

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y EXPRESIÓN DE Lb-FABP (FATTY ACID-BINDING PROTEINS) EN MERLUZA (*Merluccius hubbsi*)

Cecilia Crovetto; Osvaldo Córdoba

Departamento de Bioquímica – Facultad de Ciencias Naturales – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco – Comodoro Rivadavia (9000) - Chubut
E-mail: ccrovetto@unpata.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las FABPs (Fatty Acid Binding Proteins), pertenecen a una familia multigénica de proteínas citosólicas de 14 a 16 kDa, que unen en forma no covalente, ácidos grasos, retinol, ácido retinoico y otras moléculas hidrofóbicas. Son abundantes en tejidos con alto metabolismo lipídico como hígado, intestino, tejido adiposo y corazón.

Ampliamente estudiadas en mamíferos, donde se han identificado la expresión de al menos 13 genes, estas proteínas se han nombrado teniendo en cuenta el tejido donde fueron descritas por primera vez, FABP de tipo hepática (L-FABP), cardíaca (H-FABP), intestinal (I-FABP) y adipocito (A-FABP) entre otras.

Los estudios estructurales muestran una alta conservación entre las FABPs aisladas del mismo tejido de diferentes especies, lo que indica una especialidad de función, pudiendo además, un tipo de FABP estar expresado en más de un tejido. La H-FABP se expresa en riñón, músculo esquelético, aorta, pulmón, glándula mamaria, cerebro, placenta y estómago. Por otro lado algunos tejidos expresan más de un tipo, por ejemplo el riñón expresa L-FABP y H-FABP.

En el hígado de aves y peces estudiados se observa la expresión de una FABP diferente a la que se expresa en mamíferos, que debido a que su pl básico se denomina Lb-FABP.

Los estudios realizados en peces (teleósteos de río y elasmobránqueos), muestran una multiexpresión de FABPs, atribuida a las diversas funciones que realiza el hígado en estos animales, en donde además, actúa como un órgano importante de reserva de lípidos, asociado a la flotabilidad de los mismos.

Estos resultados motivan el estudio de la expresión de esta proteína en un pez teleósteo marino, para lo cual elegimos la merluza, un pez magro que acumula lípidos en su hígado.

OBJETIVO

Estudiar la expresión de FABP en el hígado de merluza (*Merluccius hubbsi*) y poder comparar similitudes y diferencias con otros peces ya estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de merluza (*Merluccius hubbsi*) fueron capturados en el golfo San Jorge, Pcia del Chubut. Se extrajeron los siguientes órganos: hígado, corazón, cerebro, intestino, riñón, músculo y gónadas femeninas; los cuales se homogeneizaron en buffer fosfato de sodio 40 mM, pH 7,4, 1mM EDTA. Se separó la fracción citosólica por centrifugación a 105.000 g durante 90 minutos.

Purificación de Lb-FABP

El homogenato de hígado se fraccionó en una columna de Sephadex G-75 equilibrada en buffer Tris-HCl 30 mM, pH 8,5. La fracción correspondiente a una masa de 14-16 KDa se fraccionó en una columna de DEAE-Celulosa en buffer Tris-HCl 30 mM pH 9,0 y se eluyó con gradiente discontinuo de NaCl (10, 20 y 50 mM). La fracción no retenida

en esta columna se concentró y luego se purificó en una columna mono Q en buffer Tris- HCl 30 mM pH 9 y se eluyó con un gradiente continuo de NaCl 500 mM.

Todas las fracciones fueron analizadas en un SDS-PAGE.

Se purificó una proteína cuya pureza se confirmó mediante HPLC en una columna C₄. (Solvente A: TFA 0,1%; solvente B: acetonitrilo 80%, TFA 0,08%).

Análisis estructural de Lb-FABP

La masa molecular se determinó por HPLC-MS.

Para el análisis de la secuencia primaria, se realiza una hidrólisis con tripsina (las cisteínas se modifican con DTT y IA). La mezcla de péptidos se analizó en un espectrómetro de masas obteniéndose los espectros MS/MS de las señales más importantes.

Estudio de la expresión de Lb-FABP en merluza

Se obtuvieron anticuerpos anti Lb-FABP en ratón mediante la inoculación de cuatro dosis de 20 ug de proteína. El suero inmune se separó por centrifugación y se almacenó a -20°C.

Las fracciones citosólicas de hígado, corazón, cerebro, intestino, riñón, músculo y gónadas se analizaron por Western Blot con anti Lb-FABP 1:400. Como segundo anticuerpo se usó anti IgG de ratón obtenida en cabra acoplada a peroxidasa de rabanita. Se reveló con 4-cloro-1-naftol.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

La proteína purificada (Figura 1a) tiene una masa molecular de 13.864 Da (Figura 1b). Del análisis de los péptidos obtenidos mediante el programa BLASTp, se identificó esta proteína como Lb-FABP (98% de identidad con Lb-FABP *Acanthopagrus schlegelii*; 78% con Lb-FABP *Rhamdia sapo* y 71% de identidad con *Danio rerio*). (Figura 2)

El estudio de la expresión de Lb-FABP en diferentes órganos de merluza mostró que esta proteína se expresa únicamente en el hígado. (Figura 3) Esto estaría asociado a las diferencias en el metabolismo hepático de los lípidos con respecto a los otros órganos estudiados.

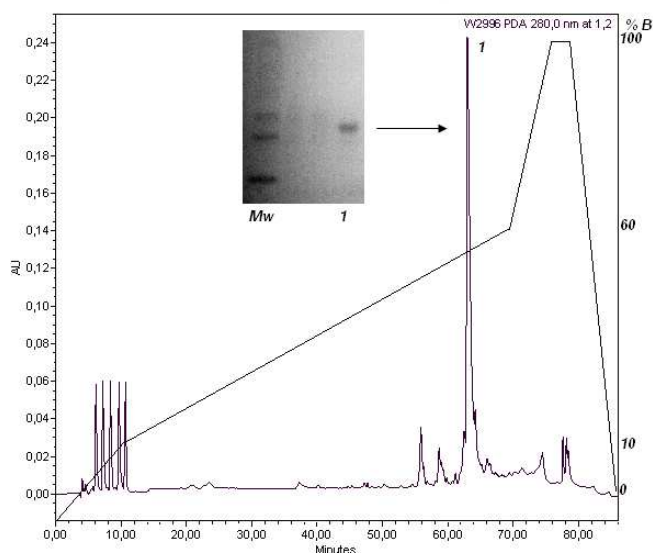


Figura 1a: HPLC en columna C₄ (254 x 4,6 mm, 5 µm). Flujo 0,8 ml/min. Solvente A: TFA 0,1%; solvente B: acetonitrilo 80%, TFA 0,08%.

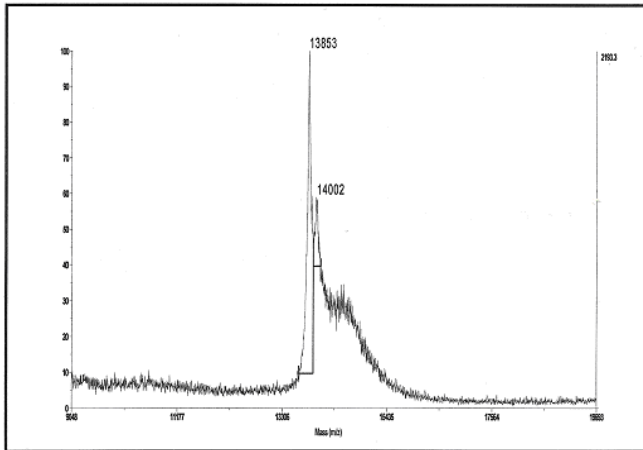


Figura 1b: Espectro de masa obtenido en espectrómetro de masa MALDI TOF TOF

	10	20	30	40	50	60	
Me Lb-FABP						
Dr Lb-FABP	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Rs Lb-FABP	MAFSGTWQVYAQENYEEFLRAISLPEEVIKLAKDVKPVTEIQQNGSDFITTSKTPGKTVT						
Asch Lb-FABP	----GTWQVYAQENYEEFLRAMDLPADVIKMAKDIKPI TEIKQSGNDFVITSKTPGKTVT						
	70	80	90	100	110	120	
Me Lb-FABP						
Dr Lb-FABP	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Rs Lb-FABP	NSFTIGKEAEITMDGKCLKCIVKLDGGKLVCRDRFSHIQEIKAGEMVETLTVGGTMIKRSKKI						71 %
Asch Lb-FABP	NSFTIGKEAEITMDGKCLKCIVNMEGGKLVCKTGKFCHEIKAGEMVETLTVAGTIVRKSCKM						98 %

Figura 2: Alineamiento de diferentes proteínas Lb-FABP (Me: *Merluccius hubbsi*; Dr: *Danio rerio*; Rs: *Rhamdia sapo*; Asch: *Acanthopagrus schlegelii*)

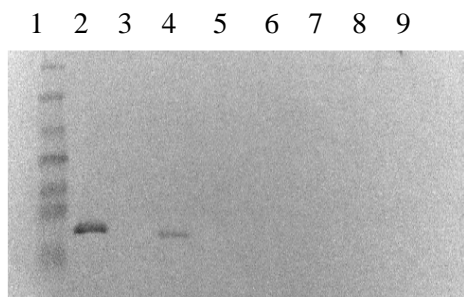


Figura 3: Western Blot de órganos de merluza (1: PM Prestained SDS-PAGE Broad Range, 2: Control positivo Lb-FABP, 3: Músculo, 4: Hígado, 5: Gónada femenina, 6: Riñón, 7: Cerebro, 8: Intestino, 9: Corazón).

REFERENCIAS

Baba, K.; Takahashi, Y.; Aoyagi, Y. & Odani, S. 1999. The amino acid sequence of a lamprey (*Entosphenus japonicus*) liver fatty acid-binding proteins of Mammalia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (123): 223-228.

Kim, S. 2006. Basic liver-type fatty acid binding protein in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: sequence and gene expression in tissue. *Fisheries Science*. (72): 1316-1318

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (76) 9 4350-4354

AGRADECIMIENTOS

LANAIS-PROEM por los análisis de espectrometría de masas realizados.

Lic. Hebe Pérez Gold por la obtención de anticuerpos en Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA).

Dr. Eduardo Fernández (Cátedra de Química Biológica Sede Trelew-FCN – UNPSJB) por su asesoramiento.