecuado continuar los ensayos con 1.25 μL dado la similitud de los resultados obtenidos utilizando 1.75 μL (Figura 5.9 B). Asimismo, la cantidad de ADN a transfectar no resultó ser limitante en las condiciones tratadas, por lo tanto, se trabajó con 1 μg . Por lo tanto, todos los ensayos de transfección posteriores se realizaron con un cultivo de 24 horas con 1×10^5 células por pocillo, utilizando 1 μg de ADN, 1.25 μL de Lipofectamina (LTX) y 48 horas de incubación luego de la transfección.

5.2.4. Estudio de localización celular de Fabp2wt.

Una vez optimizadas las condiciones de transfección se procedió al estudio de la localización celular de la proteína Fabp2wt-EGFP. Nuestros resultados indican que esta proteína se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células Caco-2 cultivadas en presencia de suero fetal bovino (SFB) (Figura 5.10).

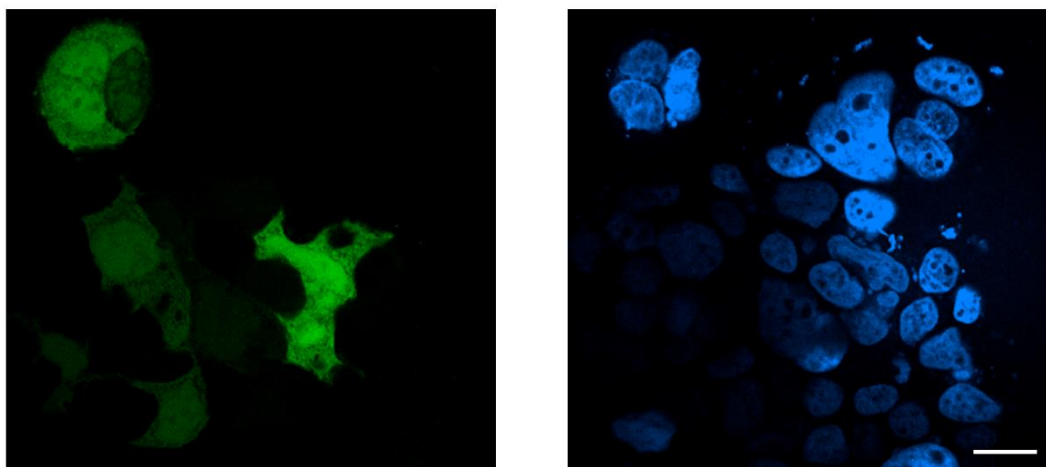


Figura 5.10. Localización de Fabp2wt-EGFP en cultivos de células Caco-2 en presencia de SFB, transfectadas con el plásmido *fabp2wt-pCDNA3-EGFP*. Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μm .

Posteriormente se analizó el efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico en la localización de la proteína salvaje, adicionando los mismos al cultivo. En estos ensayos se emplearon cultivos sin suplemento de suero fetal bovino, para que los lípidos del suero no interfirieran en el estudio (Figura 5.11).

La cuantificación de estos ensayos mostró que hay una mayor proporción de la proteína Fabp2wt-EGFP en el núcleo en presencia de ambos ácidos grasos con respecto a los controles tanto al que no tiene el agregado de suero como el que sí lo tiene (Figura 5.12). Asimismo, se observó que el ácido oleico promueve la translocación nuclear de la proteína en mayor medida que el ácido palmítico.

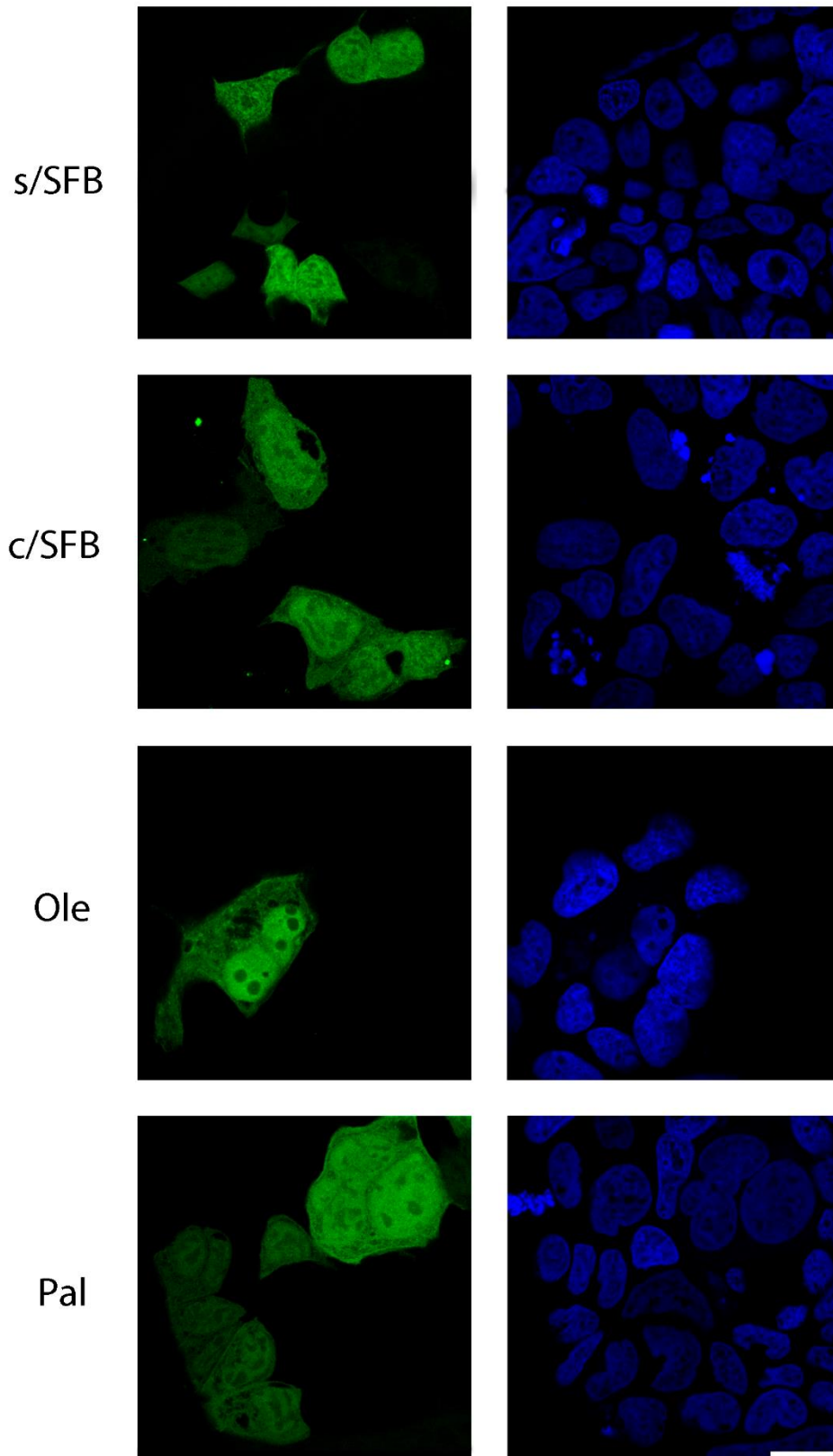


Figura 5.11. Localización de Fabp2wt-EGFP en cultivos de células Caco-2 transfectadas con el plásmido *fabp2wt-pCDNA3-EGFP*. s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico; Pal: ácido palmítico. Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μm .

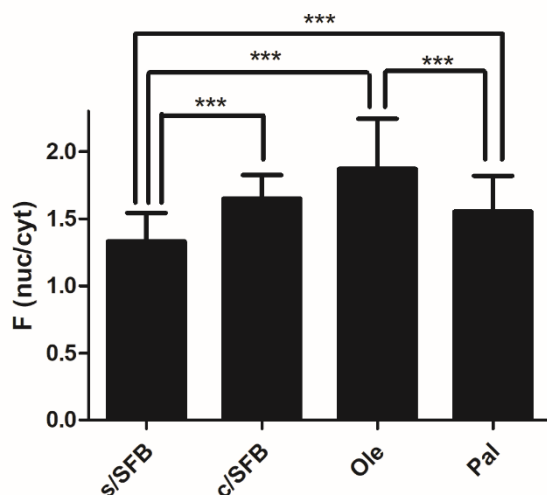


Figura 5.12. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma F(nuc/cyt) de la intensidad de fluorescencia de Fabp2wt-EGFP, en células transfectadas con el plásmido *fabp2wt-pCDNA3-EGFP*. s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico; Pal: ácido palmítico. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar. Test t de Student: *** $p < 0.01$.

5.2.5. Estudio de la localización celular de Fabp2wt y los mutantes.

5.2.5.1. Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A.

Se estudió la localización celular de la proteína mutante Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A, respecto a Fabp2wt, con la finalidad de encontrar si los residuos propuestos corresponden a la señal de localización nuclear. Se transfectaron en paralelo cultivos de la línea Caco-2 con el plásmido *fabp2wt-pCDNA3-EGFP* y *fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A-pCDNA3-EGFP* suplementados con SFB. Los resultados obtenidos (Figura 5.13) muestran que los residuos propuestos no estarían implicados en la translocación nuclear, dado que la relación de intensidad de fluorescencia núcleo/citoplasma medida, es incluso mayor que para la forma salvaje de la proteína (Figura 5.14).

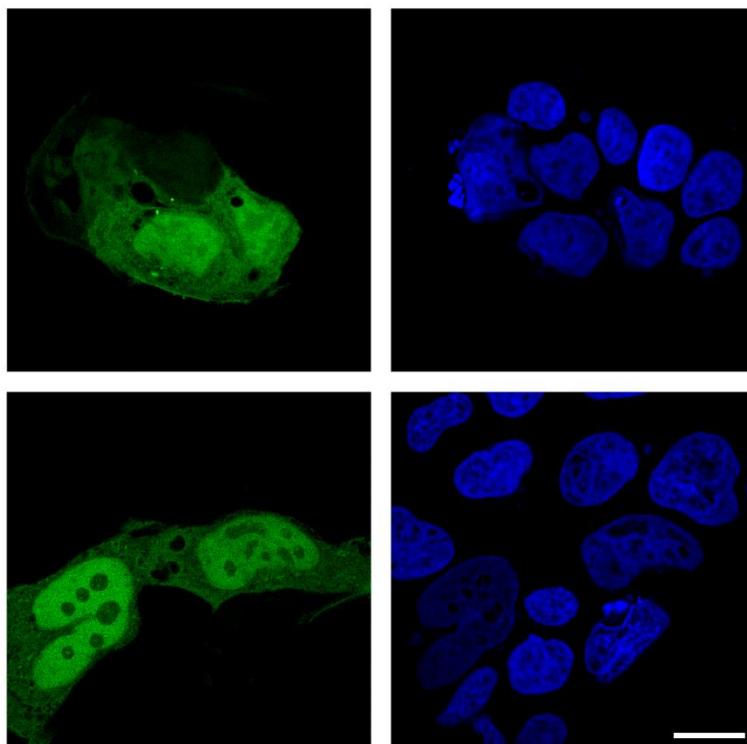


Figura 5.13. Localización de la proteína Fabp2^{17K/A,29R/A,30K/A}. Cultivos de células Caco-2 en presencia de SFB, transfectadas con el plásmido *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP (arriba) y *fabp2*^{17K/A^{29R/A}30K/A}-pCDNA3-EGFP (abajo). Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μ m.

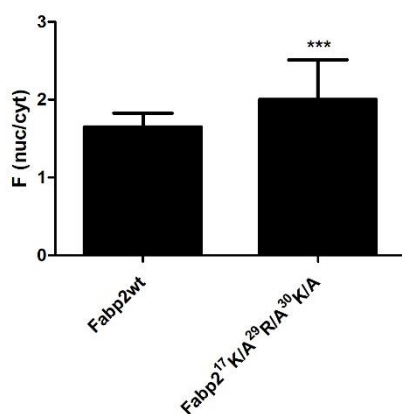


Figura 5.14. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma F(nuc/cyt) de la intensidad de fluorescencia en células transfectadas con el plásmido *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP y *fabp2*^{17K/A^{29R/A}30K/A}-pCDNA3-EGFP. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar. Test t de Student: *** $p < 0.01$.

Con el objetivo de confirmar que los residuos seleccionados no conforman la NLS repetimos el ensayo anterior con la adición de los ácidos grasos que provocan la traslocación nuclear de la forma salvaje. Se realizó el análisis de la localización celular de la proteína mutante en cultivos con y sin suplemento de suero fetal bovino, y con la adición de ácido oleico y ácido palmítico (Figura 5.15). La cuantificación de estos resultados mostró que en presencia de ácido palmítico y oleico el mutante Fabp2^{17K/A,29R/A,30K/A}-EGFP se comporta igual que en los controles (Figura 5.16).

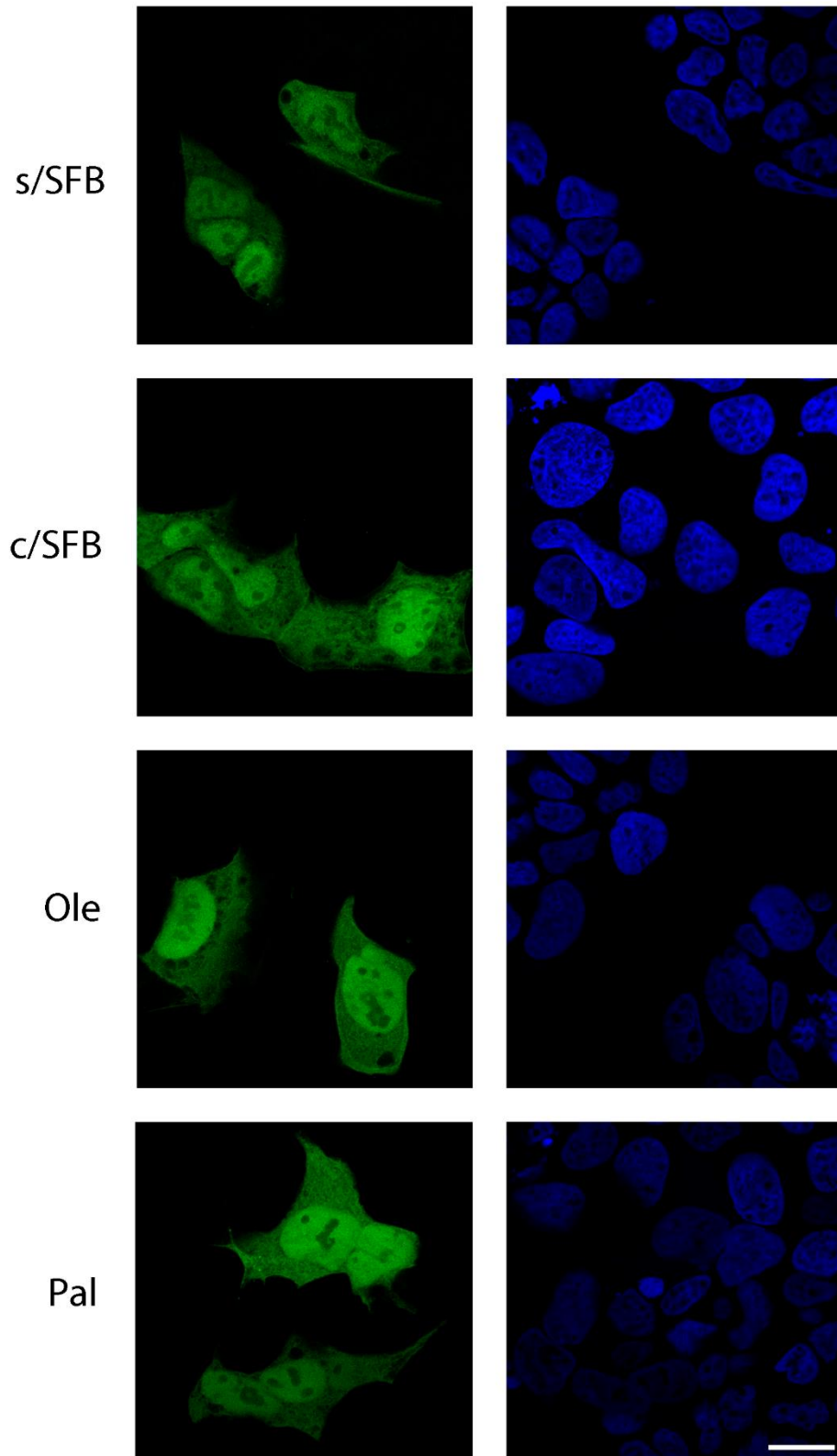


Figura 5.15. Localización de la expresión de Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A-EGFP en cultivos de células Caco-2 transfectadas con el plásmido *fabp2¹⁷K/A,²⁹R/A,³⁰K/A-pCDNA3-EGFP*. s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico; Pal: ácido palmítico. Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP. Barra 20 μ m.

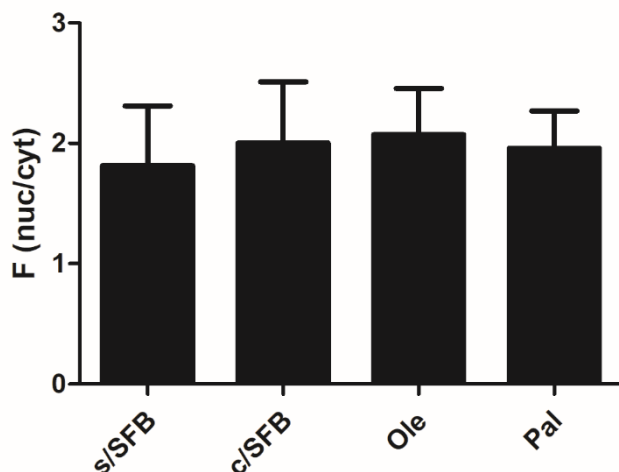


Figura 5.16. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma $F(\text{nuc/cyt})$ de la intensidad de fluorescencia de $\text{Fabp2}^{17\text{K}/\text{A}^{29\text{R}/\text{A}^{30\text{K}/\text{A}}}$ -EGFP en células transfectadas con el plásmido $\text{fabp2}^{17\text{K}/\text{A}^{29\text{R}/\text{A}^{30\text{K}/\text{A}}}$ -pCDNA3-EGFP. s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico; Pal: ácido palmítico. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar

5.2.5.2. $\text{Fabp2}^{17\text{K}/\text{A}^{28\text{K}/\text{A}^{29\text{R}/\text{A}}}$.

Continuando con la búsqueda de la NLS, estudiamos otra combinación de aminoácidos básicos. En este caso, se probó con el constructo cuyo producto proteico poseerá la sustitución por alaninas de la lisina 17, lisina 28 y arginina 29 ($\text{Fabp2}^{17\text{K}/\text{A}^{28\text{K}/\text{A}^{29\text{R}/\text{A}}}$). Nuevamente se transfectaron en paralelo cultivos de la línea Caco-2 con el plásmido fabp2^{wt} -pCDNA3-EGFP y $\text{fabp2}^{17\text{K}/\text{A}^{28\text{K}/\text{A}^{29\text{R}/\text{A}}}$ -pCDNA3-EGFP suplementados con SFB. Los resultados obtenidos (Figura 5.17) muestran que los aminoácidos propuestos sí estarían implicados en la translocación nuclear, dado que la relación de intensidad de fluorescencia núcleo/citoplasma medida, es significativamente menor que para la forma salvaje de la proteína (Figura 5.18). Estos resultados en conjunto de con los observados previamente, nos sugieren un rol importante del residuo K28 en la NLS propuesta.

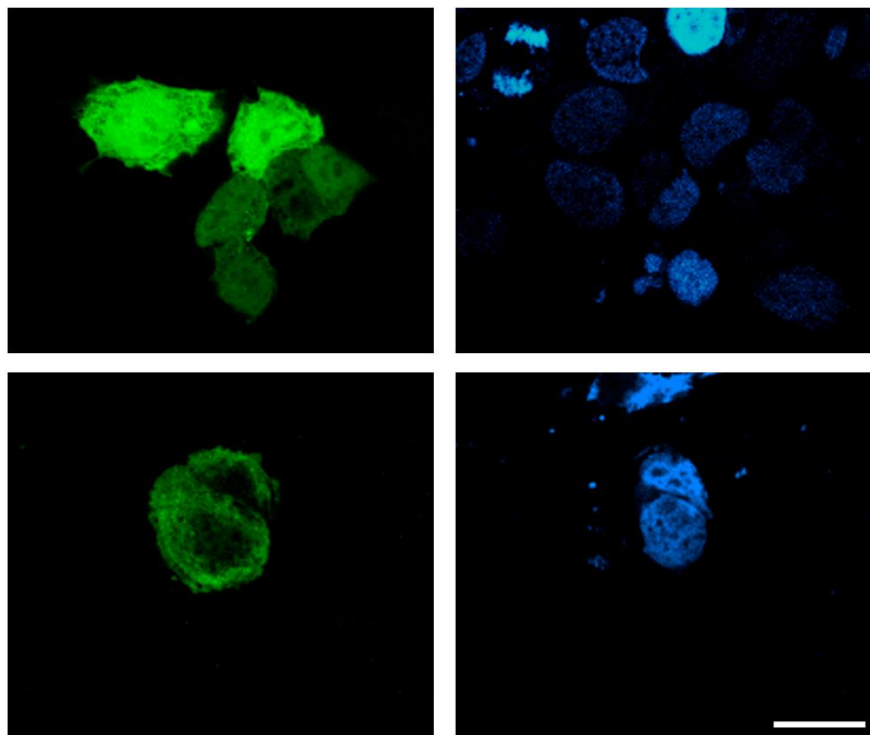


Figura 5.17. Localización de la proteína Fabp2^{17K/A^{28K/A^{29R/A}}. Cultivos de células Caco-2 en presencia de SFB, transfectadas con el plásmido *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP (arriba) y *fabp2^{17K/A^{28K/A^{29R/A}}}* - pCDNA3-EGFP (abajo). Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μ m.}

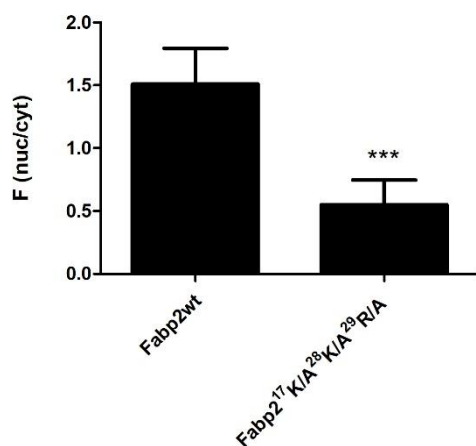


Figura 5.18. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma F(nuc/cyt) de la intensidad de fluorescencia en células transfectadas con el plásmido *fabp2wt*-pCDNA3-EGFP y *fabp2<sup>17K/A^{28K/A^{29R/A}}*-pCDNA3-EGFP. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar. Test t de Student: *** p < 0.01.

A continuación, para asegurarnos que los aminoácidos propuestos realmente integran la señal de localización nuclear, se procedió a estudiar la localización celular de la proteína Fabp2<sup>17K/A^{28K/A^{29R/A}} sometida a diferentes composiciones de ácidos grasos en el medio de cultivo, dado que la composición exacta de ácidos grasos en el suero fetal bovino es desconocida. Para ello se realizaron ensayos en paralelo de células transfectadas con el plásmido *fabp2^{17K/A^{28K/A^{29R/A}}*-pCDNA3-EGFP, con y sin el suplemento de SFB. Además, se realizó el ensayo con el agregado de ácido oleico, el cual se comprobó previamente que promueve la localización nuclear de la proteína Fabp2 en}

su forma salvaje. Los resultados obtenidos muestran que ante la presencia de un ácido graso inductor de la translocación nuclear, la proteína mutante en la NLS posee una localización mayoritariamente citoplasmática (Figura 5.19). Además, la relación de intensidad de fluorescencia núcleo/citoplasma correspondiente a la proteína mutante no varía según la composición del medio (Figura 5.20). Por lo tanto, la señal de localización nuclear que permite el ingreso de la Fabp2 del pez cebra al núcleo celular de las células Caco-2 estaría conformada por los aminoácidos Lisina 17, Lisina 28 y Arginina 29, cuya estructura tridimensional se representa en la figura 21.

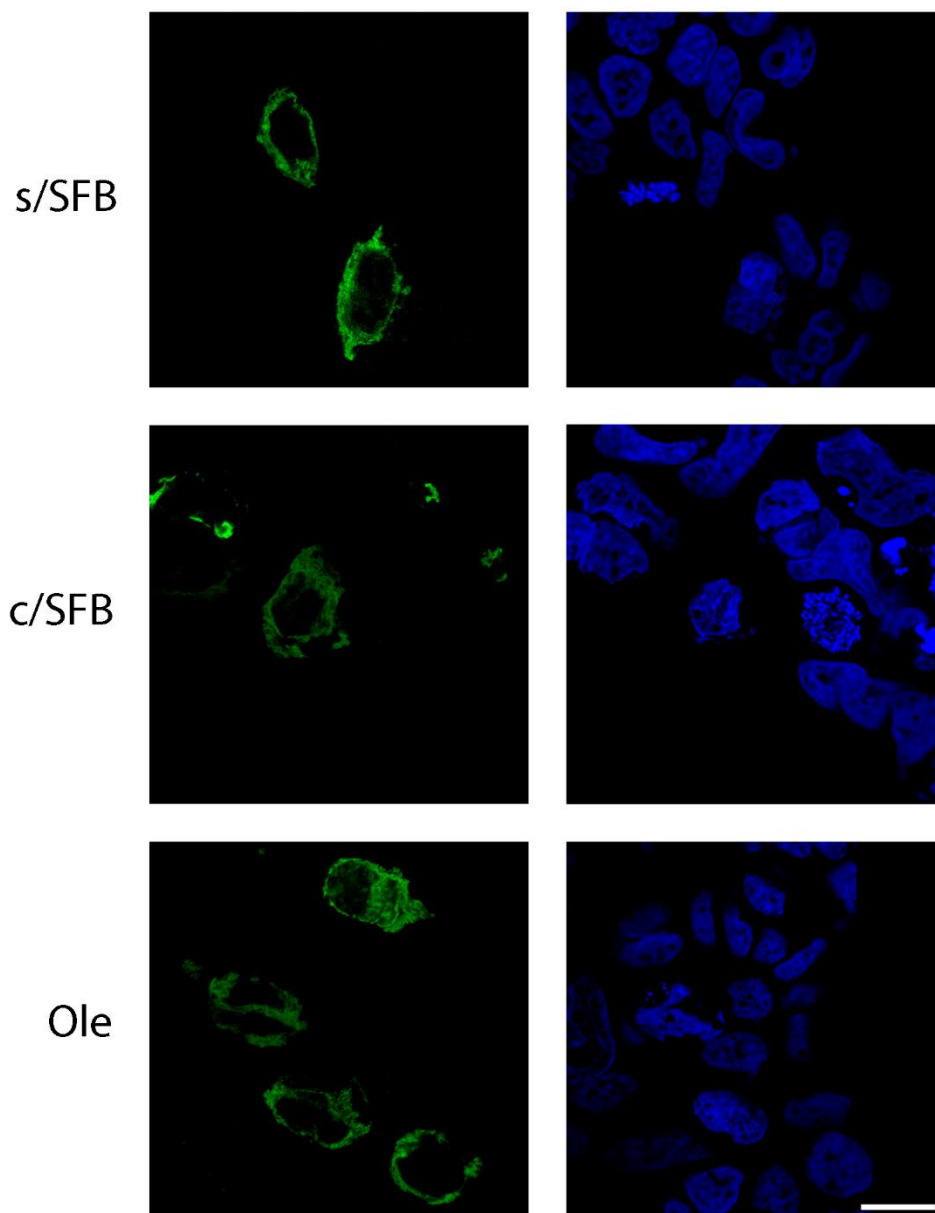


Figura 5.19. Localización de la expresión de Fabp2¹⁷K/A,²⁸K/A,²⁹R/A-EGFP en cultivos de células Caco-2 transfectadas con el plásmido *fabp2*¹⁷K/A,²⁸K/A,²⁹R/A -pCDNA3-EGFP s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico. Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP. Barra 20 μ m.

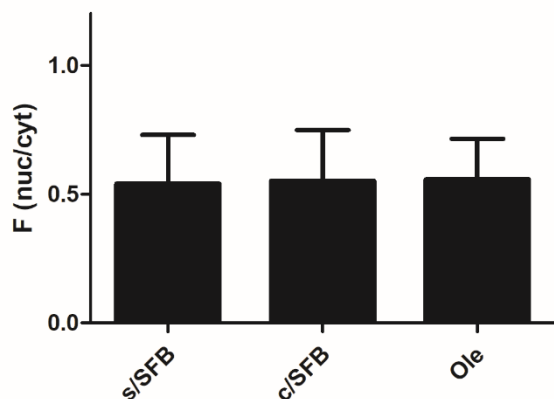


Figura 5.20. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma F(nuc/cyt) de la intensidad de fluorescencia en células transfectadas con el plásmido *fabp2*^{17K/A, 28K/A, 29R/A}-pCDNA3-EGFP. s/SFB: sin SFB; c/SFB: con SFB; Ole: ácido oleico. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar.

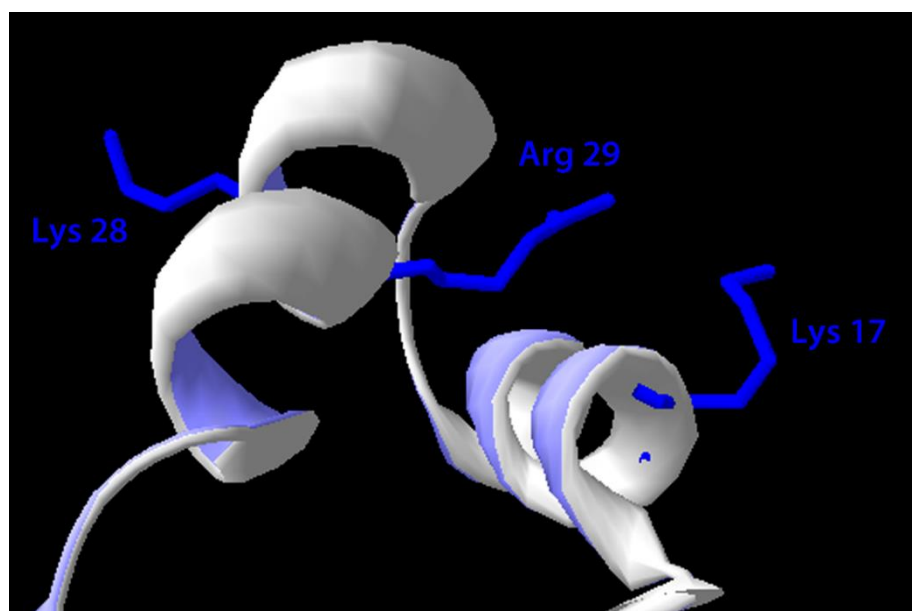


Figura 5.21. Modelo por homología de Fabp2. Se destacan los aminoácidos K17, K28 y R29 correspondientes a la NLS.

5.2.5.3. *Fabp2*^{17K/A} y *Fabp2*^{28K/A 29R/A}.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, es de destacar el rol de la K28 en la posible NLS. Es por ello que con objetivo de determinar si los tres residuos participan en forma colaborativa o no, se evaluó la localización celular de los mutantes *Fabp2*^{17K/A} y *Fabp2*^{28K/A 29R/A}. Para ello se utilizó el mutante ya generado que posee solo la mutación de la lisina 17 por alanina, y se generó el que posee la mutación de la lisina 28 y arginina 29 por alaninas. Se transfectaron en paralelo cultivos de la línea Caco-2 con el plásmido *fabp2*^{wt}-pCDNA3-EGFP, *fabp2*^{17K/A}-pCDNA3-EGFP y *fabp2*^{28K/A 29R/A}-pCDNA3-EGFP suplementados con SFB. Los resultados obtenidos (Figura 5.22) muestran que los estos aminoácidos así evaluados no serían capaces de

funcionar como señal de localización nuclear dada la presencia de la proteína a nivel nuclear. Sin embargo, la relación de intensidad de fluorescencia núcleo/citoplasma medida de la proteína salvaje es significativamente mayor que para los mutantes (Figura 5.23) pero su efecto es menor que para el mutante Fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A . Parecería evidente que los tres residuos actúan de forma cooperativa siendo necesarios para actuar como NLS. Nos quedó pendiente generar los mutantes individuales de ²⁸K/A y ²⁹R/A.

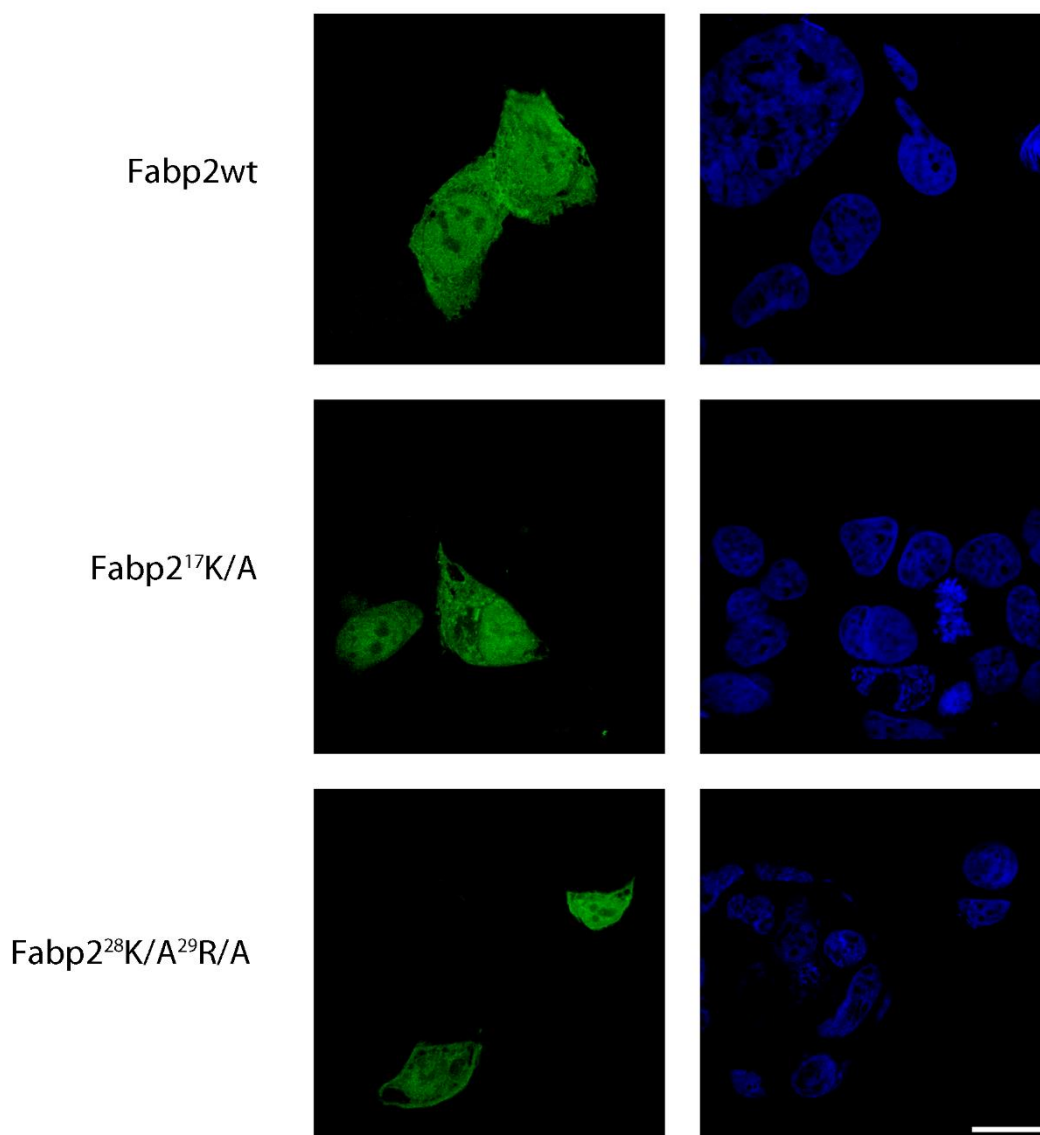


Figura 5.22. Localización de las proteínas Fabp2¹⁷K/A-EGFP y Fabp2²⁸K/A²⁹R/A-EGFP. Cultivos de células Caco-2 en presencia de SFB, transfectadas con los plásmidos *fabp2*wt-pCDNA3-EGFP, *fabp2*¹⁷K/A-pCDNA3-EGFP y *fabp2*²⁸K/A²⁹R/A-pCDNA3-EGFP. Azul: DAPI, Verde: proteína de fusión a EGFP, según corresponda. Barra 20 μ m.

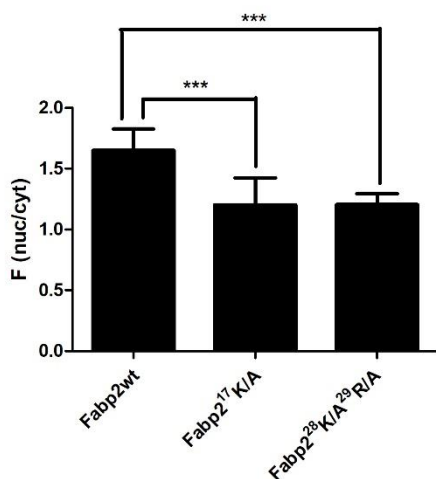


Figura 5.23. Cuantificación de la relación núcleo/citoplasma F(nuc/cyt) de la intensidad de fluorescencia en células transfectadas con el plásmido *fabp2*wt-pCDNA3-EGFP, *fabp2*¹⁷K/A-pCDNA3-EGFP y *fabp2*²⁸K/A,²⁹R/A-pCDNA3-EGFP. Se contaron 30 células para cada condición. Las barras de error indican el desvío estándar. Test t de Student: *** p < 0.01.

5.3. Estudio de estructura y capacidad de unión al ligando de las proteínas recombinantes salvaje y mutantes

Paralelamente con los ensayos de cultivo celular, se generaron de forma recombinante las cinco isoformas estudiadas de Fabp2, con la finalidad de verificar si las mutantes no contenían cambios que afectaran tanto su estructura como su función como transportador de ácidos grasos.

5.3.1. Expresión de Fabp2wt y mutantes recombinantes.

Se realizó la expresión de las proteínas recombinantes Fabp2wt y mutantes en *E. coli* BL21 (DE3) Star, utilizando el medio de cultivo autoinductor ZYM5052 a 37°C durante 20 horas. El tamaño esperado para las cinco proteínas es de 14 kDa, cuyas secuencias aminoacídicas son las indicadas en la Figura 5.24.

Fabp2wt	MTFNGTWKVDNRNENYEKFMQMGVNMVKKRLAAHDNLKITLEQTGDKFNVKEVSTFRTLE	60
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁹ R/A, ³⁰ K/A	MTFNGTWKVDNRNENYEAFMEQMGVNMVKAALAAHDNLKITLEQTGDKFNVKEVSTFRTLE	60
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	MTFNGTWKVDNRNENYEAFMEQMGVNMVAAKLAHDNLKITLEQTGDKFNVKEVSTFRTLE	60
Fabp2 ¹⁷ K/A	MTFNGTWKVDNRNENYEAFMEQMGVNMVKKRLAAHDNLKITLEQTGDKFNVKEVSTFRTLE	60
Fabp2 ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	MTFNGTWKVDNRNENYEKFMQMGVNMVAAKLAHDNLKITLEQTGDKFNVKEVSTFRTLE	60

Fabp2wt	INFTLGVTFDYSLADGTELTGWSVIEGDTLKGTFTRKDNKGVLTTVRTIVNGELVQSYSY	120
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁹ R/A, ³⁰ K/A	INFTLGVTFDYSLADGTELTGWSVIEGDTLKGTFTRKDNKGVLTTVRTIVNGELVQSYSY	120
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	INFTLGVTFDYSLADGTELTGWSVIEGDTLKGTFTRKDNKGVLTTVRTIVNGELVQSYSY	120
Fabp2 ¹⁷ K/A	INFTLGVTFDYSLADGTELTGWSVIEGDTLKGTFTRKDNKGVLTTVRTIVNGELVQSYSY	120
Fabp2 ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	INFTLGVTFDYSLADGTELTGWSVIEGDTLKGTFTRKDNKGVLTTVRTIVNGELVQSYSY	120

Fabp2wt	DGVEAKRIFKRA	132
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁹ R/A, ³⁰ K/A	DGVEAKRIFKRA	132
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	DGVEAKRIFKRA	132
Fabp2 ¹⁷ K/A	DGVEAKRIFKRA	132
Fabp2 ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	DGVEAKRIFKRA	132

Figura 5.24. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de Fabp2wt, Fabp2¹⁷K/A, Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A, Fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A, y Fabp2²⁸K/A²⁹R/A. En rojo se destacan las mutaciones realizadas.

Una vez realizada la inducción de expresión de las proteínas, se realizó la lisis celular y la extracción de la fracción total de proteínas solubles intracelulares para proceder a su purificación de acuerdo a trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Canclini, 2010).

5.3.2. Purificación de Fabp2wt y mutantes recombinantes.

En primer lugar, se realizó una precipitación con sulfato de amonio al 30 y 50 % de manera sucesiva. A continuación, las muestras se dializaron y concentraron para el siguiente paso de purificación.

Como segundo paso de purificación se empleó cromatografía de exclusión molecular. Los perfiles de elución obtenidos se muestran en la Figura 5.25. Las muestras coincidentes con los picos de absorción que indica cada cromatograma fueron evaluados por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 5.26), observándose una banda de tamaño esperado, correspondiente a cada isoforma de Fabp2.

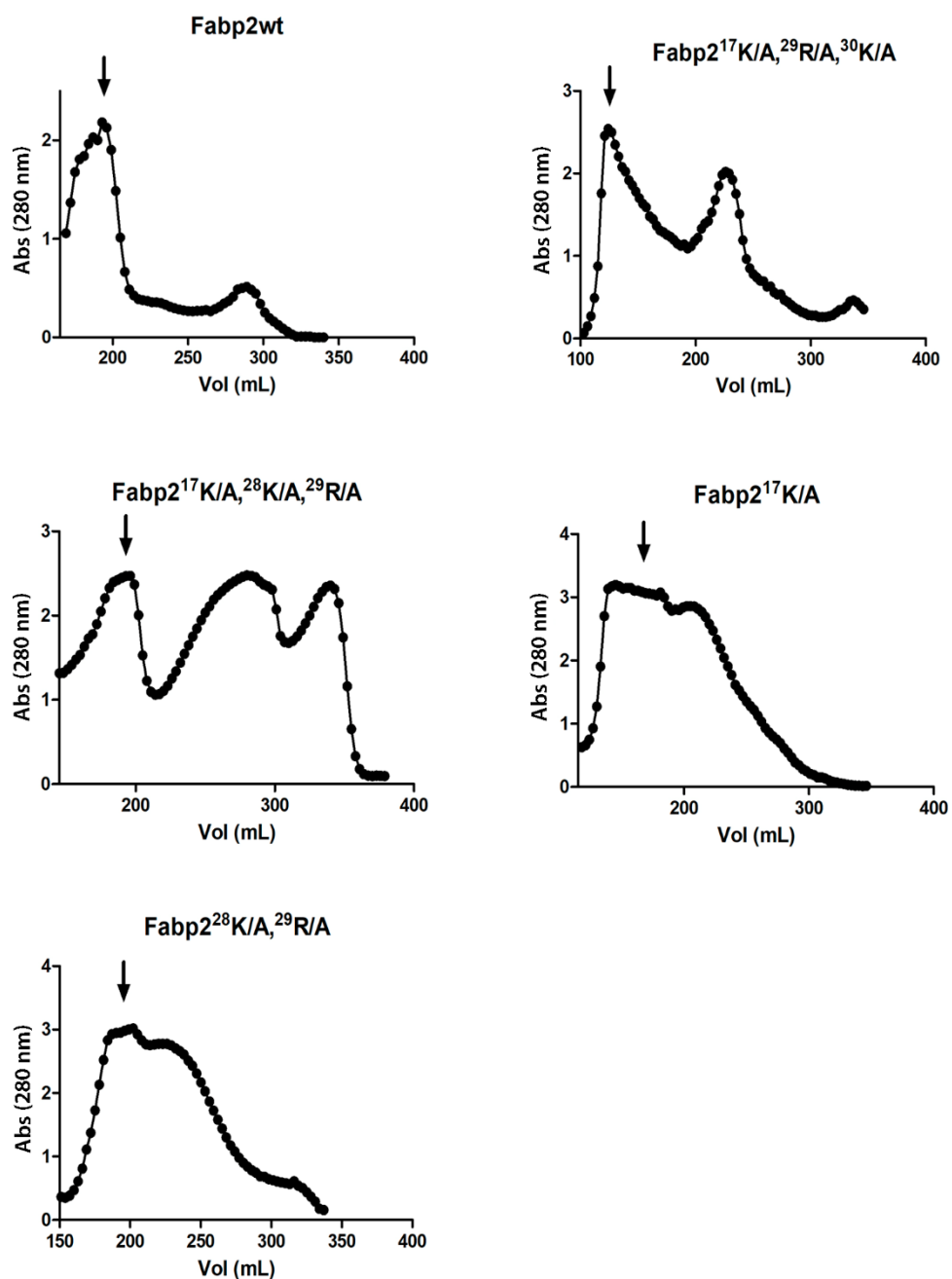


Figura 5.25. Purificación de Fabp2wt y mutantes. Perfiles de elución de cromatografías de exclusión molecular. La flecha indica el pico correspondiente a la elución de cada proteína.

Los resultados obtenidos nos indican que las proteínas eluyeron a volúmenes similares, siendo para Fabp2wt entre 178 y 208 mL, para Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A entre 199 y 238 mL, para Fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A entre 184 y 208 mL, para Fabp2¹⁷K/A entre 142 y 190 mL y para Fabp2²⁸K/A²⁹R/A entre 160 y 205 mL.

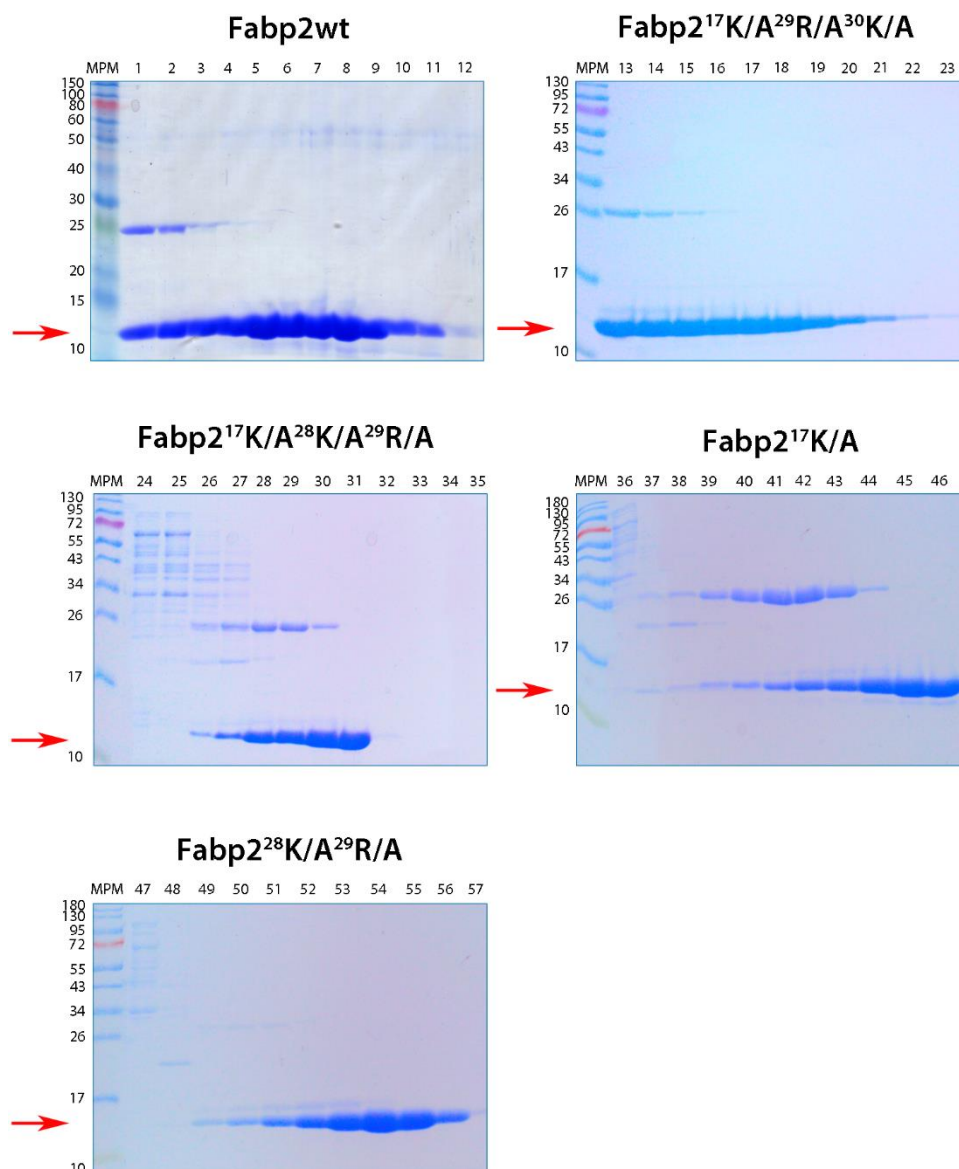


Figura 5.26. Evaluación de la purificación por cromatografía de exclusión molecular de Fabp2wt y mutantes. Electroforesis SDS-PAGE. MPM: Marcador de peso molecular, con sus correspondientes tamaños. En los siguientes carriles se muestran fracciones alternadas de los picos de elución para Fabp2wt; Fabp2¹⁷K/A; Fabp2¹⁷K/A²⁹R/A³⁰K/A; Fabp2¹⁷K/A²⁸K/A²⁹R/A y Fabp2²⁸K/A²⁹R/A. Las flechas rojas indican las bandas de tamaño esperado.

Para todas las proteínas se observó un comportamiento similar durante la purificación. Como puede observarse en los perfiles electroforéticos, en las primeras fracciones colectadas se observa la co-elución con una proteína contaminante de aproximadamente 25 kDa, aumentando la pureza en las siguientes fracciones. Se realizó espectros de absorción entre 240 y 340 nm a aquellas fracciones obtenidas consideradas puras, (Figura 5.27). Los resultados obtenidos, no muestran un espectro típico de

proteínas, con un máximo de absorción a 260 nm para todas las muestras, indicando una probable contaminación con ácidos nucleicos.

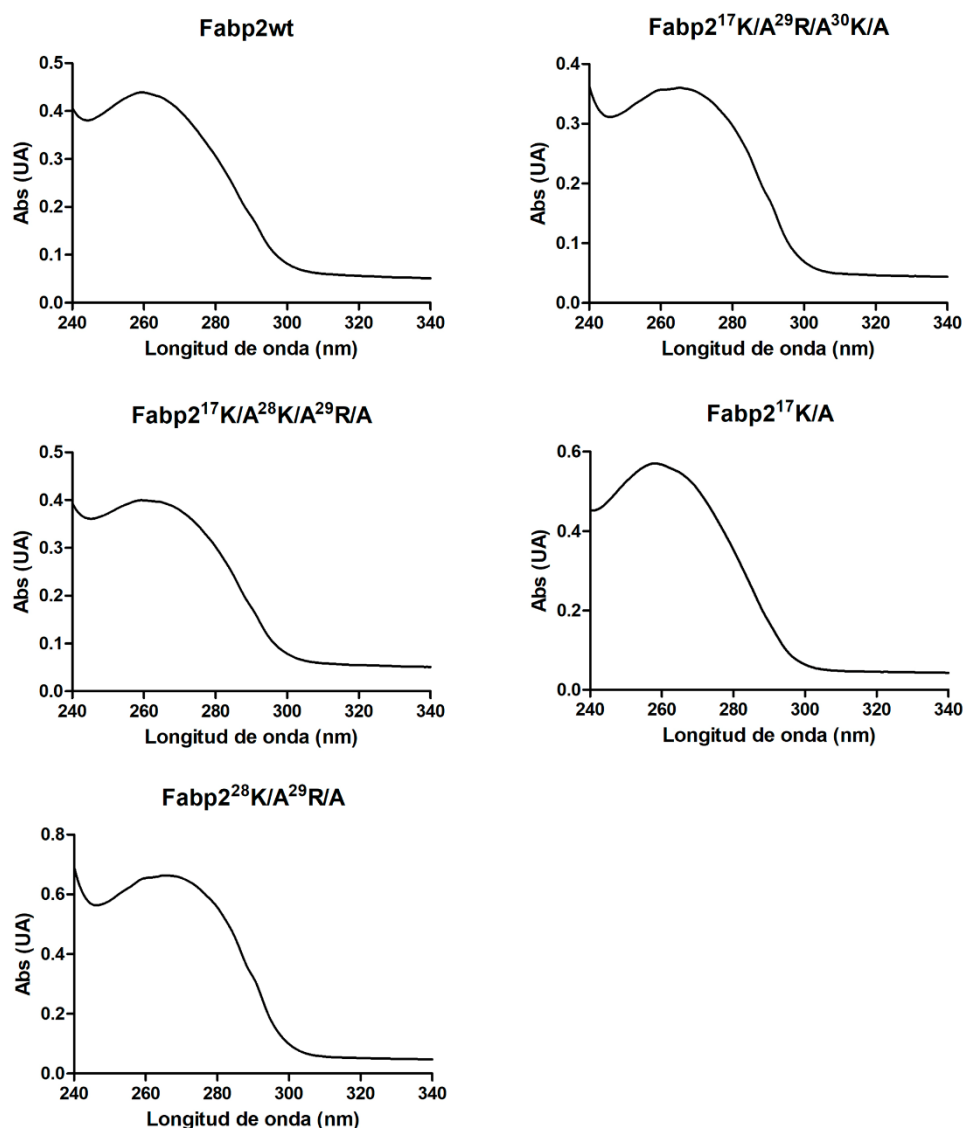


Figura 5.27. Espectros de absorción en UV de proteínas recombinantes entre 240-340 nm.

Teniendo en cuenta los espectros de absorción atípicos obtenidos, se procedió a realizar un tercer paso de purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico incluyendo las fracciones en las cuales se encontró cada isoforma de Fabp2, así como la proteína contaminante de mayor peso molecular. Para ello se calcularon los puntos isoeléctricos teóricos para cada proteína (Tabla 5.2), utilizando la herramienta *online* ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Las muestras a purificar fueron diluidas al sexto para disminuir su concentración inicial de cloruro de sodio, resultando en un volumen aproximado para cada proteína de 150 mL.

Tabla 5.2. Cálculo teórico del punto isoeléctrico para la proteína Fabp2 y mutantes.

Proteína	Punto isoeléctrico
Fabp2wt	7.9
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁹ R/A, ³⁰ K/A	5.4
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	5.4
Fabp2 ¹⁷ K/A	6.6
Fabp2 ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	5.8

Cada cromatografía fue realizada utilizando un intercambiador aniónico a pH 7, en el cual las proteínas se encontraban cercanas a su estado de carga neta cero o levemente cargadas. Durante la elución por gradiente de fuerza iónica, no se evidenció ningún pico de absorbancia a 280 nm, por lo tanto, se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE tanto el percolado como los lavados (Figura 5.28). Estos resultados muestran que las proteínas de interés eluyeron mayoritariamente en el percolado y una fracción menor en los lavados, teniendo en cuenta los volúmenes de cada fracción. Por otro lado, la proteína contaminante de mayor peso molecular eluyó únicamente en los lavados.

Para evaluar el grado de la purificación se realizaron espectros a luz UV, tanto al percolado como a los lavados (Figura 5.29). Según lo observado, se continuó trabajando con las proteínas obtenidas en los percolados, para las cuales se obtuvieron los espectros esperados, con un máximo de absorción a 280 nm, y un “hombro” aproximadamente a los 287 nm, debido a la presencia de residuos de triptófano.

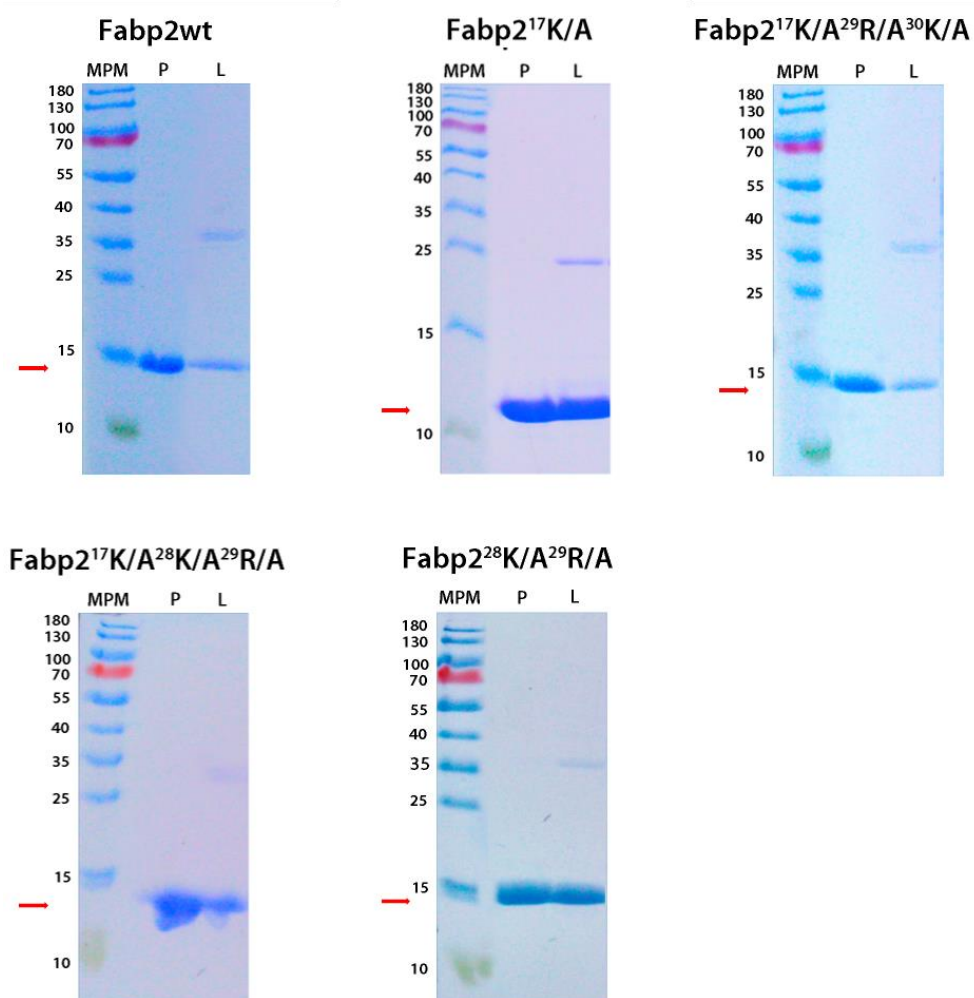


Figura 5.28. Evaluación de la purificación por cromatografía de intercambio iónico de Fabp2wt y mutantes. MPM: Marcador de peso molecular con sus correspondientes tamaños. En los carriles P se muestran las fracciones correspondientes a los percolados, y en los L los lavados.

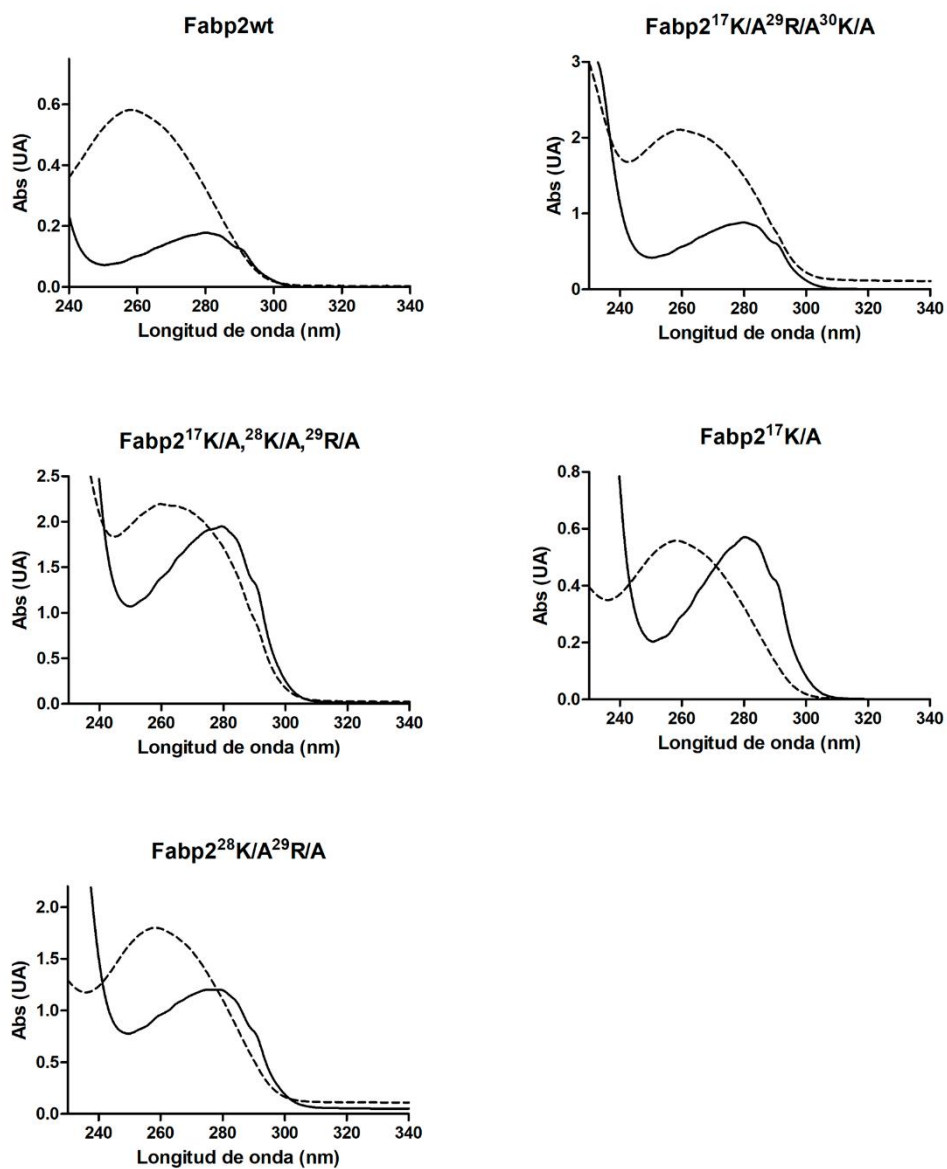


Figura 5.29. Espectros de absorción en luz UV de las fracciones obtenidas durante la purificación de Fabp2 y mutantes. Las líneas punteadas indican los espectros correspondientes a los lavados, y las líneas continuas a los percolados.

Estos resultados indican que el contaminante cuyo máximo de absorción es a 260 nm podría estar asociado a la proteína de 25 kDa.

A continuación, se concentraron los percolados a aproximadamente 8 mL para cada proteína y se dializaron contra agua desionizada. Se dosificaron las muestras finales mediante absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar teórico calculado, de $16960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, tanto para la proteína salvaje como para las mutantes. Las concentraciones finales obtenidas se detallan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Dosificación de las proteínas recombinantes Fabp2wt y mutantes.

Proteína	Concentración μM	Concentración mg/mL
Fabp2wt	55	1.04
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁹ R/A, ³⁰ K/A	38	0.73
Fabp2 ¹⁷ K/A, ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	80	1.54
Fabp2 ¹⁷ K/A	117	2.25
Fabp2 ²⁸ K/A, ²⁹ R/A	84	1.62

5.3.3. Estudios estructurales mediante Dicroísmo circular

Los estudios de dicroísmo circular que realizamos para determinar si se produjeron cambios estructurales detectables por este método, requieren de un alto grado de pureza de las proteínas a ser analizadas al igual que los ensayos de unión a ligandos. Para la evaluación de la pureza requerida para los análisis posteriores se analizó cualitativamente la presencia de otros contaminantes proteicos mediante electroforesis SDS-PAGE teñidos con azul Coomassie. Para ello se sembraron distintas cantidades de las proteínas recombinantes previamente purificadas, realizando diluciones seriadas al décimo, partiendo de una carga inicial de proteínas de 30 μg (Figura 5.30). Según resultados observados no habrían proteínas contaminantes capaces de detectar en ninguna de las concentraciones sembradas.

Finalmente, las muestras fueron liofilizadas para facilitar su transporte, y ser conservadas hasta su próximo uso.

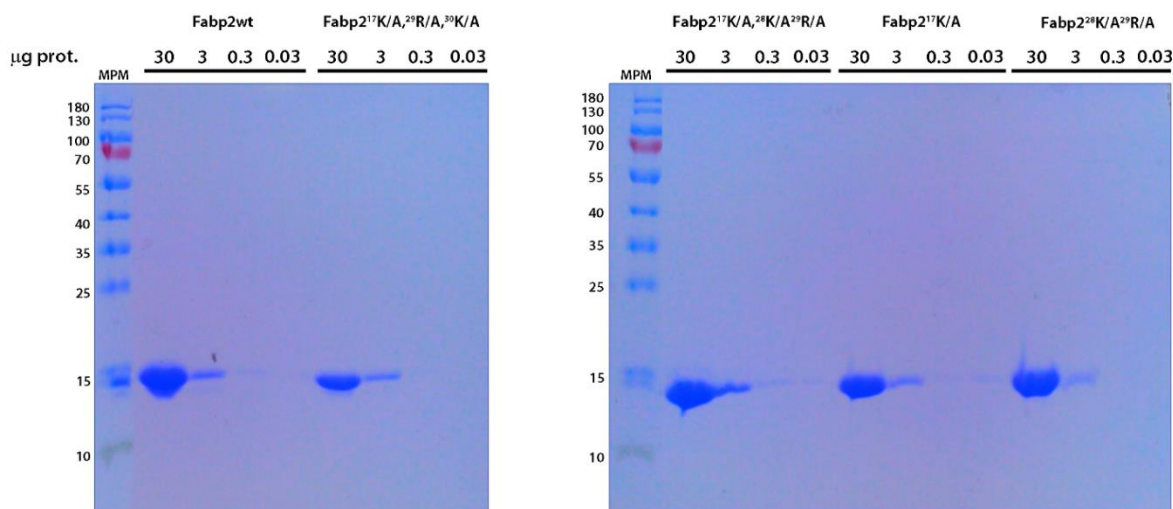


Figura 5.30. Evaluación de la pureza de las proteínas recombinantes generadas. Análisis semicuantitativo por electroforesis SDS-PAGE de la presencia de contaminantes sembrando distintas cantidades de proteína: 30, 3, 0.3 y 0.03 μg prot. MPM: marcador de peso molecular.

Se realizó el estudio estructural de las proteínas recombinantes mediante CD para evaluar si las mutaciones realizadas impiden el correcto plegamiento de las proteínas. Se realizó el análisis de la estructura secundaria por CD lejano y el de estructura terciaria por CD cercano (Figura 5.31). Los resultados obtenidos muestran que en cuanto a la comparación de estructura secundaria las variantes son idénticas dentro del error experimental de la técnica. En el gráfico de CD lejano (Figura 5.31 A) se observa que todas tienen la señal típica de láminas beta (máximo el 196 nm y mínimo en 216 nm), estructura secundaria mayoritaria en estas proteínas (Bernlohr et al., 1997). Además, se obtuvieron señales de intensidad similares a las reportadas (Clérico et al., 2000; Clérico et al., 2011). En cuanto al CD cercano (Figura 5.31 B), el gráfico muestra que respecto a la estructura terciaria las variantes también son muy similares, debido a la posición de los mínimos en el espectro.

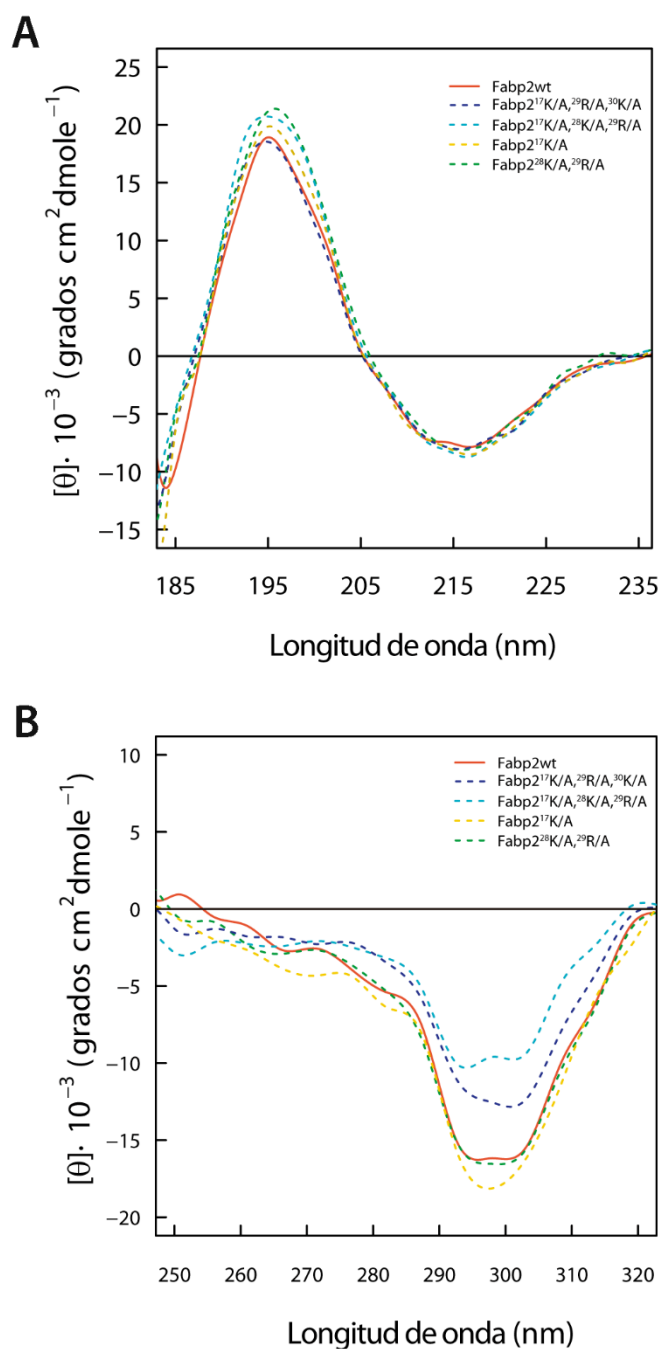


Figura 5.31. Análisis estructural de las proteínas recombinantes Fabp2wt y mutantes. A: CD lejano. B: CD cercano

Por lo tanto, en base a este estudio, es posible afirmar que las mutaciones realizadas no involucran grandes cambios que puedan afectar la conformación general de las variantes.

5.3.4. Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16

Una vez determinado que los mutantes no tenían cambios estructurales detectables por Dicroísmo circular, nos propusimos determinar si se había alterado la capacidad de unión a los ácidos grasos. Para ello, en primer lugar se realizó la delipidación en columna de las proteínas recombinantes generadas. El proceso se realizó dos veces para cada isoforma, de modo de asegurar una mejor captura del análogo de ácido graso BODIPY FL-C16, que usamos como ligando en los ensayos de unión. Este ligando, fluoresce en un ambiente hidrofóbico y ha sido ampliamente empleado en estudios con este tipo de proteínas (Thumser y Storch, 2007; Karsenty et al., 2009). Posteriormente a la delipidación se realizó la dosificación por absorbancia a 280 nm (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Dosificación de las proteínas recombinantes Fabp2wt y mutantes luego de la delipidación.

Proteína	Concentración μM	Concentración mg/mL
Fabp2wt	25	0.37
Fabp2 ¹⁷ K/A ²⁹ R/A ³⁰ K/A	6.2	0.09
Fabp2 ¹⁷ K/A ²⁸ K/A ²⁹ R/A	8.37	0.12
Fabp2 ¹⁷ K/A	53.2	0.80
Fabp2 ²⁸ K/A ²⁹ R/A	42.1	0.63

Se realizaron los espectros de absorción y emisión del BODIPY FL C16 tanto en un solvente hidrofóbico (etanol), como en un solvente hidrofílico (*buffer* Tris 30 mM pH 8.3) con y sin la presencia de la proteína Fabp2wt recombinante (Figura 5.32 A y B). Estos resultados muestran que el máximo de **excitación** se encuentra en 510 nm. Asimismo, el máximo de emisión se ubica en 518 nm sin depender de la polaridad del solvente. Dada la cercanía de los máximos de excitación y emisión, se optó por realizar los ensayos posteriores excitando a 510 y realizando las medidas de emisión a 530 nm.

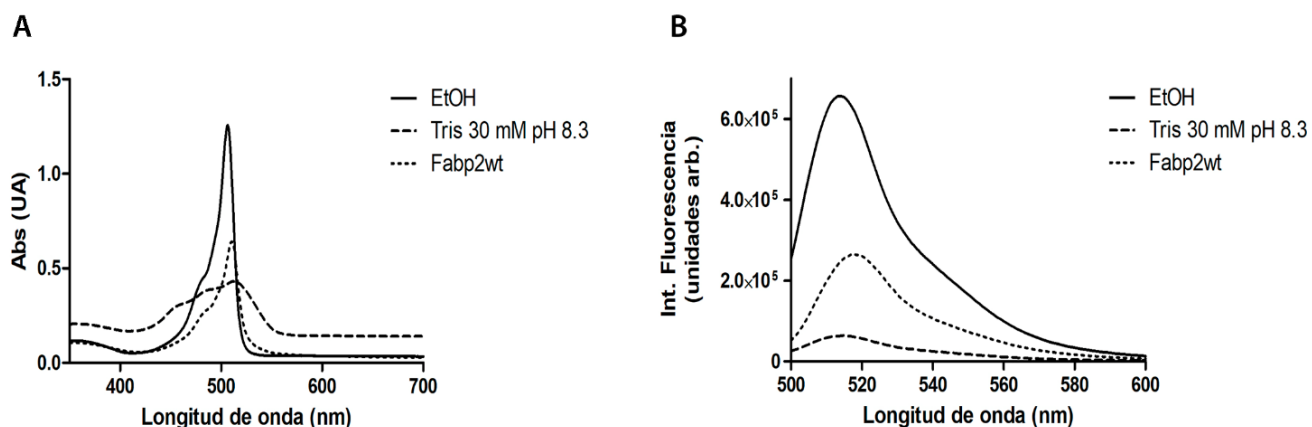


Figura 5.32. Propiedades espectrales del BODIPY FL C16 en etanol (EtOH), Buffer Tris 30 mM pH 8.3, y unido a Fabp2wt. **A:** Espectros de absorción del BODIPY FL C16 15 μ M. **B:** Espectros de emisión del BODIPY FL C16 0.5 μ M. Los espectros con Fabp2 se realizaron con una relación molar BODIPY FL C16 – Fabp2wt 1:1.

Para evaluar la capacidad de unión al ligando tanto de la proteína salvaje como las mutantes, se calculó la constante de disociación (Kd) de la unión BODIPY FL C16 – proteína a partir de curvas de saturación (Figura 5.33). Realizando el ajuste hiperbólico a las correspondientes curvas, se obtuvieron las constantes indicadas en la Tabla 5.5.

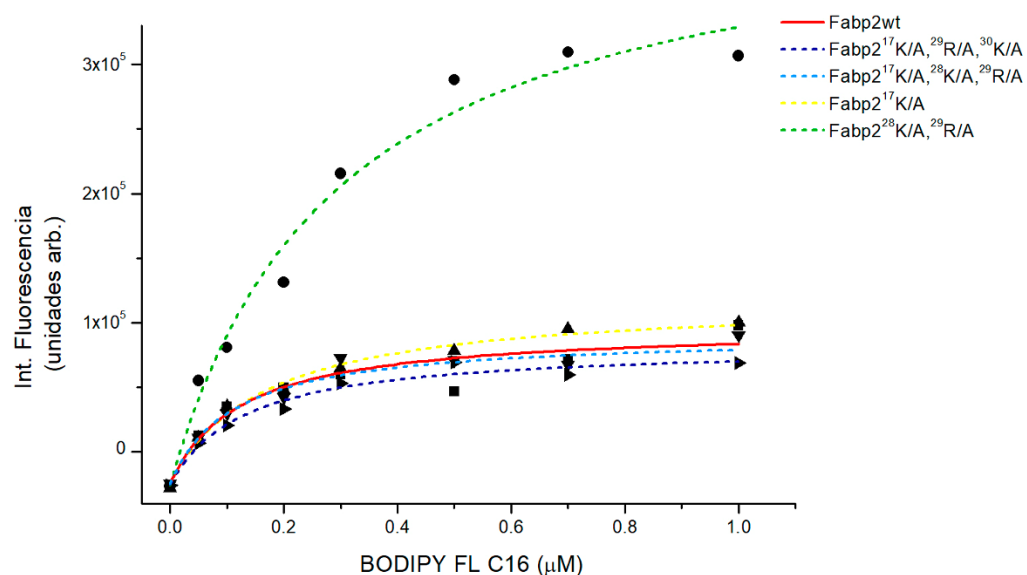


Figura 5.33. Determinación de la afinidad de unión del BODIPY FL C16 a la Fabp2wt y los mutantes generados. Las muestras contienen 0.5 μ M de la correspondiente proteína, y concentraciones variables de BODIPY FL C16. Para las medidas de Intensidad de fluorescencia se utilizó un λ_{exc} =510 nm y λ_{em} =530 nm.

Tabla 5.5. Constantes de disociación de la unión del BODIPY FL C16 a Fabp2wt y los mutantes generados.

Proteína	Constante de disociación Kd (μM)
Fabp2wt	0.126
Fabp2 ¹⁷ K/A ²⁹ R/A ³⁰ K/A	0.129
Fabp2 ¹⁷ K/A ²⁸ K/A ²⁹ R/A	0.112
Fabp2 ¹⁷ K/A	0.163
Fabp2 ²⁸ K/A ²⁹ R/A	0.296

Considerando estos resultados, es posible afirmar que todas las proteínas son capaces de unir el ligando fluorescente. Las constantes de afinidad calculadas se encuentran en el orden de las reportadas previamente (Thumser y Storch, 2007). Por lo tanto, las sustituciones aminoacídicas no estarían impidiendo la capacidad de las proteínas a unir el ligando. Asimismo, según las Kd obtenidas, las proteínas muestran una afinidad de unión muy similar a la de la proteína salvaje, a excepción del mutante Fabp2²⁸K/A²⁹R/A, cuya Kd fue considerablemente mayor.

Efecto de la dieta en el nivel de expresión de *fabp2* en el intestino de *Danio rerio*.

En una segunda parte, este trabajo de tesis se focalizó en el efecto de una dieta rica en lípidos en la expresión del transcripto de *fabp2*, a distintos intervalos luego de la ingesta. Se emplearon peces machos y hembra adultos, que se separaron en dos grupos, los que no recibieron alimento por 24 h y los que fueron alimentados con yema de huevo luego de las mismas horas de ayuno. El grupo que recibió alimento (30 peces), se sacrificó a diferentes intervalos luego de la ingesta. La cuantificación de la expresión se realizó mediante qPCR.

5.4. Extracción de ARN de muestras de intestino de *Danio rerio*.

Se aisló el ARN total del intestino anterior de cinco peces por cada grupo utilizando el reactivo Trizol. Los grupos estudiados fueron: no alimentados (NA), alimentados (A), seguido del tiempo postprandial en horas de 0.5, 1.5, 3, 4, 6, 10 h. Las muestras obtenidas fueron dosificadas mediante absorbancia a 260 nm y se evaluó su calidad por el cociente de absorbancia a 260/280 nm (Tabla 5.6). Además, como otro indicador de la calidad de las muestras se analizó su perfil electroforético en gel de agarosa 1% (Figura 5.34).

Tabla 5.6. Dosificación de los ARN totales extraídos y cocientes 260/280.

Condición	Concentración de ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cociente 260/280
NA	1.60	1.99
A 0.5	0.73	2.04
A 1.5	1.80	2.00
A 3	0.88	2.07
A 4	0.82	2.09
A 6	0.88	2.09
A 10	0.80	1.99

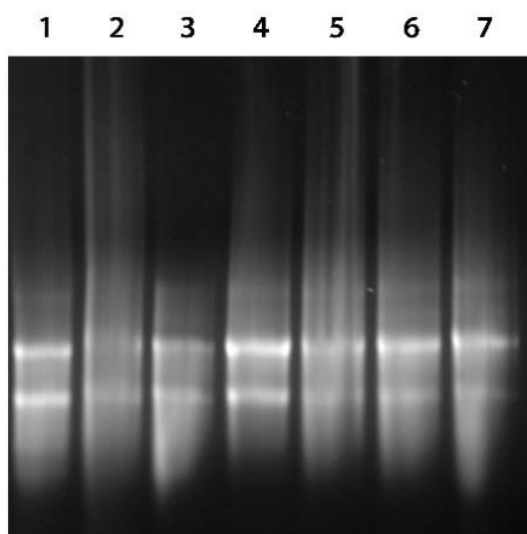


Figura 5.34. Control de calidad de ARN totales extraídos. Electroforesis en gel de agarosa 1 %. 1: NA; 2: A 0.5; 3: A 1.5; 4: A 3; 5: A 4; 6: A 6; 7: A 10.

Mediante este resultado es posible observar las bandas correspondientes a los ARN ribosomales, lo cual sugiere una adecuada integridad de los ARN totales extraídos.

5.5. Retrotranscripción del ARN mensajero.

Se realizó la síntesis *in vitro* de ADN copia (cDNA) a partir de las muestras de ARN total previamente purificadas. Las muestras se dosificaron por absorbancia a 260 nm (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Dosificación mediante absorbancia a 260 nm.

Condición	Concentración de cDNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
NA	1.07
A 0.5	0.89
A 1.5	1.01
A 3	0.74
A 4	0.95
A 6	0.90
A 10	0.83

4.6. PCR en tiempo real

Para evaluar el nivel de expresión de *fabp2* en las distintas condiciones alimentarias, se realizó la cuantificación relativa de la expresión del gen de interés respecto al gen normalizador *eef1a1*. Para ello se diseñaron cebadores específicos utilizando la secuencia depositada en el GenBank para *fabp2* de *Danio rerio* (NM_131431.1).

Previo a los ensayos de cuantificación, se calcularon las eficiencias de amplificación de cada una de las parejas de cebadores a partir de la pendiente del gráfico de los valores de amplificación CT en función de la cantidad de ADN de las muestras obtenidas por diluciones seriadas. A partir de las curvas estándar (Figura 5.35) se calcularon los valores de eficiencias correspondientes, resultando para *fabp2* 95.4 % y para el gen normalizador 98.4 %. Vale destacar que los valores de eficiencias poseen entre sí menos de 10% de diferencia, lo cual habilita a continuar con el análisis cuantitativo

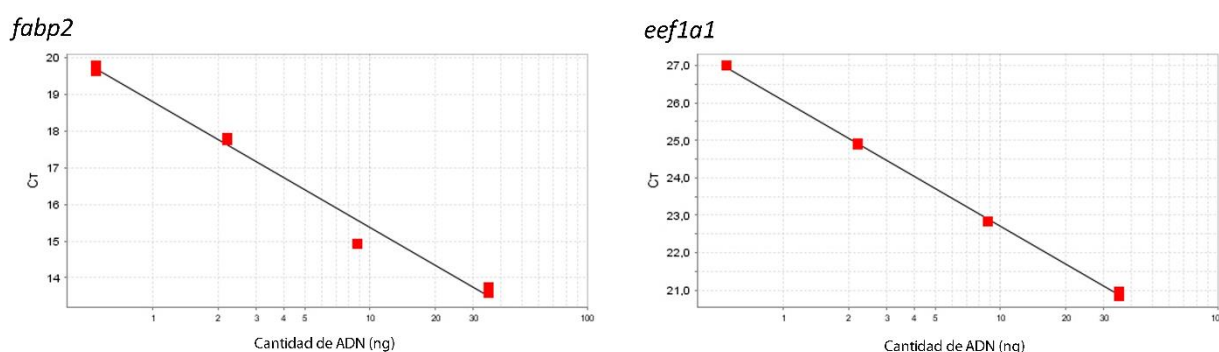


Figura 5.35. Curvas estándar para el cálculo de eficiencias del par de cebadores específicos para *fabp2* y *eef1a1* utilizando como molde diluciones seriadas a partir de 35 ng del plásmido *fabp2*-pET5a o cDNA respectivamente.

Se analizaron además para cada reacción las curvas de *melting* obtenidas, y se constató la presencia de un único pico indicando la amplificación de un solo producto de amplificación.

Para la cuantificación de los valores relativos de la expresión de *fabp2* los datos fueron analizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2011). Para ello, los valores fueron normalizados con el gen de referencia *eef1a1*, y los cambios en los valores de expresión se determinaron en relación con las muestras control. Los valores de *fold change* (FC) obtenidos mediante qPCR se muestran en la Figura 5.36.

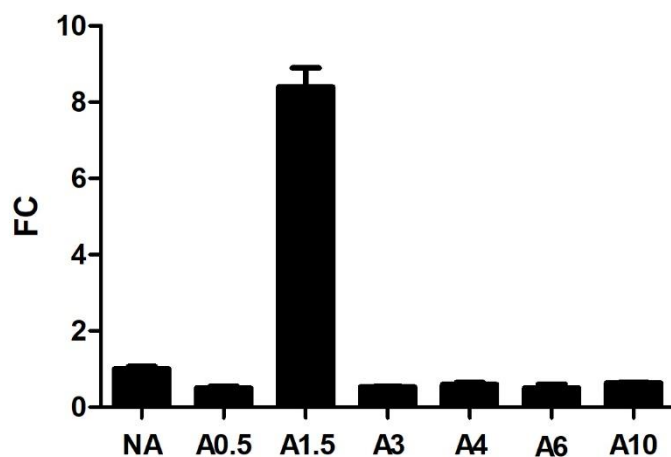


Figura 5.36. Cuantificación relativa de la expresión de *fabp2* en el intestino anterior de *Danio rerio*. FC: fold change. NA: no alimentados, A0.5: alimentados media hora, A1.5: alimentados una hora y media; A3: alimentados tres horas, A4: alimentados cuatro horas, A6: alimentados seis horas, A10: alimentados 10 horas. Los datos representados corresponden a muestras unificadas de 5 intestinos realizados en tres experimentos. La barra de error indica la variación de las réplicas técnicas mediante desvío estándar.

En base a los resultados obtenidos, la expresión de *fabp2* en el intestino anterior de *D. rerio* se ve alterada únicamente una hora y media después de la alimentación con una dieta rica en ácidos grasos. Este cambio representa un aumento de la expresión de *fabp2* de 8.3 veces respecto a la condición no alimentados.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo nos propusimos realizar la búsqueda una NLS que explique los mecanismos que regulan el ingreso de la proteína Fabp2 de *Danio rerio* en el núcleo del enterocito y determinar el efecto de una dieta rica en lípidos de la expresión del gen *fabp2*.

Estudio de los mecanismos moleculares que regulan el ingreso al núcleo de la proteína Fabp2 de *Danio rerio*.

6.1. Estudios *in silico*.

Antecedentes recientes de nuestro grupo de investigación han reportado por primera vez la presencia de la proteína Fabp2 en el núcleo del enterocito de *Danio rerio*. Además, utilizando peces cebra adultos alimentados con el análogo de ácido graso de cadena larga BODIPY FL C12, demostraron la co-localización de este ligando y Fabp2 a nivel nuclear en el enterocito. Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que Fabp2 podría tener un rol importante en la regulación de la expresión de genes vinculados al metabolismo lipídico, vía activación de receptores nucleares dependiente del ligando.

FABP2 así como el resto de las proteínas de la familia no tienen una señal de localización nuclear (NLS) consenso. La mayoría de las proteínas que no contienen una NLS en su secuencia primaria pueden sin embargo moverse entre el núcleo y el citoplasma, planteando la pregunta de cómo se realiza su tránsito. Se ha manejado la posibilidad de que la entrada de las FABPs con su ligando se realice a través del poro nuclear dado que sus tamaños lo permiten. También se ha sugerido que la proteína ingresa sin el ligando y lo une una vez en la matriz nuclear (Schroeder et al., 2008). Se ha demostrado para otras proteínas de unión a lípidos intracelulares (iLBPs), la presencia de una NLS tridimensional. Este tipo de NLS fue confirmada por primera vez para la proteína CRABP-II (proteína de unión a ácido retinoico II) compuesta por los aminoácidos básicos K21, R29 y K30 (Sessler et al., 2005) posicionados en las hélices α I y II. Posteriormente se describieron señales muy similares para FABP4 y FABP5 mediante estudios en cultivo celular mutando los residuos propuestos, concluyendo que los aminoácidos K21, R30 y R31 y K24, R33 y K34 respectivamente forman parte de la NLS (Ayers et al., 2007; Gillilan et al., 2007; Armstrong et al., 2014). El alineamiento de los miembros de esta familia de proteínas muestra que algunas podrían contener una NLS idéntica a las descritas, mientras que otras como FABP2 no la tendría.

Por otro lado se observó que la activación de la señal de FABP4 es ligando específica en tanto la troglitazona y el ácido linoleico son capaces de activar la señal, y no el ácido oleico. El efecto no activador podría ser específico de esta proteína ya que en otras, el ácido oleico promueve la translocación nuclear de algunas FABPs (Hughes et al., 2015). En las FABPs se ha definido una región portal formada por la hélice α II y la región que comprende los dos bucles β adyacentes (C-D y E-F), que actuaría como puerta de entrada de los ácidos grasos (Hodsdon et al., 1996; Hodsdon y Cistola, 1997a; Hodsdon y Cistola, 1997b). En particular para FABP4 en esta región se ubica la Fenilalanina 57 (F57), el cual participaría también en la activación de la señal. Mediante estudios *in silico*, se demostró que cuando FABP4 está unida a ácidos grasos no activadores como el oleico, palmítico, esteárico y araquidónico, los ligandos provocan el cambio de posición de la F57 hacia una posición definida por los autores como abierta. Sin embargo, la unión a ligandos activadores como linoleico o la troglitazona muestran la F57 en una conformación cerrada. El estado apo muestra una posición intermedia de este residuo entre el estado abierto y cerrado. (Gillilan et al., 2007). Los modelos que hemos realizados de Fabp2 muestran que la F56 se posiciona de forma cerrada cuando está unida a ácido oleico y palmítico, sugiriendo que ambos son activadores de la NLS. Nuestros posteriores ensayos en cultivo celular confirmaron que estos ácidos grasos promueven la translocación nuclear. En la posición cerrada inducida por ligandos activadores en FABP4, la F57 entra en contacto con la Valina 32 (V32) de la hélice α II, quedando en posición paralela y empujándola hacia afuera. En cambio, en la conformación abierta observada para la unión de ligandos no activadores, F57 empuja la V32 hacia el lado opuesto. A su vez, la V32 está directamente adyacente a los residuos K31 y R30 que forman parte de la NLS de FABP4 y por lo tanto serían importante para exponer estos aminoácidos cuando la proteína se une a ligandos activadores (Gillilan et al., 2007). En este sentido, realizamos la búsqueda *in silico* de aminoácidos que respondan a este mecanismo en el modelo realizado de Fabp2 unido a ligandos que estimulan la translocación nuclear. Se encontró que la Leucina 31 (L31), se ubica de forma muy similar a la V32 de FABP4. Asimismo, las distancias entre F57 y V32 de FABP4 y F56 y L31 de Fabp2 son también semejantes. Por lo tanto, en Fabp2, la L31 por tratarse de un aminoácido con igual polaridad que la V32 de FABP4, podría ser la encargada de interaccionar con la fenilalanina y provocar el corrimiento de la hélice α II al unirse a ligandos activadores. Consideramos que será necesario profundizar en estudios estructurales a través de la obtención de cristales y/o mutagénesis dirigida sobre estos residuos que apoyen esta hipótesis.

6.2. Ensayos en cultivo celular.

Según el modelo realizado de Fabp2, se localizaron los residuos básicos K17, R29 y K30 que se posicionan de manera muy similar a la NLS tridimensional descrita para FABP4 (Gillilan et al., 2007), considerando también la presencia de K28 en la misma región. A partir de ello, se procedió a realizar mutantes para los residuos aminoacídicos seleccionados, de modo de determinar si su sustitución por Alaninas impide el ingreso al núcleo de esta proteína.

Las regiones codificantes de *fabp2wt* y los mutantes generados, fueron clonadas en el vector pCDNA3-EGFP para los estudios de translocación nuclear en la línea celular Caco-2. Este vector está diseñado para la expresión transitoria y estable de proteínas en células de mamífero. Dicho vector presenta el promotor temprano de citomegalovirus (CMV), un promotor fuerte que promueve la alta expresión de proteínas. Por otro lado, el vector pCDNA3-EGFP permite generar proteínas de fusión a la proteína fluorescente EGFP, lo cual facilita su posterior visualización en ensayos de cultivo celular. Las proteínas de fusión se diseñaron de tal forma que el vector posee la región codificante, ya sea para *fabp2wt* como la de los mutantes, hacia la región 5' de la secuencia codificante de la *egfp*. Así mismo, para unir las dos proteínas se diseñó una región "linker" constituida por cuatro repeticiones de residuos de Glicinas y Alaninas. De esta forma, se genera una proteína con la misma estrategia estructural que tienen las proteínas nativas compuestas por dos o más dominios unidos por péptidos linkers (Chen et al., 2013). Este linker sirve como conexión entre mitades de proteínas, pero también posee varias otras funciones tales como el mantenimiento cooperativo inter-dominios (Gokhale y Khosla, 2000), o preservar la actividad biológica (Ikebe et al., 1998). Se han realizado varios análisis sobre la estructura de proteínas multidominios para el desarrollo de diseño de linkers en proteínas de fusión. Estudios realizados mostraron que la longitud óptima de residuos para esta región es de entre 6 y 10 aminoácidos (Argos, 1990; George y Heringa, 2002). Los linkers flexibles son usualmente aplicados cuando la unión entre dominios requiere un cierto grado de movimiento o interacción. Dichas uniones generalmente contienen aminoácidos pequeños no polares como Glicina, o polares como Serina. También pueden poseer residuos adicionales tales como Treonina y Alanina para mantener la flexibilidad. La presencia de aminoácidos de pequeño tamaño colabora también con permitir la movilidad de la conexión entre dominios (Chen et al., 2013). En el caso de proteínas recombinantes de fusión a GFP ha sido reportado este tipo de linkers flexibles para ensayos de plegamiento rápido de proteínas (Waldo et al., 1999).

Las construcciones generadas se utilizaron para transfectar cultivos de la línea celular Caco-2. Esta línea celular se utilizó como modelo eucariota para estudiar si los residuos sugeridos como integrantes de la señal, favorecían la translocación nuclear de la proteína Fabp2wt de *Danio rerio* y los mutantes generados. Las células Caco-2 en su estado diferenciado son ampliamente utilizadas como el modelo de enterocito en lo que refiere a la asimilación de lípidos (Rodríguez Sawicki et al., 2017; Buttet et al., 2016; Karsenty et al., 2009; Trotter et al., 1991). Sin embargo, varios trabajos han utilizado esta línea celular en su estado indiferenciado como modelo en el estudio del nivel de transcripción de FABP1 mediante la activación de PPAR α , δ y γ (Poirier et al., 2001), así como para estudios del metabolismo lipídico y del rol de la microbiota intestinal en la regulación de PPAR γ y la activación de FABP2 (Couvigny et al., 2014). Particularmente en este trabajo optamos realizar los análisis de translocación nuclear con la línea celular Caco-2 en su estado indiferenciado, dado la facilidad y el costo reducido de su cultivo en estas condiciones, ya que se trataron de los primeros ensayos realizados por nuestro grupo en líneas celulares con este propósito.

En primer lugar, se realizaron transfecciones con la construcción conteniendo la región codificante para la proteína salvaje para la puesta a punto del método y el estudio de su localización celular. Los resultados obtenidos mostraron que dicha proteína se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma cuando las células son cultivadas en presencia de suero fetal bovino. Asimismo, cuando las células transfectadas son cultivadas en presencia de ácido oleico y ácido palmítico aumenta la localización nuclear de la proteína. Este resultado está acorde con lo descrito para FABP2 humana donde se ha observado que en cultivos de células COS-7 en presencia de ácido oleico se promueve la translocación nuclear de dicha proteína e induce la activación de PPAR α (Hughes et al., 2015). Es interesante mencionar que se ha observado que el ácido palmítico promueve la heterodimerización de los receptores PPAR α y LXR α formando el complejo capaz de ejercer su función como factores de transcripción (Balanarasimha et al., 2014). Por otro lado, antecedentes de nuestro grupo han demostrado la presencia de Fabp2 en el núcleo del enterocito de peces cebra adultos (Esteves et al., 2016). Por lo tanto, estos resultados sugieren que Fabp2 de *D. rerio* podría tener un rol en la regulación de la expresión génica vía receptores de tipo PPAR, el cual es activado en presencia de ácido oleico y ácido palmítico.

En cuanto a la búsqueda de los aminoácidos que podrían componer la NLS de Fabp2, se realizó la superposición a la señal descrita para FABP4 con un modelo generado por homología de Fabp2. En nuestro modelo, los aminoácidos básicos K17, R29 y K30, poseen una localización espacial muy similar a la descrita en FABP4, y con las

propiedades bioquímicas características de la NLS. Sin embargo, los estudios en cultivos celulares, mutando por Alaninas los aminoácidos propuestos, demostraron que ésta no es la señal de localización buscada. La ausencia de los residuos K17, R29 y K30 no impide el ingreso al núcleo celular, de hecho, su localización nuclear aumenta. Igual resultado se obtuvo suplementando los cultivos con ácidos grasos, confirmando que este triplete no participa como señal de localización nuclear. A pesar de que este aumento es estadísticamente significativo, biológicamente podría ser insignificante, por lo cual no ha sido considerado.

Dada la cercanía dentro de la secuencia primaria de Fabp2wt de otro aminoácido básico (K28) a la señal propuesta inicialmente, se generó otra serie de mutantes para continuar con la búsqueda de la NLS. Los resultados obtenidos muestran que la sustitución por Alaninas de los aminoácidos K17, K28 y R29 impide el ingreso al núcleo celular, incluso en presencia de ligandos promotores de la translocación verificados previamente, como el ácido oleico. Por lo tanto, dichos aminoácidos están involucrados en la señal de localización que regula el ingreso al núcleo de Fabp2 de *D. rerio*.

Finalmente nos propusimos desglosar la señal descrita (K17, K28 y R29), buscando si todos los aminoácidos que la componen son imprescindibles para la translocación nuclear o solo alguno de ellos. Los resultados obtenidos muestran que la mutación de K17 individual, así como el par K28, R29, disminuyen la localización nuclear de la proteína en forma parcial, con un menor efecto que el cambio de los tres aminoácidos simultáneamente. Por lo tanto, la contribución de estos aminoácidos para la funcionalidad de la NLS sería únicamente en conjunto, e independientemente no tendrían ningún efecto.

Por otro lado, notamos que las células Caco-2 transfectadas con la construcción mutante correspondiente a la NLS encontrada (*fabp2*^{17K/A²⁸K/A²⁹R/A}-pCDNA3_EGFP) poseen una morfología distinta a las células transfectadas con el resto de las construcciones, e incluso los controles. La observación mediante microscopía confocal muestra a las células en un aparente estado de estrés o muerte celular, a pesar de que esto no fue comprobado por otra metodología. Es por este hecho que consideramos de especial importancia la confirmación de que la estructura y la capacidad de unir el ligando de las proteínas mutantes no se encuentra alterada debido de los cambios aminoacídicos realizados, ya que podría existir la agregación proteica en cuerpos de inclusión, que provoquen como consecuencia la muerte celular. Como muestran los resultados, es posible afirmar que tanto estructural como funcionalmente no existen cambios significativos que puedan afectar la viabilidad celular, por lo tanto, descartamos que este sea el motivo del cambio morfológico. En base a esto, podríamos pensar que este hecho es consecuencia de la acumulación de proteínas en el citosol, debido al

impedimento a su transporte al núcleo, lo que provoca una situación de estrés para las células Caco-2.

6.3. Expresión y purificación de Fabp2wt y mutantes recombinantes.

Con el objetivo de evaluar si los cambios aminoacídicos realizados provocan cambios conformacionales que puedan tener consecuencias a nivel estructural y funcional, paralelamente se generó cada proteína de forma recombinante. Como sistema de expresión de proteínas recombinantes se utilizó *Escherichia coli* como célula hospedera. Este modelo ha sido extensamente utilizado para expresar FABPs en grandes cantidades. Dado su pequeño tamaño, su alta solubilidad en medio acuoso, y la ausencia de modificaciones post-traduccionales en la proteína nativa, hacen de *E. coli* un sistema adecuado para expresarlas (Hauerland y Spener F, 2004; Chmurzynska, 2006; Storch J y McDermott, 2009; Jakobsson et al., 2003). En general, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* requiere plásmidos con número de copias de moderado a alto, con un promotor fuerte, altamente regulado, cuya inducción sea simple y de bajo costo (Jana y Deb, 2005). Además, el plásmido debe proporcionar el sitio de unión al ribosoma que asegure la iniciación de la traducción de la manera más eficiente (Sprengart y Porter, 1997). Particularmente para las FABPs se han utilizado una importante variedad de plásmidos para dirigir su expresión, pero el sistema pET ha sido el más eficiente en cuanto a las cantidades de proteína obtenida (Peeters, et al., 1991; Fujita, et al. 1995; Hsu y Storch, 1996; Schaap et al., 1996; Alvite et al., 2001; Hagan et al., 2008; Franchini et al., 2008). Este tipo de vectores están presentes en múltiples copias dentro de la célula (40 copias por célula, en promedio), lo cual tiene un efecto directo sobre el nivel de expresión del gen de interés.

En el sistema de vectores pET, el gen de interés se clona bajo el control de señales de transcripción y traducción del bacteriófago T7, requiriendo de una cepa bacteriana que aporte la ARN polimerasa del fago T7 (ARNpol T7), para expresar el gen de interés (Studier y Moffatt, 1986). Las cepas conocidas como DE3 poseen el gen de la ARNpol T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Ante el agregado de un inductor (IPTG o lactosa) se promueve la producción de la ARNpol T7, la cual posteriormente podrá reconocer el promotor T7 y activar la transcripción del gen de interés en grandes cantidades. En este trabajo se realizó la expresión de las proteínas utilizando la cepa de *E. coli* BL21(DE3) como sistema de expresión, el vector de expresión pET5a y utilizando el medio de cultivo autoinductor ZYM5052, que posee como molécula inductora la lactosa. Los cultivos bacterianos crecidos en este medio de cultivo alcanzan densidades ópticas cercanas a 20 UA provocando la producción de grandes cantidades de proteína (Studier, 2005).

Posteriormente las proteínas fueron purificadas, basándose en el protocolo puesto a punto en Esteves et al., 2016 con algunas modificaciones debido al grado de pureza requerido. En primer lugar, se realizó la precipitación con sulfato de amonio, en la cual todas las isoformas ensayadas se mantuvieron solubles al ser sometidas a la sal, tanto al 30% como al 50%. Por este motivo, podríamos considerar que los cambios aminoacídicos realizados no generan parches hidrofóbicos significativos, que provoquen un cambio en la solubilidad de las proteínas. A continuación, se realizó el segundo paso de purificación mediante una cromatografía de exclusión molecular, en la cual se observó un comportamiento similar de todas las proteínas. El peso molecular de la Fabp2 es aproximadamente 14 kDa, y ante un límite de fraccionamiento entre 10 y 100 kDa, es de esperar una elución tardía, dada la cercanía del tamaño de la proteína al límite inferior de exclusión. Por otro lado, el uso de este tipo de cromatografía permite descartar en las fracciones puras, la presencia de proteínas truncadas, agregadas, o formas parcialmente plegadas de las mismas (Campbell et al., 1979; Vallet, 1979). Al completar este paso de purificación, una vez confirmada la identidad de las proteínas recombinantes por peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE, se evidenció por espectrofotometría UV la presencia de contaminantes, cuyo máximo de absorción se encuentra a 260 nm. Durante la producción y posteriores pasos de purificación de proteínas recombinantes, es muy frecuente que se de la contaminación por ADN de la célula hospedera en el producto proteico final. En general este tipo de contaminación suele ser muy pequeña, y en los casos que los requiere, como en la producción de las proteínas recombinantes con interés terapéutico, la detección se realiza por PCR cuantitativa (Fazelahi et al., 2017; Peper et al., 2014; Wang et al., 2012). En este caso, la contaminación observada fue suficiente para enmascarar la presencia de las proteínas en el espectro en luz UV. Consideramos que esta contaminación se debe al hecho de realizar etapas de purificación que no contengan pasos de adsorción, proceso en el cual se adsorberían las proteínas de interés a una resina, y mediante los lavados se eliminarían las impurezas de las muestras. En particular en la cromatografía de exclusión molecular, estas proteínas de pequeño tamaño eluyen en conjunto con contaminantes pequeños presentes, como podrían ser fragmentos de ADN bacterianos generados durante la sonicación. Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a un tercer paso de purificación realizando una cromatografía de intercambio iónico. Para esta etapa se utilizó un intercambiador aniónico, de modo de que el ADN contaminante se uniera a la resina, y las proteínas eluyeran en el percolado.

En el diseño de este ensayo, se procedió a la búsqueda de un protocolo útil para la purificación de las cinco proteínas. Para ello se procedió a realizar la cromatografía en un pH en el cual las proteínas se encontraran con carga neta cero, o levemente negativas, dependiendo del punto isoeléctrico de cada una. A su vez, antecedentes de nuestro grupo han mostrado que estas proteínas son estables a pHs entre 7-8, por lo cual se optó por no trabajar fuera de ese rango. Así mismo, se utilizó durante la etapa

de adsorción una concentración de NaCl cercana a 25 mM, de modo de evitar las interacciones débiles inespecíficas, así como la de aquellas isoformas que a pH 7 se encuentran levemente negativas. El resultado de la cromatografía mostró que las FABPs eluyeron en el percolado. A diferencia de lo esperado, el posible ADN contaminante eluyó en conjunto con la proteína contaminante de 25 kDa detectada previamente. Este resultado sugiere que es dicha proteína quien podría estar unida al ADN del hospedero, y es por ello que está en las fracciones en las cuales se encuentra se detecta el ácido nucleico. Finalmente, se obtuvieron las proteínas puras, las que presentaron los espectros en luz UV típicos de proteínas, mostrando un máximo de absorción a 280 nm, y un “hombro” aproximadamente a los 287 nm, por la presencia de residuos de triptófano.

6.4. Estudios estructurales mediante Dicroísmo circular.

La evaluación de la pureza de cada una de las proteínas se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE teñidos con Azul Commassie, según el criterio establecido por el Dr. Ermácora para realizar dicroísmo circular. Los resultados obtenidos mostraron que no se visualizan proteínas contaminantes a ninguna de las concentraciones ensayadas.

El dicroísmo circular (CD) actualmente se considera una técnica adecuada para el análisis estructural de proteínas en solución. En esta técnica se ven señales sólo donde ocurre la absorción de la radiación, y por lo tanto los espectros de bandas pueden ser fácilmente asignables a distintas estructuras características de las moléculas. En proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm), las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (absorción en el rango de 260 a 320 nm) y los enlaces disulfuro (Kelly et al., 2005). Además, los cofactores también pueden absorber luz UV en todo el rango del espectro (Berova et al., 2000). Los diferentes tipos de información que se puede obtener mediante los estudios de CD incluyen: composición de estructura secundaria, espectros de identidad según la estructura terciaria, integridad de sitios de unión a cofactores, conclusiones sobre las características estructurales de proteínas bajo distintas condiciones, cambios conformacionales y plegamiento de proteínas, entre otros (Kelly et al., 2005).

El análisis de la estructura secundaria se realiza a partir del estudio de la absorción en la región de 240 nm hacia longitudes de onda menores, originada principalmente por el enlace peptídico. Las señales se visualizan debido a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ centradas alrededor de 220 nm, y más intensamente la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ cercanas a 190 nm (Hammes, 2005; Berova et al., 2000). Las estructuras secundarias que se encuentran en las proteínas muestran distintas características en el espectro del CD en el UV lejano (entre 190 y 250 nm). Estas señales originadas por el

enlace peptídico se visualizan cuando éste se localiza en un ambiente regular plegado (Kelly y Price, 1997). Las intensidades de las transiciones van a depender de los ángulos de torsión del enlace peptídico. Por lo tanto, las hélices α , las hojas β y las estructuras helicoidales aleatorias van a dar lugar a un espectro de CD lejano de forma y magnitud característica (Kelly et al., 2005). En el CD lejano, el espectro correspondiente a la estructura de hojas β se muestra negativo a 218 nm y positivo a 196 nm. Para las hélices α se observa un máximo a 192 nm y dos mínimos 208 y 222 nm. En el caso de estructuras al azar, generalmente se observa un espectro positivo a 212 nm y negativo a 195 nm (Manavalan y Johnson, 1987; Kelly et al., 2005). Por lo tanto, la fracción de cada tipo de estructura secundaria que está presente en cualquier proteína se puede determinar analizando cualquier espectro de CD en UV lejano como una suma de espectros de referencia para cada tipo de estructura secundaria que componen la proteína. De todas formas, aunque el CD lejano muestra un promedio de la totalidad de las moléculas analizadas, la técnica no es tan poderosa como para determinar cuáles son los residuos específicos que participan en cada región (Berova et al., 2000; Kelly et al., 2005).

Por otro lado, el CD en la región del espectro del UV cercano (250- 320 nm) es sensible a ciertos aspectos de la estructura terciaria de las proteínas. Las señales obtenidas son originadas por los residuos aromáticos y enlaces disulfuro, las cuales son sensibles a la estructura terciaria que forma la proteína en su totalidad (Kelly et al., 2005). Las señales en la región de 255 a 270 nm se atribuyen al grupo fenil de los residuos de la fenilalanina, mientras que las señales entre 275 a 285 nm se atribuyen al grupo indol del triptófano. Los enlaces disulfuro dan lugar a amplias señales débiles en todo el espectro UV cercano (Kelly et al., 2005; Kelly y Price, 2000; Kelly y Price, 1997; Purdie et al., 1989). El espectro del CD cercano puede ser sensible a pequeños cambios en la estructura terciaria debido a interacciones proteína-proteína y/o cambios en las condiciones del disolvente (Purdie et al., 1989) y las intensidades son mucho más débiles que en la región del CV lejano, por lo cual en general se requieren mayores cantidades de proteína (Kelly y Price, 2000; Kelly y Price, 1997; Purdie et al., 1989). La forma y magnitud del espectro del CD cercano van a depender del número de cada tipo de aminoácido aromático presente, su movilidad, la naturaleza del ambiente (formación de enlaces de hidrógeno, grupos polares, etc.) y la disposición espacial dentro de la proteína. Por este motivo, dicho espectro es denominado una “huella digital” de la estructura terciaria de la cada proteína (Kelly et al., 2005)

Estas características del CD comentadas previamente son de gran utilidad para la comparación de conformaciones dentro de una misma proteína. Frecuentemente es necesario demostrar que una modificación en una proteína genera conformaciones equivalentes, de modo de realizar adecuadamente ensayos que requieran la funcionalidad de la proteína en su estructura nativa como en nuestro caso. Por ejemplo, luego de una modificación en una proteína, el CD es considerada una buena herramienta

para comparar la estructura de la forma modificada respecto a la salvaje, en términos de cambios conformacionales o posibles formaciones de agregados proteicos (Tafreshi et al., 2007; Protasevich et al., 1997; Hadizadeh Shirazy et al., 2007).

En este trabajo se utilizó la técnica de CD tanto lejano como cercano de modo de determinar si las estructuras mutantes generadas poseen alteraciones en cuanto a su estructura tridimensional. Los resultados obtenidos sobre la estructura secundaria de Fabp2wt muestran la señal típica de láminas β (máximo a 196 nm y mínimo en 218 nm), siendo ésta la estructura mayoritaria en esta familia de proteínas (Bernlohr et al., 1997). Además, se obtuvieron señales de intensidad similares a las reportadas previamente (Clérico et al., 2000; Clérico et al., 2001). Una vez confirmada la estructura secundaria de esta proteína, se determinó que los mutantes generados eran muy similares entre sí, y con respecto a la proteína salvaje. En cuanto a la estructura terciaria, los resultados revelados por las curvas de actividad óptica también muestran que debido a la posición de los mínimos en el espectro, las estructuras son muy similares entre sí dentro del error experimental de la técnica. En cuanto a las diferencias entre las intensidades de los espectros, es altamente probable que se deban a diferencias en la dinámica de la estructura. Esto es, en la amplitud de las fluctuaciones conformacionales de la misma estructura terciaria. Por lo tanto, podemos concluir que las formas mutantes de Fabp2 no han sido alteradas desde el punto de vista estructural a causa de los cambios aminoacídicos realizados.

6.5. Ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16.

Por otro lado, se analizó si tanto la proteína salvaje como las mutantes mantenían la capacidad de unión a ácidos grasos. La proteína Fabp2 posee un solo sitio de unión al ligando y presenta preferencia por los LCFA saturados (Córsico et al., 1998; Thumser y Storch, 2007). En el estudio de la captura de los LCFA, se han utilizado ligandos radiomarcados, los cuales han sido desplazados por el uso de ligandos fluorescentes (Pagano et al., 1991; Pagano et al., 1998). Inicialmente se utilizaban lípidos marcados con nitrobenzoxadiol (NBD), pero recientemente se ha optado por utilizar lípidos marcados con el BODIPY ya que posee características que lo destacan. En particular, el BODIPY es un fluoróforo no polar, y por lo tanto se ancla mejor a las bicapas que los lípidos marcados con NBD para lo que refiere a estudios de captado y localización celular. Por otro lado, el BODIPY es foto estable, y tiene una fuerte absorción en la región azul-verde del espectro visible. Finalmente, este fluorocromo es adecuado y sumamente útil para su observación mediante microscopía confocal (Kaiser y London, 1998; Johnson et al., 1991; Chen et al., 1997; Wolf et al., 1992).

Para el caso de las FABPs, se han realizado varios estudios utilizando el BODIPY FL C16 para estudiar tanto la capacidad de unión al ligando *in vitro*, como en ensayos de

cultivo celular (Thumser y Storch, 2007; Karsenty et al., 2009; McIntosh et al., 2009; Hostetler et al., 2010; Li et al., 2012). Se ha sugerido a través de estudios cinéticos que este análogo de ácido graso de cadena larga BODIPY FL C16 se une a la FABP2 en una configuración que se superpone parcialmente con el sitio de unión natural del ácido oleico (Thumser y Storch, 2007). Por este motivo es que optamos realizar los estudios de funcionalidad de las Fabp generadas utilizando este ligando en ensayos de saturación.

En primer lugar, se realizaron los espectros de absorción y emisión del BODIPY FL C16 en solventes con distinta polaridad. En este trabajo, hemos verificado lo observado en reportes anteriores, donde el BODIPY FL C16 posee características de absorción espectral que muestran un máximo de absorción a 510 nm, aparentemente con poca influencia del entorno en el cual se encuentra, con un desplazamiento de Stokes relativamente pequeño de 8 nm. Sin embargo, aunque las longitudes de onda máximas de absorción y emisión muestran poca dependencia del entorno, la intensidad de fluorescencia observadas sí se ve notablemente afectada por la polaridad del ambiente. Nuestros resultados mostraron que el BODIPY FL C16 muestra una alta intensidad de emisión en etanol, y muy baja en el buffer acuoso Tris 30 mM. En presencia de Fabp2, la intensidad de fluorescencia aumenta, lo cual implica que el BODIPY FL C16 se encuentra en un ambiente más hidrofóbico que en su estado disuelto en solución. De esta forma verificamos que la proteína está uniéndose al ligando, posicionándose probablemente en el bolsillo hidrofóbico de Fabp2wt y como consecuencia muestra un aumento en la intensidad de fluorescencia.

Para evaluar si las mutaciones afectaron aspectos funcionales de la capacidad de unión al ligando, se realizaron ensayos de saturación de las proteínas por el agregado de concentraciones crecientes de BODIPY FL C16. Consideramos importante realizar ese análisis dada su relación con los estudios en cultivos celulares con adición de ligando, y así verificar que todas las isoformas tienen la capacidad de unir ácidos grasos. Se calcularon las constantes (K_d) de las proteínas para su unión con el BODIPY FL C16, considerando para todas un único sitio de unión al ligando (Córscico et al., 1998; Thumser y Storch, 2007). Los resultados obtenidos muestran que Fabp2wt posee una K_d de 126 nM, que se encuentra en el orden de lo reportado previamente (Thumser y Storch, 2007). Para el caso de los mutantes realizados, se observó que todas las variantes son capaces de unir el ligando fluorescente, sugiriendo que los cambios aminoacídicos realizados no imponen cambios conformacionales que afecten la unión *in vitro* del ligando. Los cálculos de las K_d realizados muestran que son todas muy similares, a excepción del mutante Fabp2^{28K/A29R/A}. Este resultado sugiere que la sustitución de únicamente la lisina 28 y/o arginina 29 estaría provocando cambios en el entorno químico que provoca una disminución en la afinidad de unión de esta variante al BODIPY FL C16. Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos de Fabp2wt y los mutantes

generados, podemos afirmar que los cambios de los aminoácidos realizados no afectan en forma global la estructura y función intrínseca de esta proteína. Este hecho nos permite validar los resultados de localización celular obtenidos en la línea Caco-2.

Efecto de la dieta en el nivel de expresión de *fabp2* en el intestino de *Danio rerio*.

En una segunda instancia, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de una dieta rica en ácidos grasos en la expresión de *fabp2* en el intestino de *D. rerio*. Este estudio fue una primera aproximación de las condiciones en las cuales la expresión de *fabp2* es máxima, dirigido a futuros estudios de la regulación del metabolismo lipídico.

En estos ensayos se emplearon peces adultos divididos en siete grupos, de los cuales un grupo estuvo 24 horas sin comer. El resto de los grupos experimentaron la misma cantidad de horas de inanición y posteriormente se los alimentó siendo sacrificados a distintos tiempos luego de la ingesta. Los peces fueron alimentados con yema de huevo, la cual es básicamente una emulsión de grasa en agua. Las cantidades aproximadas de los macronutrientes de la yema de huevo corresponden a un 59% de lípidos totales siendo éstos los más abundante; las proteínas representan un 34% y finalmente posee un 0.9% de carbohidratos totales. El resto de los componentes corresponden al agua, vitaminas y minerales. Dentro de la composición lipídica, se describe que un 41,2% corresponde a ácidos grasos monoinsaturados, 36% de ácidos grasos saturados, 18,1% de ácidos grasos poliinsaturados, 4,1% de colesterol y 0,6% de grasas trans (USDA National Nutrient Reference Database for Standar Reference). Por lo tanto, dada la composición descrita, el uso de yema de huevo como única fuente de alimentación para los peces sometidos a este estudio implica una dieta rica en lípidos, donde esperamos obtener un mayor grado de variación en la expresión de *fabp2*.

Los peces fueron sacrificados disecándose el intestino anterior. Estudios previos han demostrado que es en esta región proximal del intestino donde tiene lugar la absorción de los lípidos, y se expresan en forma abundante dos miembros de esta familia de proteínas, *Fabp1* y *Fabp2* (Gordon y Lowe, 1985; Lowe et al., 1987; Bass, 1988). A partir de las muestras intestinales se realizó la extracción del ARN total, seguido de la retrotranscripción para su utilización como molde en las reacciones de PCR en tiempo real. Se realizó el estudio mediante la cuantificación relativa de la expresión génica de *fabp2*, respecto al gen *housekeeping* del Factor de elongación 1 α (*eef1a1*), cuya eficacia como control interno ya ha sido reportada en ensayos muy similares (Esteves et al., 2016). Así mismo, para el estudio de cuantificación relativa se utilizó como condición

calibradora las muestras intestinales de peces no alimentados, realizándose contra ésta la comparación de los distintos tiempos post-alimentación.

El método de cuantificación relativa utilizado requiere el estudio de las eficiencias para cada par de *primers* utilizados, la cual representa la fracción de moléculas *target* que son copiadas en un ciclo de PCR. Siguiendo las indicaciones del método, las eficiencias deben ser cercanas al 100% individualmente, y ser similares entre sí, en particular entre las condiciones que se comparan (Livak et al., 2001). Para determinar las eficiencias de los pares de cebadores se emplearon como molde el plásmido *fabp2*-pET5a para *fabp2* y un *pool* de los cDNA de las condiciones alimentarias en estudio para la eficiencia de *eef1a1*. Para ambas se utilizaron diluciones seriadas al cuarto de estos ADN molde. A partir de los gráficos de concentración de cDNA versus C_T se obtuvieron valores de eficiencias cercanas al 100% para los dos genes evaluados, lo cual habilita a realizar la cuantificación relativa.

La cuantificación realizada mostró que la expresión de *fabp2* aumenta más de ocho veces, únicamente a la hora y media post-ingesta. Para el resto de las condiciones ensayadas no se encontró variación de este gen respecto al control no alimentados. De acuerdo con estos resultados, ensayos actuales de transcriptómica en curso por parte de nuestro grupo de investigación, mostraron que en peces sacrificados luego de tres horas de alimentados con una dieta baja en lípidos, la expresión de *fabp2* no aumenta respecto al control. Estos resultados obtenidos complementan los reportados previamente, donde ante una dieta con bajo contenido graso, la transcripción de *fabp2* en intestino anterior aumenta 1,59 veces respecto al control, en peces sacrificados dos horas luego de alimentados (Esteves et al., 2016). Demostramos así el efecto importante que tienen los lípidos en la regulación de *fabp2*. Además, nuestros resultados concuerdan con trabajos previos en donde en peces cebras alimentados con una dieta con alto contenido graso, se induce el aumento de la expresión de *fabp2* de mayor manera que con una dieta con bajo contenido graso (Karanth et al., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo aportan también, un dato temporal no incluido en otros ensayos publicados. Se ha reportado además, que los niveles de expresión son modulados según la composición lipídica de la dieta. Particularmente se ha observado un mayor aumento de los transcritos de *fabp2* en peces alimentados con dietas con alto contenido de ácido linolénico (Venkatachalam et al., 2013), componente que se encuentra presente en la yema de huevo.

El comportamiento observado de *fabp2* frente a la dieta proporcionada, sugiere que la expresión de éste podría estar regulado por factores de transcripción que se activarían por algunos de los ácidos grasos contenidos en la yema de huevo. Por otro lado, se ha demostrado que el receptor nuclear PPAR α tiene un rol clave en la regulación de la expresión génica mediada por la dieta en el intestino (Bunger et al., 2007). La

inducción de la expresión de FABP1 y FABP2 por PPAR α en el intestino se ha analizado a través de diferentes aproximaciones. Un aumento en los niveles de transcritos de *fabp1* y *fabp2* en intestino fueron determinados por *northern blot* en ratas luego de la administración de clofibrato, un activador del PPAR α (Bass et al., 1988). Empleando ratones *knockout*, Fujishiro y colaboradores determinaron la expresión de *fabp2* en el intestino de manera PPAR α dependiente (Fujishiro et al., 2002). Además, se ha demostrado *in vitro* que las FABPs cederían sus ligandos a estos receptores para provocar su activación. Mediante ensayos de transactivación se evidenció que el ácido oleico activa al receptor induciendo la expresión de un gen reportero. Este efecto se magnifica cuando están presentes las FABPs, sugiriendo que son estas últimas las que transfieren el ácido oleico al receptor activándolo. Es así que las FABPs, junto a los PPARs adquieren un papel clave en la regulación de las vías metabólicas involucradas en mantener el balance energético y en especial participando en la oxidación de las grasas. Por otro lado, dada la especificidad tisular de las FABPs podrían actuar selectivamente sobre los PPARs hecho que puede ser explotado terapéuticamente para promover la selección celular de agonistas de PPARs (Hughes et al., 2015).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo nos propusimos contribuir a la comprensión de los procesos moleculares que están implicados en el rol de la proteína intestinal de unión a ácidos grasos (Fabp2) de *Danio rerio* en el núcleo del enterocito.

En una primera sección estudiamos la posibilidad de la existencia de una señal de localización nuclear que regule la entrada al núcleo de Fabp2, basados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, que ubicaban a esta proteína transportando ácidos grasos *in vivo* al núcleo del enterocito del pez cebra. Según la bibliografía consultada y estudios *in silico* realizados, consideramos la presencia de una NLS tridimensional, posicionada en las hélices α de esta proteína. Apoyando esta hipótesis, verificamos en un modelo por homología la presencia de aminoácidos claves (F56 y L31) que podrían estar involucrados en la regulación de la señal permitiendo o impidiendo su activación. Actualmente nos encontramos trabajando en obtener la estructura cristalográfica de la proteína Fabp2wt, así como de los mutantes planteados posteriormente, para verificar estos estudios. Nos planteamos también la generación de nuevos mutantes que nos permitan elucidar el rol de la F56 y L31 en la activación de la señal.

Se planteó la generación de distintos mutantes con la finalidad de descifrar cuáles son los aminoácidos involucrados en una posible NLS que explique el ingreso de Fabp2 al núcleo del enterocito. Se seleccionaron los aminoácidos K17, K28, R29, K30 como posibles integrantes de la NLS, mediante el estudio *in silico*, en comparación a estudios realizados previamente en otras proteínas de la familia de las FABPs. Los residuos mencionados se sustituyeron por Alaninas generando una serie de mutantes en base a combinaciones de los mismos, y se subclonaron, en el vector pCDNA-EGFP, apto para la expresión transitoria en células eucariotas. En los estudios se incluyó la forma salvaje subclonada en el mismo vector.

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de transfección de la línea celular Caco-2, obteniéndose los resultados esperados en los controles positivos y negativos realizados, generándose un protocolo totalmente reproducible bajo las condiciones ensayadas. Los ensayos de transfección con el plásmido conteniendo la forma salvaje de Fabp2, mostraron que esta proteína se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula. Además, se demostró mediante la adición de ácidos grasos al medio de cultivo delipidado, que tanto el ácido oleico como el ácido palmítico promueven la localización nuclear de esta proteína.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante el análisis de las transfecciones con los plásmidos de los mutantes generados, mostraron que a pesar de posicionarse de forma muy similar a la NLS descrita para FABP4, la combinación de residuos de K17,

R29 y K30 no estaría implicada en la NLS tridimensional, dado que en ausencia de estos aminoácidos, y en presencia de ligandos inductores de la translocación nuclear, la proteína es capaz de ingresar al núcleo de las células Caco-2. Sin embargo, se observó que los aminoácidos K17, K28 y R29 están involucrados en la NLS de Fabp2. En ese sentido, la sustitución de estos residuos por Alaninas, en presencia de un ligando inductor de la translocación nuclear (ácido oleico), no promueve la localización nuclear. Por lo tanto, estos aminoácidos son importantes para realizar este proceso. Por otro lado, la inclusión de mutantes en nuestros ensayos de K17 por un lado, y K28 y R29 por otro mostró que las combinaciones aminoacídicas así ensayadas, no impiden la translocación nuclear de la proteína, si bien la proporción translocada es menor que cuando está el triplete. Por lo tanto, los tres residuos actuarían de forma cooperativa, siendo necesarios para actuar como NLS. Proponemos generar a futuro mutantes que posean individualmente las sustituciones de K28 y R29, y así confirmar o no si poseen una acción cooperativa en conjunto con los resultados obtenidos hasta el momento.

En cuanto a los cultivos celulares transfectados con la forma mutante para los aminoácidos K17, K28 y R29, se observaron cambios a nivel de la morfología de las células, sugiriendo que las mismas se encuentran bajo una situación de estrés o muerte celular. Probablemente este estado se deba a la acumulación de proteínas a nivel citoplasmático, dado el impedimento de su translocación nuclear por las mutaciones realizadas. Para confirmar esto pretendemos realizar estudios de muerte celular en las células transfectadas en comparación con aquellas transfectadas con la construcción salvaje.

A pesar de localizar cuáles son los aminoácidos involucrados en la NLS, quedan varias preguntas por contestar sobre cómo es el mecanismo molecular que permite el proceso de ingreso al núcleo, ya que hasta el momento otros autores han descartado la interacción con proteínas de la familia de las importinas. Proponemos realizar a futuro estudios de inmunoprecipitación en extractos totales de intestino de *D. rerio*, con la intención de capturar complejos proteicos de Fabp2 con proteínas involucradas en el transporte nuclear, que serán identificadas por espectrometría de masa. Para este procedimiento contamos con anticuerpos específicos para Fabp2 realizados por nuestro grupo de investigación. Asimismo, planteamos realizar ensayos de inmunolocalización con anticuerpos contra importinas.

Paralelamente a la generación de los mutantes y los ensayos de cultivo celular, nos propusimos evaluar si las isoformas de Fabp2 propuestas poseen cambios estructurales y funcionales significativos, como consecuencia de las variantes aminoacídicas realizadas. Para ello se expresaron de forma recombinante los cuatro mutantes estudiadas y la forma salvaje de Fabp2 de *D. rerio*. Los estudios de estructura secundaria y terciaria mediante dicroísmo circular mostraron que estructuralmente las

variantes mutantes son muy similares a la proteína salvaje, dentro del error experimental de la técnica. Por otro lado, mediante ensayos de unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16, se comprobó que todas las isoformas son capaces de unir el ligando, y por lo tanto los cambios aminoacídicos no implicarían modificaciones involucradas en su habilidad de unir ácidos grasos. Se determinó que las constantes de afinidad (Kd) de la proteína Fabp2wt por el BODIPY FL C16 es similar a la de todos los mutantes, excepto para la isoforma Fabp2²⁸K/A²⁹R/A que la Kd calculada es significativamente mayor. Consideramos que este aumento puede deberse a cambios en el entorno químico que provoquen variaciones en la unión del BODIPY FL C16 a la proteína. Nos proponemos a futuro estudiar la unión de ácidos grasos, mediante ensayos de desplazamiento de BODIPY FL C16 para todas las formas ensayadas, de modo de obtener las Kd para ligandos naturales.

La segunda sección de este trabajo se centró en el estudio del efecto de una dieta con alto contenido lipídico en los niveles de expresión de *fabp2* mediante qPCR en el intestino anterior de adultos de *D. rerio*. En estos ensayos se incluyeron muestras intestinales de peces sacrificados a distintos tiempos luego de la ingesta, en comparación con peces mantenidos 24 hs sin alimento. Los resultados obtenidos mostraron que el nivel máximo de expresión de *fabp2* se da luego de una hora y media de la ingesta, observándose un aumento de este transcrito de más de ocho veces respecto al control. Consideramos este estudio como una primera aproximación que nos brinda datos valiosos para futuros estudios de la regulación de la expresión de este gen. De todas formas, estos ensayos se confirmarán realizando al menos tres réplicas biológicas para cada condición, de modo de obtener resultados más representativos que los obtenidos mediante el uso de *pools* de muestras. Por otro lado, se determinará el perfil de expresión a nivel proteico mediante *western blot* cualitativo frente al mismo protocolo de alimentación de modo de poder relacionar la expresión de la proteína con la regulación de la expresión génica a través de PPARs en vías metabólicas vinculadas a los lípidos.

Finalmente, mediante este trabajo creemos que se ha podido contribuir al estudio del rol nuclear de FABP2, quedando planteadas interrogantes que intentaremos responder en el futuro. En primer lugar, en un futuro cercano trataremos de confirmar si la unión al ligando es quien promueve que esta proteína se dirija al núcleo, o si Fabp2 ingresa al núcleo en ausencia de ligando. Actualmente nos encontramos en la planificación de estos experimentos, donde se transfectarán células Caco-2 con la construcción que posee la isoforma salvaje en presencia de ácidos grasos activadores, adicionando al medio de cultivo un inhibidor de la unión al ligando, el HTS01037, cuya eficacia ha sido demostrada para otras FABPs (Hertzel et al., 2009). En primer lugar, analizaremos *in vitro* si esta molécula inhibe la unión Fabp2-BODIPY-FLC16 a través de estudios de desplazamiento mediante espectrofluorimetría.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación también se ha centrado en el rol de Fabp1, la cual hemos localizado a nivel nuclear de los enterocitos y estudiaremos la

posibilidad de la presencia de una NLS similar a la de Fabp2. Preguntas sobre el transporte de ligandos específicos a sitios intracelulares concretos y la interacción de las FABPs con compañeros moleculares diferentes a los ya descritos para los miembros de esta familia, forman parte de las interrogantes que pretendemos descifrar para colaborar con el entendimiento del rol de las FABPs en el intestino.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem.* 268, 17665– 17668.
- Adam EJ y Adam SA. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 125, 547–555.
- Adam S. (2001). The nuclear pore complex. *Genome Biol.* 2, 1-6.
- Adam SA y Gerace L. (1991). Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell.* 66, 837–847.
- Agellon LB, Toth MJ, Thomson ABR. (2002). Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem.* 239, 79–82.
- Agerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Steffensen R, Nordestgaard BG. (2000). Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation.* 102, 2197–2203.
- Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Sali A, Rout MP. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 450, 695-701.
- Alberts B, Bray D, Levis J, Raff MK, Roberts K, Watson JD. (2002). Intracellular compartments and protein sorting. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Publishing Inc. p. 669-678.
- Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecsckemeti K. (2000). Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta.* 1483, 352–362.
- Alpers DH, Strauss AW, Ockner RK, Bass NM. (1984) Cloning of a cDNA encoding rat intestinal fatty-acid binding protein. *PNAS.* 81, 313-317.

- Alvite G, DiPrieto SM, Santome JA, Ehrlich R, Esteves A. (2001). Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1533, 293-302.
- Amiri M, Yousefnia S, Seyed Forootan F, Peymani M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. (2018). Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene*. 676, 171-183.
- Anderle P, Sengstag T, Mutch DM, Rumbo M, Praz V, Mansourian R, Delorenzi M, Williamson G, Roberts MA. (2005). Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics*. 6, 69–86.
- Anderson JL, Carten JD, Farber S. (2011). Zebrafish lipid metabolism: from mediating early patterning to the metabolism of dietary fat and cholesterol. *Methods Cell. Biol.* 101, 111-141.
- Anderson JL, Carten JD, Farber SA. (2016). Using fluorescent lipids in live zebrafish larvae: from imaging whole animal physiology to subcellular lipid trafficking. *Methods Cell Biol.* 133, 165-178.
- André M, Ando S, Ballagny C, Durliat M, Poupard G, Briancon C, Babin PJ. (2000). Expression of intestinal fatty acid binding protein gene reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 249-252.
- Argos P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *J Mol Biol.* 211, 943–958.
- Armstrong EH, Goswami D, Griffin PR, Noy N, Ortlund EA. (2014). Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) signaling pathway. *J Biol Chem.* 289, 14941-14954.
- Arroyo-Johnson C, Mincey KD. (2016). Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 45, 571–579.

- Artursson P, Karlsson J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 175, 880–885.
- Artursson P, Palm K, Luthman K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 46:27–43.
- Astone M, Dankert EN, Alam SK, Hoepfner LH. (2017). Fishing for cures: The allLURE of using zebrafish to develop precision oncology therapies. *NPJ Precis Oncol.* 1. pii: 39.
- Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB, Schroeder (2010). F. Liver fatty acid binding protein and obesity. *J. Nutr. Biochem.* 21, 1015-1032.
- Ayers SD, Nedrow KL, Gillilan RE, Noy N. (2007). Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR gamma by FABP4. *Biochemistry.* 46, 6744-6752.
- Babeu JP, Boudreau F. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol.* 20, 22–30.
- Baier LJ, Bogardus C, Sacchettini JC. (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.
- Balanarasimha M, Davis AM, Soman FL, Rider SD Jr, Hostetler HA. (2014). Ligand-Regulated Heterodimerization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α with Liver X Receptor α . *Biochemistry.* 53, 2632–2643.
- Bambino K, Zhang C, Austin C, Amarasiriwardena C, Arora M, Chu J, Sadler KC. (2018). Inorganic arsenic causes fatty liver and interacts with ethanol to cause alcoholic liver disease in zebrafish. *Dis Model Mech.* 11, pii: dmm031575.
- Bass NM, Manning JA, Ockner RK, Gordon JI, Seetharam S, Alpers DH. (1985). Regulation of the biosynthesis of two distinct fatty acid-binding proteins in rat liver and intestine. Influences of sex difference and of clofibrate. *J Biol Chem.* 260, 1432–1436.
- Bass NM. (1988). The cellular fatty acid binding proteins: aspects of structure, regulation, and function. *Int Rev Cytol* 111, 143-184.

- Beck M, Hurt E. (2017). The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18, 73-89.
- Becker J, Melchior F, Gerke V, Bischoff FR, Ponstingl H, Wittinghofer A. (1995). RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 11860–11865.
- Bernlohr DA, Angus CW, Lane MD, Bolanowski MA, Kelly TJ. (1984) Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *PNAS.* 81, 5468- 5472.
- Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ. (1997). Intracellular lipidbinding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 277–303.
- Berova N, Nakanishi K, Woody RW. (2000). *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York, 877 pp.
- Besnard P. (2016). Lipids and obesity: also a matter of taste? *Rev. Endocr. Mebab. Disord.* 17, 159- 170.
- Billich S, Wissel, T, Gratzin H, Hahn U, Hagenhoff B, Lezius AG, Spener F. (1988). Cloning of a full-length complementary DNA for fatty acid binding protein from bovine heart. *Journal of Biochemistry.* 175, 549-556.
- Bischoff FR y Ponstingl H. (1991). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10830–10834.
- Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 2587–2591.
- Bischoff FR, Ponstingl H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature.* 354, 80–82.
- Boden G. (1999). Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians.* 111, 241–248.
- Boiteux G, Lascombe I, Roche E, Plissonnier ML, Clairotte A, Bittard H, Fauconnet S. (2009). A-FABP, a candidate progression marker of human

- transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int. J. Cancer*. 124, 1820–1828.
- Borchers T, Unterberg C, Rudel H, Robenek H, Spener F. (1989). Subcellular distribution of cardiac fatty acid-binding protein in bovine heart muscle and quantitation with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochim Biophys Acta*. 1002, 54–61.
 - Bordewick U, Heese M, Borchers T, Robenek H, Spener F. (1989). Compartmentalization of hepatic fatty-acid-binding protein in liver cells and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 370, 229–238.
 - Bourguine J, Billaut-Laden I, Happillon M, Lo-Guidice JM, Maunoury V, Imbenotte M, Broly F. (2012). Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metab Dispos*. 40, 694–705.
 - Briske Andersson MJ, Finley JW, Newman SM. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 214, 248–257.
 - Budhu AS, Noy N. (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid induced growth arrest. *Mol Cell Biol*. 22, 2632–2641.
 - Bunger M, van den Bosch HM, van der Meijde J, Kersten S, Hooiveld GJEJ, Muller M. (2007). Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. *Physiol. Genomics* 30, 192-204.
 - Buttet M, Poirier H, Traynard V, Gaire K, Tran TT, Sundaresan S, Besnard P, Abumrad NA, Niot I. (2016). Deregulated Lipid Sensing by Intestinal CD36 in Diet-Induced Hyperinsulinemic Obese Mouse Model. *PLoS One*. 11, e0145626.
 - Campbell C, Shaw R, Garfinkle B, Gray A. (1979). Gel permeation chromatography as a stability-indicating assay for human serum albumin. *Developments in Biological Standardization*. 44, 95-98.

- Canclini L. (2010). Generación de herramientas moleculares para el estudio de las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) del enterocito de *Danio rerio*". Tesis de Maestría PEDECIBA.
- Carten JD, Farber SA. (2009). A new model system swims into focus: using the zebrafish to visualize intestinal metabolism in vivo. *Clin. Lipidol.* 4, 501-515.
- Caspary WF. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr.* 55, 299S–308S.
- Chan L, Wei CF, Li WH, Yang CY, Ratner P, Pownall H, Gotto AM, Smith LC. (1985). Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry.* 260, 2629-2632.
- Chan MM, Evans KW, Moore AR, Fong D. (2010). Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR): Balance for survival in parasitic infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010, 1-9.
- Chen CS, Martin OC, Pagano RE. (1997). Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells *Biophys J.* 72, 37–50.
- Chen X, Zaro J, Shen WC. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev.* 65, 1357-1369.
- Cheng K-C, Li C, Uss AS. (2008). Prediction of oral drug absorption in humans from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4, 581–590.
- Chmurzynska A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics.* 47, 39-48.
- Chmurzyńska A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 47, 39–48.
- Cifarelli V, Abumrad NA. (2018). Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization: Role in Absorption and Gut Homeostasis. *Compr Physiol.* 8, 493-507.
- Claas SA, Arnett DK. (2016). The Role of Healthy Lifestyle in the Primordial Prevention of Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep.* 18:56.

- Clérico EM, Ermácora MR. (2001). Tryptophan Mutants of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein: Ultraviolet Absorption and Circular Dichroism Studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15, 215–224.
- Clérico EM, Peisajovich SG, Ceolín M, Ghiringhelli PD, Ermácora MR. (2000). Engineering a compact non-native state. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1476, 203-218.
- Coe NR, Bernlohr DA. (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1391, 287–306.
- Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, Hanf R, Tailleux A, Chinetti G, Staels B, Lestavel S. (2013). Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- α increases high density lipoprotein production. *Eur. Heart J*. 34, 2566-74.
- Conti E y Kuriyan J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Struct. Fold Des*. 8, 329–338.
- Córscico B, Cistola DP, Frieden C, y Storch J. (1998). The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *PNAS*. 95, 12174-12178.
- Corsico B, Liou HL, Storch J. (2004). The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry*. 43, 3600–3607.
- Couvigny B, de Wouters T, Kaci G, Jacouton E, Delorme C, Doré J, Renault P, Blottière HM, Guédon E, Lapaque N. (2015). Commensal *Streptococcus salivarius* Modulates PPAR γ Transcriptional Activity in Human Intestinal Epithelial Cells. *PLoS One*. 10, e0125371.
- Damelin M, Silver PA. (2000). Mapping interactions between nuclear transport factors in living cells reveals pathways through the nuclear pore complex. *Mol. Cell*. 5, 133–140.
- Danilova N, Wilkes M, Bibikova E, Youn MY, Sakamoto KM, Lin S. (2018). Innate immune system activation in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan Anemia. *Sci Rep*. 8, 5165.

- De Santis ML, Hammamieh R, Das R, Jett M. (2004). Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *J. Exp. Ther. Oncol.* 4, 91–100.
- DeRossi C, Vacaru A, Rafiq R, Cinaroglu A, Imrie D, Nayar S, Baryshnikova A, Milev MP, Stanga D, Kadakia D, Gao N, Chu J, Freeze HH, Lehrman MA, Sacher M, Sadler KC. (2016). Trappc11 is required for protein glycosylation in zebrafish and humans. *Mol. Biol. Cell.* 27, 1220-1234.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86, 465-514.
- Dingwall C, Sharnick SV, Laskey RA. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell.* 30, 449–458.
- DiRusso CC, Li H, Darwis D, Watkins PA, Berger J, Black PN. (2005). Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *J Biol Chem.* 280, 16829–16837.
- Domenichiello AF, Kitson AP, Bazinet RP. (2015). Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? *Prog Lipid Res.* 59, 54-66.
- Doye V, Hurt E. (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 401–411.
- Dube N, Delvin E, Yotov W, Garofalo C, Bendayan M, Veerkamp JH, Levy E. (2001). Modulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in Caco-2 cells by lipids, hormones and cytokines. *J. Cell Biochem.* 81, 613-620.
- Dworetzky SI, Feldherr CM. (1988). Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* 106, 575–584.
- Eads J, Sacchettini JC, Kromminga A, Gordon JI. (1993) *Escherichia coli*-derived Rat Intestinal Fatty Acid Binding Protein with Bound Myristate at 1.5 Å Resolution and I-FABP Arg106 – Gln-Bound Oleate at 1.7 Å Resolution. *Mol. Biol. Chem.* 268, 26375-26385.
- Engle MJ, Goetz GS, Alpers DH. (1998). Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol.* 174, 362–369.

- Erol E, Kumar LS, Cline GW, Shulman GI, Kelly DP, Binas B. (2004). Liver fatty acid binding protein is required for high rates of hepatic fatty acid oxidation but not for the action of PPAR α in fasting mice. *FASEB J.* 18, 347-349.
- Esteves A, Ehrlich R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology C. Toxicological Pharmacology.* 142, 3-4.
- Esteves A, Knoll-Gellida A, Canclini L, Silvarrey MC, André M, Babin PJ. (2016). Fatty acid binding proteins have the potential to channel dietary fatty acids into enterocyte nuclei. *J Lipid Res.* 57, 219-232.
- Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). (2001). *Jama.* 285, 2486–2497.
- Fahrenkrog B, Aris JP, Hurt EC, Pante N, Aebi U. (2000). Comparative spatial localization of protein-A-tagged and synthetic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 129, 295–305.
- Farber SA, Pack M, Ho SY, Wagner DS, Dosch R, Mullins MC, Hendrickson HS, Hendrickson EK, Halpern ME. (2001). Genetic analysis of digestive physiology using fluorescent phospholipids reporters. *Science.* 292, 1385-1388.
- Fazelahi M, Kia V, Kaghazian H, Paryan M. (2017). Quantitative Real-Time PCR technique for the identification of *E.coli* residual DNA in streptokinase recombinant product. *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* 47, 986-989.
- Feldherr CM, D Akin. (1997). The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.* 110, 3065–3070.
- Fogh J, Wright JC, Loveless JD. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumours. *J Natl Cancer Inst.* 21, 393–408.
- Franchini GR, Storch J, Corsico B. (2008). The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1781, 192-199.

- Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J. (2003). PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H1-9.
- Fujishiro K, Fukui Y, Sato O, Kawabe K, Seto K, Motojima K. (2002). Analysis of tissue-specific and PPAR α -dependent induction of FABP gene expression in the mouse liver by an in vivo DNA electroporation method. *Mol. Cell. Biochem.* 239, 165-172.
- Fujita M, Fujii H, Kanda T, Sato E, Hatakeyama K, Ono T. (1995) Molecular cloning, expression, and characterization of a human intestinal 15-kDa protein. *European Journal of Biochemistry.* 233, 406-413.
- Furuhashi M, Hotamisligil GS. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489–503.
- Gajda AM, Storch J. (2015). Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 93, 9-16.
- Gajda AM, Zhou YX, Agellon LB, Fried SK, S. Kodukula S, Fortson W, Patel K, Storch J. (2013). Direct comparison of mice null for liver or intestinal fatty acid-binding proteins reveals highly divergent phenotypic responses to high fat feeding, *J. Biol.Chem.* 288, 30330–30344.
- Ge XN, Bastan I, Dileepan M, Greenberg Y, Ha SG, Steen KA, Bernlohr DA, Rao SP, Sriramarao P. (2018). FABP4 regulates eosinophil recruitment and activation in allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 315, L227-L240.
- George R, Heringa J. (2002). An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng.* 15, 871–879.
- Gillilan RE, Ayers SD, Noy N. (2007). Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *J Mol Biol.* 372, 1246-60.
- Glatz JFC, Luiken JJFP. (2017). From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie.* 136, 21-26.

- Glatz JFC, Nabben M, Heather LC, Bonen A, Luiken JJFP. (2016). Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861, 1461-1471.
- Glatz JFC, Veerkamp JH. (1985). Intracellular fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem.* 17, 13-22.
- Goessling W, Sadler KC. (2015). Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology.* 149, 1361-77.
- Gogia A, Agarwal PK. (2006). Metabolic syndrome. *Indian J Med Sci.* 60, 72–81.
- Gokhale RS, Khosla C. (2000). Role of linkers in communication between protein modules. *Curr Opin Chem Biol.* 4, 22–27.
- Gordon JI, Lowe JB. (1985). Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. *Chem Phys Lipids.* 38, 137-158.
- Gorlich D, Pante N, Kutay D, Aebi U, Bischoff FR. (1996). Identification of different roles for RanGTP and RanGTP In nuclear protein import. *EMBO J.* 15, 5584–5594.
- Gorlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell.* 79, 767–778.
- Grober J. (1999). Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the Farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem.* 274, 29749–29754.
- Grundy SM. (2007). Cardiovascular and metabolic risk factors: how can we improve outcomes in the high-risk patient? *Am J Med.* 120, S3–8; discussion S9.
- Guilmeau S, Niot I, Laigneau JP, Devaud H, Petit V, Brousse N, Bouvier R, Ferkdadji L, Besmond C, Aggerbeck LP, Bado A, Samson-Bouma ME. (2007). Decreased expression of Intestinal I- and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes. *Histochem Cell Biol.* 128, 115–23.
- Hadizadeh Shirazy N, Ranjbar B, Hosseinkhani S, Khalifeh K, Riahi Madvar A, Naderi-Manesh H. (2007). Critical role of Glu175 on stability and folding of bacterial luciferase: stopped flow fluorescence study. *J Biochem Mol Biol.* 40, 453–458.

- Hagan RM, Worner-Gibbs, Wilton DC. (2008). The interaction of liver fatty acid-binding protein (FABP) with anionic phospholipid vesicles: is there extended phospholipid anchorage under these conditions?. *Journal of Biochemistry*. 410, 123-129.
- Hallden G y Aponte GW. (1997). Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal fatty acid-binding protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *J Biol Chem*. 272, 12591–12600.
- Hammes GG. (2005). *Spectroscopy for the Biological Sciences*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Haunerland NH y Spener F. (2004). Properties and physiological significance of fatty acid binding proteins. *Advances in Molecular and Cell Biology*.33, 99-123.
- Hellendie T, Antonius M, Sorensen RV, Hertzell AV, Bernlohr DA, Kolvraa S, Kristiansen K, Mandrup S. (2000). Lipid binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxi- some proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J. Lipid Res*. 41, 1740-1751.
- Her GM, Chiang CC, Wu JL. (2004). Zebrafish intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) gene promoter drives gut-specific expression in stable transgenic fish. *Genesis*. 38, 26-31.
- Hertzell AV, Bernlohr DA. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 11, 175-180.
- Hertzell AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, Sanders MA, Ohlendorf DH, Suttles J, Bernlohr DA. (2009) Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins . *J.Med. Chem*. 52, 6024-6031.
- Hirakawa Y, Lam TH, Welborn T, Kim HC, Ho S, Fang X, Ueshima H, Suh I, Giles G, Woodward M. (2015). Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. The impact of body mass index on the associations of lipids with the risk of coronary heart disease in the Asia Pacific region. *Prev Med Rep*. 3, 79-82.

- Hodsdon ME, Cistola DP. (1997a). Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry*. 36, 1450-1460.
- Hodsdon ME, Cistola DP. (1997b). Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ¹⁵N NMR relaxation and ¹H exchange. *Biochemistry*. 36, 2278-2290.
- Hodsdon ME, Ponder JW, Cistola DP. (1996). The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. *J Mol Biol*. 264, 585-602.
- Hopper AK, Traglia HM, Dunst RW. (1990). The yeast RNA1 gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. *J. Cell Biol*. 111, 309–321.
- Hostetler HA, Avery L, McIntosh AL, Atshaves BP, Storey SM, Payne HR, Kier AB, Schroeder F. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR in cultured primary hepatocytes. *Journal of Lipid Research*. 50, 1663-1675.
- Hostetler HA, Balanarasimha M, Huang H, Kelzer MS, Kaliappan A, Kier AB, Schroeder F. (2010). Glucose regulates fatty acid binding protein interaction with lipids and peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Lipid Res*. 51, 3103-3116.
- Hotamisligil G, Bernlohr DA. (2015). Metabolic functions of FABPs- mechanisms and therapeutic implications. *Nature Rev. Endocrinol*. 11, 592-605.
- Howarth DL, Lindtner C, Vacaru AM, Sachidanandam R, Tsedensodnom O, Vasilkova T, Buettner C, Sadler KC. (2014). Activating transcription factor 6 is necessary and sufficient for alcoholic fatty liver disease in zebrafish. *PLoS Genet*. 10(5), e1004335.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498-503.
- Hsu KT y Storch J. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 13317-13323.

- Huang H, McIntosh AA, Martin GG, Landrock D, Chung S, Landrock K, Dangott LJ, Li S, Kier AB, Schroeder F. (2016). FABP1: a novel hepatic endocannabinoid and cannabinoid binding protein, *Biochemistry*. 37, 5243–5255.
- Hughes ML, Liu B, Halls ML, Wagstaff KM, Patil R, Velkov T, Jans DA, Bunnett NW, Scanlon MJ, Porter CJ. (2015). Fatty Acid-binding Proteins 1 and 2 Differentially Modulate the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α in a Ligand-selective Manner. *J. Biol. Chem.* 290, 13895-13906
- Hwang ST, Urizar NL, Moore DD, Henning SJ. (2002). Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology*. 122, 1483–1492.
- Ikebe M, Kambara T, Stafford WF, Sata M, Katayama E, Ikebe R. (1998). A hinge at the central helix of the regulatory light chain of myosin is critical for phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin motor activity. *J Biol Chem*. 273, 17702–17707.
- Issemann I, Prince R, Tugwood J, Green S. (1992). A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation? *Biochem Soc Trans*. 20, 824–827.
- Jakobsson E, Alvite G, Bergfors T, Esteves A, Kleywegt GJ. (2003). The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim Biophys Acta*. 1649, 40-50.
- Jana S y Deb JK. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiological Biotechnology*. 67, 289-298.
- Johnson ID, Chol Kang H, Haugland RP, Kang HC. (1991). Fluorescent membrane probes incorporating dipyrrometheneboron difluoride fluorophores. *Anal Biochem*. 198, 228–237.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. (2009). Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 6375–6380.
- Kaiser RD, London E. (1998). Determination of the depth of BODIPY probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochim Biophys Acta*. 1375, 13–22.

- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. (1984a). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 39, 499–509.
- Kalderon D, WD, Richardson AF, Markham A, Smith, F. (1984b). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38.
- Karsenty J, Helal O, de la Porte PL, Beauclair-Deprez P, Martin-Elyazidi C, Planells R, Storch J, Gastaldi M. (2009). I-FABP expression alters the intracellular distribution of the BODIPY C16 fatty acid analog. *Mol Cell Biochem*. 326, 97-104.
- Kawaguchi K, Senga S, Kubota C, Kawamura Y, Ke Y, Fujii H. (2016). High expression of fatty acid-binding protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells. *FEBS Open Bio*. 6, 190–199.
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1751, 119 –139.
- Kelly SM, Price NC. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta*. 1338, 161–185.
- Kelly SM, Price NC. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*. 1, 349–384.
- Keminer O, Peters R. (1999). Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J*. 77, 217–228.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421-424.
- Kim K, Storch J. (1992). Mechanism of free fatty acid transfer from rat heart fatty acid- binding protein to phospholipid membranes evidence for a collisional process. *J. Biol. Chem*. 267, 20051-20056.
- Kimura R, Takahashi N, Murota K, Yamada Y, Niiya S, Kanzaki N, Murakami Y, Moriyama T, Goto T, Kawad T. (2011). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) suppresses postprandial lipidemia through fatty acid oxidation in enterocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 410, 1-6.

- Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT. (1997). Paracellular diffusion in Caco-2 monolayers: effects of perturbants on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci.* 86, 1105–1110.
- Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, Binas B, Choi V, Mandap B, Russnak T, Zhou YX, Storch J. (2011). Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, 803–814.
- Lamichane S, Dahal Lamichane B, Kwon SM. (2018). Pivotal Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Their Signal Cascade for Cellular and Whole-Body Energy Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 19(4) pii: E949.
- Lemberger T, Desvegne B, Wahli W. (1996). Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear signaling pathway in lipid physiology. *Annu. Rev. Cell Dev Biol.* 12, 335-363.
- Levy E, Ménard D, Delvin E, Montoudis A, Beaulieu JF, Mailhot G, Dubé N, Sinnett D, Seidman E, Bendayan M. (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol.* 132, 351–367.
- Li H, Li J, Lv Q, Wang X, Yang H. (2012). The study of fatty acid binding protein expression in human breast cancer tissue and its significance. *J. Biosci. Med.* 2, 1-6.
- Li J, Henry E, Wang L, Delelis O, Wang H, Simon F, Tauc P, Brochon JC, Zhao Y, Deprez E. (2012). Comparative study of the fatty acid binding process of a new FABP from *Cherax quadricarinatus* by fluorescence intensity, lifetime and anisotropy. *PLoS One.* 7(12), e51079.
- Lickwar CR, Camp JG, Weiser M, Cocchiaro JL, Kingsley DM, Furey TS, Sheikh SZ, Rawls JF (2017). Genomic dissection of conserved transcriptional regulation in intestinal epithelial cells. *PLoS Biol.* 15:e2002054.
- Lim R, Fahrenkrog B. (2006). The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol.* 18, 342-347.

- Livak KJ, Schmittgen TD. (2011). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*. 25, 402-408.
- Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. (2006). Trend in the prevalence of the metabolic syndrome and its impact on cardiovascular disease incidence: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 29, 625–630.
- Lowe JB, Boguski MS, Seetser DA, Eshourbagy NA, Taylor JM, Gordon JI. (1985). Human liver fatty acid binding protein. Isolation of a full length cDNA and comparative sequence analyses of orthologous and paralogous proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 3413-3417.
- Lowe JB, Sacchettini JC, Laposata M, McQuillan JJ, Gordon JI. (1987). Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in *Escherichia coli*. Purification and comparison of ligand binding characteristics with that of *Escherichia coli*-derived rat liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem*. 262, 5931–5937.
- Lucke C, Qiao Y, van Moerkerk HT, Veerkamp JH, Hamilton JA. (2006) Fatty-acid-binding protein from the flight muscle of *Locusta migratoria*: evolutionary variations. *Biochemistry*. 45, 6296-6305.
- Macara IG. (2001). Transport into and out of the Nucleus. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64, 570-594.
- Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Celis JE. (1992). Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid binding protein [PA-FABP]) that is highly upregulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol*. 99, 299-305.
- Manavalan P, Johnson WC. (1987). Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*. 167, 76–85.
- Mansbach CM 2nd, Siddiqi S. (2016). Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 310, 659-668.
- Marza E, Barthe C, André M, Villeneuve L, Helou C, Babin PJ. (2005). Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene

- homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev. Dyn.* 232, 506-518.
- Masson CJ, Plat J, Mensink RP, Namiot A, Kisielewski W, Namiot Z, Füllekrug J, Eehalt R, Glatz JF, Pelsers MM. (2010). Fatty acid- and cholesterol transporter protein expression along the human intestinal tract. *PLoS One.* 5(4):e10380.
 - McGarry JD. (2002). Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51, 7–18.
 - McIntosh AL, Atshaves BP, Hostetler HA, Huang H, Davis J, Lyuksyutova OI, Landrock D, Kier AB, Schroeder F. (2009). Liver type fatty acid binding protein (L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor- α activity in cultured primary hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 485, 160-73.
 - McIntosh AL, Petrescu AD, Hostetler HA, Kier AB, Schroeder F. (2013). Liver-type fatty acid binding protein interacts with hepatocyte nuclear factor 4 α . *FEBS Lett.* 587, 3787–3791.
 - Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 16, 3587-3598.
 - Miller KR, Cistola DP. (1993). Titration calorimetry as a binding assay for lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem.* 123, 29–37.
 - Ministerio de Salud Pública, 2016. Guía alimentaria para la población uruguaya.
 - Miyares RL, de Rezende VB, Farber SA. (2014). Zebrafish yolk lipid processing: a tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *Dis. Model. Mech.* 7, 915-27.
 - Montoudis A, Seidman E, Boudreau F, Beaulieu J-F, Menard D, Elchebly M, Mailhot G, Sane A-T, Lambert M, Delvin E, Levy E. (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion boxidation and cholesterol uptake. *J. Lipid Res.* 49, 961-972.
 - Montoudis A, Delvin E, Menard D, Beaulieu JF, Jean D, Tremblay E, Bendayan M, Levy E. (2006). Intestinal-fatty acidbinding protein and lipid transport in

- human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 248–254.
- Moore MS y Blobel G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature.* 365, 661–663.
 - Moroianu J, Blobel G, Radu A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 2008–2011.
 - Muller M, Kersten S. (2003). Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.* 4, 315-322.
 - Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.* 53, 124–44.
 - Narayanan V, Barbosa E, Reed R, Tennekoon G.(1988). Characterization of a cloned cDNA encoding rabbit myelin P2 protein. *Journal of Biological Chemistry.* 263, 8332-8337.
 - Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, Gheyi T, Storch J, Mansbach CM 2nd. (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of re-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 282, 17974-17984.
 - Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW, Davidson NO. (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.
 - Niot I, Poirier H, Tran TT, Besnard P. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. *Prog. Lipid Res.* 48, 101 – 115.
 - Nordestgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH, Steffensen R, Jensen G, et al. (1997). Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation.* 96, 1737–1744.
- nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 361-371.

- Ockner RK, Maning JA, Poppenhausen RB, Ho WKL. (1972). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. *Science*. 177, 56-58.
- Ockner RK, Manning JA. (1976). Fatty Acid Binding Protein Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J. Clin. Invest.* 58, 632-641.
- Ogden CL, MD, Carroll BK, Kit K, Flegal M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*. 311, 806-814.
- Ono T. (2005). Studies of the FABP family: a retrospective. *Mol Cell Biochem.* 277, 1–6.
- Otis JP, Farber SA. (2016). High-fat Feeding Paradigm for Larval Zebrafish: Feeding, Live Imaging, and Quantification of Food Intake. *J. Vis. Exp.* e54735, 1-7.
- Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, Neuhauss SC, Schier AF, Stemple DL, Driever W, Fishman MC. (1996). Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development*. 123, 321-328.
- Pagano RE, Chen CS. (1998). Use of BODIPY-labeled sphingolipids to study membrane traffic along the endocytic pathway. *Ann NY Acad Sci.* 845, 152–160.
- Pagano RE, Martin OC, Kang HC, Haugland RP.(1991). A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J Cell Bio.l* 113, 1267–1279.
- Peeters RA, EnaJM, Veerkamp JH. (1991). Expression in *Escherichia coli* and characterization of the fatty-acid-binding protein from human muscle. *Journal of Biochemistry.* 278, 361-364.
- Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA. (2004). Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J Biol Chem.* 279, 54454–54462.
- Pelsers MM, Stellingwerff T, van Loon LJ. (2008). The role of membrane fatty-acid transporters in regulating skeletal muscle substrate use during exercise. *Sports Med.* 38, 387–399.

- Pelsers MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. (2003). Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem.* 36, 529–535.
- Peper G, Fankhauser A, Merlinb,Roscic A, Hofmanna M, Obrdlik P. (2014). Direct real-time quantitative PCR for measurement of host-cell residual DNA in therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal.* 100,123-130
- Picard D, Yamamoto KR. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340.
- Poirier H, Niot I, Monnot MC, Braissant O, Meunier-Durmort C, Costet P, Pineau T, Wahli W, Willson TM, Besnard P. (2001). Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *Biochem J.* 355, 481-488.
- Pollard VW, Michael WM, Nakielny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell.* 86, 985–994.
- Pollex RL, Hegele RA. (2006.) Genetic determinants of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 3, 482–489.
- Praslickova D, Torchia EC, Sugiyama MG, Magrane EJ, Zwicker BL, Kolodzieyski L, Agellon LB. (2012). The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine. *PLoS One.* 7(12):e50810.
- Protasevich I, Ranjbar B, Lobachov V, Makarov A, Gilli A, Briand C. (1997). Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistr.* 36, 2017–2024.
- Purdie N, Swallow KA, Murphy LH, Purdies RB. (1989). Analytical applications of circular dichroism. *J Pharma Biomed Anal.* 7, 1519–1526.
- Quinlivan, VH, Farber SA. 2017. Lipid uptake, metabolism, and transport in the larval zebrafish. *Frontiers in Endocrinology.* 8, article 319.
- Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research.* Article ID 612089.

- Ramasamy I. (2016). Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clinica Chimica Acta*. 454, 43–185.
- Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL Jr, Jarnik M, Engel A, Aebi U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* 110, 883–894.
- Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. (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.
- Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. (2000). Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry.* 39, 7197–204.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell.* 64, 615–623.
- Rodriguez Sawicki L, Bottasso Arias NM, Scaglia N, Falomir Lockhart LJ, Franchini GR, Storch J, Córscico B. (2017). FABP1 knockdown in human enterocytes impairs proliferation and alters lipid metabolism. *BiochimBiophys Acta.* 1862, 1587-1594.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* 148, 635–651.
- Ryan K, Wente S. (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 361-371.
- Sacchettini JC, Hauff SM, Van Camp SL, Cistola DP, Gordon JI. (1990). Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J Biol Chem.* 265, 19199–19207.
- Sadler KC, Rawls JF, Farber SA. (2013). Getting the inside tract: new frontiers in zebrafish digestive system biology. *Zebrafish.* 10, 129-131.
- Santoro MM. (2014). Zebrafish as a model to explore cell metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 546-54.

- Schaap FG, Specht B, van der Vusse GJ, Borchers T, Glatz JFC. (1996). One-step purification of rat heart-type fatty acid-binding protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography*. 679, 61-67.
- Schlegel A, Gut P. (2015). Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. *Cell Mol Life Sci*. 72, 2249-2260.
- Schlegel, A. (2012). Studying non-alcoholic fatty liver disease with zebrafish: a confluence of optics, genetics, and physiology. *Cell. Mol. Life Sci*. 69, 3953-3961.
- Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, Hostetler HA, Vespa A, Landrock D, Landrock KK, Payne HR, Kier AB. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long-chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*. 43, 1 – 17.
- Schwartz T. (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr Opin Struct Biol*. 15, 221-226.
- Schwartz TU. (2016). The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex. *J Mol Biol*. 428, 1986-2000.
- Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 82, 149-154.
- Sehayek E, Hazen SL. (2008). Cholesterol absorption from the intestine is a major determinant of reverse cholesterol transport from peripheral tissue macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28, 1296–1297.
- Sessler RJ, Noy N. (2005). A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell*. 18, 343-53.
- Seth A, Stemple DL, Barroso I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis Model Mech*. 6, 1080-1088.
- Seti H, Leikin-Frenkel A, Werner H. (2009). Effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on IGF-I receptor signalling in colorectal cancer cells. *Arch Physiol Biochem*. 115, 127-36.

- Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H, Nakamura Y, Fujiwara T. (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochemica et Biophysica Acta*. 1354, 24-28.
- Shimizu M. (2010). Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Review Biosci Biotechnol Biochem*. 74, 232–241.
- Siddiqi S, Saleem U, Abumrad NA, Davidson NO, Storch J, Siddiqi SA, Mansbach CM 2nd. (2010). A novel multiprotein complex is required to generate the prechylomicron transport vesicle from intestinal ER. *J Lipid Res*. 51, 1918-1928.
- Siddiqi S, Sheth A, Patel F, Barnes M, Mansbach CM 2nd. (2013). Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. *Biochim Biophys Acta*. 1831, 1311-1321.
- Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Saurat JH. (1993). Characterization and expression of a novel human fatty acid-binding protein: the epidermal type (E-FABP). *Biochemica and Biophysica Research Commun* 190, 482-487.
- Smathers L, Petersen DR. (2011). The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions , *Human Genomics*. 5, 170-191.
- Smith AJ, Sanders MA, Juhlmann BE, Hertzfel AV, Bernlohr DA. (2008). Mapping of the hormonesensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *J. Biol. Chem*. 283, 33536-33543.
- Sprengart ML y Porter AG. (1997). Functional importance of RNA interactions in selection of translation initiation codons. *Molecular Microbiology*. 24, 19-28.
- Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, Patel S, Kotler M, Raimondi A, Tartaglia LA, Lodish HF. (1999). Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell*. 4, 299–308.
- Stainier DY, Weinstein BM, Detrich HW 3rd, Zon LI, Fishman MC. (1995). Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development*. 121, 3141-3150.

- Stoffler D, Goldie KN, Feja B, Aebi U. (1999). Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by timelapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 287, 741–752.
- Storch J y McDermott L. (2009). Structural and functional analysis of fatty acid binding proteins. *Journal of Lipid Research.* 50, S126-S131.
- Storch J, Corsico B. (2008). The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 28, 73–95.
- Storch J, Thumser AE. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J Biol Chem.* 285, 32679–32683.
- Storch J, Veerkamp JH, Hsu KT. (2002). Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs. *Mol Cell Biochem.* 239, 25–33.
- Studier FW, Moffatt BA. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Studier FW. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification.* 41, 207–234.
- Stump DD, Zhou SL, Berk PD. (1993). Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol.* 265, 894–902.
- Suárez, M. (2015). Clonado y expresión de la proteína PPAR α de *Danio rerio*. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, UdelAR.
- Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4, 395–411.
- Tafreshi NK, Hosseinkhani S, Sadeghizadeh M, Sadeghi M, Ranjbar B, Naderi-Manesh H. (2007). The influence of insertion of a critical residue (Arg356) in structure and bioluminescence spectra of firefly luciferase. *J Biol Chem.* 282, 8641-8647

- Terry LJ, Shows EB, Wente SR. (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*. 318, 1412-1416.
- Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Bananszak L. (1997). The crystal structure of liver fatty acid binding protein a complex with two bound oleates. *J. Biol.Chem.* 272, 7140-7150.
- Thumser AE y Storch J.(2000). Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipids membranes by different mechanisms. *Journal of Lipid Research*. 41, 647-656.
- Thumser AE, Storch J. (2007). Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism. *Mol Cell Biochem*. 299, 67-73.
- Tölle A, Suhail S, Jung M, Jung K, Stephan C. (2011). Fatty acid binding proteins (FABPs) in prostate, bladder and kidney cancer cell lines and the use of IL-FABP as survival predictor in patients with renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 11, 302.
- Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM. (1994). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*. 22, 5628-5634.
- Torra IP, Jamshidi Y, Flavell DM, Fruchart JC, Staels B. (2002). Characterization of the human PPAR α promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol. Cell. Endocrinol*. 16, 1013-1028.
- Trotter PJ, Storch J. (1991). Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res*. 32, 293-304.
- USDA: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Consultado el 21 de setiembre de 2018.
- Vacaru AM, Unlu G, Spitzner M, Mione M, Knapik EW, Sadler KC. (2014). *In vivo* cell biology in zebrafish - providing insights into vertebrate development and disease. *J Cell Sci*. 127, 485-95.

- Vallet L. (1979). Gel filtration in Sephadex G200 for the control of preparations of human immunoglobulin. *Developments in Biological Standardization*.44, 3-10.
- Vassileva G, Huwyler L, Poirier K, Agellon LB, Toth MJ. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J.* 14, 2040–2046.
- Venkatachalam A, Parmar MB, Wright J. (2017). Evolution of duplicated intracellular lipid binding protein genes of teleost fishes. *Mo. Genet. Genomics*. 292, 699-727.
- Venkatachalam AB, Sawler DL, Wright JM. (2013). Tissue-specific transcriptional modulation of fatty acid-binding protein genes, *fabp2*, *fabp3* and *fabp6*, by fatty acids and the peroxisome proliferator, clofibrate, in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*. 520, 14–21
- Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO. (2018). The zebrafish model in oncology. *Med Sci*. 34, 345-353.
- Waldo G, Standish B, Berendzen J, Terwilliger T. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 17, 691–695.
- Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L, Lamprecht C, Addicks GC, Hache R, J, Lefebvre YA. (2005). A Serine/Threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem*. 280, 17549-17561.
- Wang M, Liu YE, Goldberg ID, Shi YE. (2003). Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid-binding protein MRG. *J Biol Chem*. 278, 47319-47325.
- Wang TY, Liu M, Portincasa P, Wang DQ-H. (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest*. 43, 1203-1211.
- Wang X, Morgan DM, Wang G, Mozier NM. (2012). Residual DNA analysis in biologics development: review of measurement and

- quantitation technologies and future directions. *BiotechnolBioeng.* 109, 307-17.
- Watkins PA. (2008). Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J Biol Chem.* 283, 1773–1777.
 - WHO 2018 <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
 - Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H .(2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27, 1047–1053.
 - Wolf DE, Winiski AP, Ting AE, Bocian KM, Pagano RE. (1992). Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry.* 31, 2865–2873.
 - Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate PPAR α and PPAR γ gene expression via L-FABP: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci.* 98, 2323–2328.
 - Yang Q, Rout MP, Akey CW. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex — functional and evolutionary implications. *Mol. Cell.* 1, 223–234.
 - Yang Y, Spitzer E, Kenney N, Zschiesche W, Li M, Kromminga A, Muller T, Spener F, Lezius A, Veerkamp JH, Smith, GH., Grosse, R. Salomon, DS. (1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J Cell Biol.* 127, 1097-109.
 - Yoganantharjah P, Gibert Y. (2017). The Use of the Zebrafish Model to Aid in Drug Discovery and Target Validation. *Curr Top Med Chem.* 17, 2041-2055.
 - You WJ, Fan YF, Xu YH, Wu K, Tan XY. (2017). Molecular characterization and functional analysis of PPAR α promoter in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Gene.* 627, 106-113.
 - Zamarreno F, Giorgetti A, Amundarain MJ, Viso JF, Corsico B, Costabel M. (2017). Conserved charged amino acids are key determinants for fatty acid binding proteins (FABPs)-membrane interactions. A multimethodological computational approach. *J. Biomol. Struct. And Dyn.* 36, 861-867.

- Zeng J, Zhang Y, Hao J, Sun Y, Liu S, Bernlohr DA, Sauter ER, Cleary MP, Suttles J, Li B. (2018). Stearic Acid Induces CD11c Expression in Proinflammatory Macrophages via Epidermal Fatty Acid Binding Protein. *J. Immunol.* 200, 3407-3419.
- Zhao X, Pack M. (2017). Modeling intestinal disorders using zebrafish. *Methods Cell. Biol.* 138, 241-270.
- Zimmerman AW, van Moerkerk HT, Veerkamp JH. (2001). Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 865–76.

8. ANEXOS

I) Purificación de plásmido: Miniprep Alcalina

A partir de un precultivo crecido toda la noche:

1. Centrifugar durante 30 segundos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante
2. Resuspender el pellet en 1 mL de tampón SET, vortexear 1 minuto y centrifugar 30 segundos a máxima velocidad.
3. Resuspender nuevamente el pellet en 150 µL de tampón SET y agregar 10 µL de solución de RNAsa y vortexear
4. Inmediatamente agregar 350 µL de mezcla lítica, vortexear y la solución debe volverse clara.
5. Incubar por 10 minutos en hielo.
6. Agregar 250 µL de tampón acetato, invertir el tubo varias veces e incubar en hielo 30 minutos.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante.
8. Agregar un volumen de isopropanol, invertir el tubo varias veces y centrifugar a máxima velocidad 5 minutos a temperatura ambiente.
9. lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%, secar y resuspender en 20 µL de agua estéril.

II) Gel de poliacrilamida de proteínas 15%

Gel separador:

- Bis-acrilamida 30:08; 3,75 mL
- *Buffer* Tris pH8,8; 2,1 mL
- SDS 10%; 75 µL
- Agua mRo 1,685 mL
- TEMED; 3,75 µL
- APS 10%; 37,5 µL

Gel Stacking:

- Bis-acrilamida 30:08; 0,42 mL
- *Buffer* Tris pH 6,8; 0.23 mL
- SDS 10%; 25 µL
- Agua mRo; 1,84 mL
- TEMED; 2.5 µL
- APS 10%; 12,5 µL

Las muestras se preparan en tampón de carga para proteínas 4X y se hierven durante 10 minutos. La electroforesis se realiza en *buffer* de corrida: Solución stock 5X. Tris base 125 mM, Glicina 1,25 M, SDS 0,5% (w/v).

III) Medios de cultivo:

LB/ LB-agar (1L):

- 10 g de Peptona
- 5 g de NaCl
- 5 g de Extracto de levadura
- 15 g de agar

ZYM5052 (Studier, FE et al. 2005) (250 mL)

- 2 g de Triptona
- 1 g de Extracto de levadura

Disolver en 184 mL de H₂O miliQ, y agregar:

- 400 mL de MgSO₄ 1M
- 40 mL de oligoelementos 1000x

Autoclavar.

Luego en esterilidad agregar 8 mL de solución 5052 25x y 8 mL de solución M 25x.

Una vez inoculado el cultivo con el clon deseado se deja crecer hasta una DO de 10 por lo menos.

Soluciones:

- Solución 5052 25x (100mL):
 - 12.5g de glicerol (0.5%)
 - 1.25 g de glucosa (0.05%)
 - 5g de lactosa (0.2%)Autoclavar la solución

- Solución M 25x (100 mL)
 - 8.8g de Na₂HPO₄ (25 mM)
 - 8.5g de KH₂PO₄ (25 mM)
 - 6.7g de NH₄Cl (50 mM)
 - 1.7g de Na₂SO₄ (5 mM)Autoclavar la solución

- Oligoelementos 1000x:
Se preparan en HCl 60 mM
 - FeCl₃ 50 mM
 - CaCl₂ 20 mM
 - MnCl₂ 10 mM
 - ZnSO₄ 10 mM
 - CoCl₂ 2 mM
 - CuCl₂ 2 mM
 - NiCl₂ 2 mM
 - Na₂MoO₄ 2 mM
 - Na₂SeO₃ 2 mM
 - H₃Bo₃ 2 mM

IV) Precipitación con sulfato de amonio

Para 1000 mL de solución:

$$\text{g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{533 \cdot (S_2 - S_1)}{100 - (0.3 \cdot S_2)} \quad S_2 = \% \text{ final} \quad S_1 = \% \text{ inicial}$$

Para la precipitación al 30%, S₁= 0 y S₂=30.

Para la precipitación al 50%. S₁=30 y S₂=50.

V) Eficiencias qPCR

Para el cálculo de las eficiencias se realizaron diluciones seriadas ¼ del plásmido *fabp2*-pET5a para el par de cebadores específico de *fabp2*, y un pool de cDNA de las distintas condiciones para el par de cebadores de *eef1a1*. Los cálculos fueron realizados en el software del equipo Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR a partir de los valores de pendiente de las curvas estándar realizadas.

La eficiencia de la reacción se define matemáticamente como:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

Para la curva estándar de *fabp2* se obtuvo una pendiente de -3.453 y para *eef1a1* de -3.36, lo cual por sustitución en la ecuación anterior corresponde a eficiencias de 95.4 y 98.4 % respectivamente.

VI) Tratamiento de datos en ensayos de unión a ligando

En los ensayos de saturación por unión al ligando fluorescente BODIPY FL C16, se realizaron las medidas de intensidad de fluorescencia (IF) vs concentraciones variables del ligando a una concentración de proteína fija. Para el tratamiento de los datos se realizó el experimento en las mismas condiciones sin el agregado de proteína, de modo de establecer cual es la fluorescencia que emite el BODIPY FL C16 en solución acuosa, y así poder corregir los datos. Los datos para este ensayo sin proteína mostraron una tendencia de ajuste lineal (Figura 8.1), y por lo tanto, su valor de ordenada en el origen fue restado a los datos de IF para cada ensayo con proteínas. Se puede observar que la IF en el ensayo sin proteína a concentración nula de BODIPY FL C16 es muy similar a cuando se agregan concentraciones crecientes de este ligando (línea punteada rosada en Figura 8.1). Probablemente esta fluorescencia detectada corresponda a la dispersión raman del H₂O del medio acuoso que se mide a 530 nm. Para las curvas de saturación de las distintas proteínas se realizó el ajuste hiperbólico $y = \frac{y_0 + Mx}{C50 + x}$, donde C50 corresponde a la K_d, considerando un solo sitio de unión al ligando.

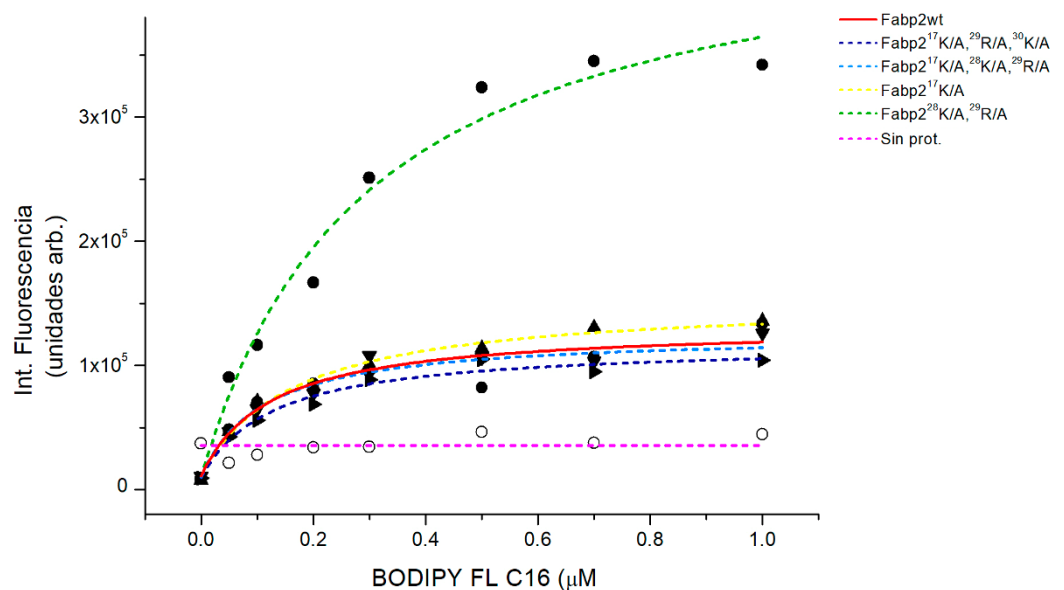


Figura 8.1. Curvas de saturación de Fabp2wt y mutantes, en comparación con el ensayo sin proteína.