

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Maté

NOMBRES: Sabina María

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: City Bell, La Plata CP: 1900 Tel:

*Dirección electrónica (donde desea recibir información): mate.sabina@gmail.com;
smate@med.unlp.edu.ar*

2. TEMA DE INVESTIGACION

PROYECTO 1: Estudio de la influencia de la estructura de la esfingomielina en la interacción esfingomielina-colesterol. Relación con las propiedades biofísicas de membranas biológicas.

PROYECTO 2: Estudio del mecanismo de acción de la toxina alfa-hemolisina de E. coli.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría:

Asistente Fecha: 1-09-2009

ACTUAL: Categoría: Adjunto (aprob. Direct) desde fecha: 11-12-2013

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP).

Facultad: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Departamento:

Cátedra: Bioquímica y Biología Molecular.

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 120 N°: s/n

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221-4824894

Cargo que ocupa: Jefe de Trabajos Prácticos, dedicación Ex.

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: Bakás, Laura.

Dirección Particular: Calle: N°:

¹ Art. 11; Inc. "e" ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica: lbakas@biol.unlp.edu.ar

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

PROYECTO 1: Estudio de la influencia de la estructura de la esfingomielina en la interacción esfingomielina-colesterol. Relación con las propiedades biofísicas de membranas biológicas.

Para el desarrollo de la presente línea se han establecido colaboraciones con otros grupos de investigación, tanto nacionales como extranjeros, con el objetivo de adquirir experiencia y la puesta a punto de metodologías de reciente desarrollo para el estudio de la interacción lípido-lípido y lípido-proteínas, como como AFM y espectroscopía de fuerzas, Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), Balanza de Langmuir-Microscopía de Angulo de Brewster, entre otras.

-En colaboración con los grupos de trabajo de la Dra. María Elena Vela (INIFTA, CCT-La Plata) y el Dr. Bruno Maggio (CCT Córdoba) se realizaron experimentos en sistemas modelo de membrana, empleado la técnica de monocapas y microscopía de fuerza atómica en bicapas soportadas sobre mica con el fin de estudiar la influencia de la composición y propiedades de membranas en la inserción de la toxina HlyA (Ver ítem Publicaciones, paper 1).

-En colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Felix Goñi (de la Universidad del País Vasco), se estudió la influencia de la estructura de la esfingomielina en la organización lateral de membranas biológicas. En dicho trabajo se combinaron diferentes técnicas como Microscopía confocal, AFM-espectroscopía de fuerzas y espectrometría de masas (Ver ítem Publicaciones, paper 2).

Asimismo, durante el año 2014 se profundizó el estudio de los efectos de la presencia de la 24:1 SM en las membranas biológicas. Se estudió la extracción de colesterol con metil- β -CD, tanto en sistema modelo como en membranas biológicas (eritrocitos), mediante experimentos de SPR, DLS (dynamic light scattering) y microscopía de dos fotones (se informara el año próximo).

PROYECTO 2: Estudio del mecanismo de acción de la toxina alfa-hemolisina de E. coli. Se estudió el rol del Cho en el mecanismo de acción lítico de la toxina en estudio. Se encontró, mediante estudios inserción en monocapas de diferente composición lipídica, lipid dot blot y SPR que la interacción directa entre HlyA y el colesterol induce un cambio conformacional en la toxina que facilita su inserción en la membrana. (Ver ítem Publicaciones, paper 3).

Finalmente, durante el período informado se continuó trabajando en colaboración con la Dra. Mariana Farina, del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-UBA-CONICET), en el proyecto: "Efectos de la hipoxia en la fisiología placentaria. Participación del sistema endocannabinoide". En particular, me he dedicado a la puesta a punto de la técnica de obtención de DRM (detergent resistant membranes) de membrana apical y basal de sincitiotrofoblastos de placentas que pasaron por trabajo de parto y placentas de cesárea, para el estudio de la participación de microdominios de membrana en las vías de transducción de señales desencadenadas por los endocannabinoideos. Con los resultados obtenidos se presentaron dos trabajos en Congresos Internacionales (se informara el año próximo).

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1- "Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for Escherichia coli alpha hemolysin: a real-time study". Sabina María Maté*; Romina F Vazquez; Vanesa S Herlax; María A Daza Millone; María L Fanani; Bruno Maggio; María E Vela; Laura S Bakas. Biochem. Biophys. Acta 1838 (2014) 1832–1841.

ABSTRACT: α -Hemolysin (HlyA) is a protein toxin, a member of the pore-forming Repeat in Toxin (RTX) family, secreted by some pathogenic strands of Escherichia coli. The mechanism of action of this toxin seems to involve three stages that ultimately lead to cell lysis: binding, insertion, and oligomerization of the toxin within the membrane. Since the influence of phase segregation on HlyA binding and insertion in lipid membranes is not clearly understood, we explored at the meso- and nanoscale—both in situ and in real-time—the interaction of HlyA with lipid monolayers and bilayers. Our results demonstrate that HlyA could insert into monolayers of dioleoylphosphatidylcholine/sphingomyelin/cholesterol (DOPC/16:0SM/Cho) and DOPC/24:1SM/Cho. The time course for HlyA insertion was similar in both lipidic mixtures. HlyA insertion into DOPC/16:0SM/Cho monolayers, visualized by Brewster-angle microscopy (BAM), suggest an integration of the toxin into both the liquid-ordered and liquid-expanded phases. Atomic-force-microscopy imaging reported that phase boundaries favor the initial binding of the toxin, whereas after a longer time period the HlyA becomes localized into the liquid-disordered (Ld) phases of supported planar bilayers composed of DOPC/16:0SM/Cho. Our AFM images, however, showed that the HlyA interaction does not appear to match the general strategy described for other invasive proteins. We discuss these results in terms of the mechanism of action of HlyA.

Participación personal: diseño y desarrollo experimental (inserción de HlyA en sistema modelo de membranas por técnica de monocapas y AFM), discusión de los resultados y redacción del trabajo.

2- "N-nervonoylsphingomyelin (C24:1) prevents lateral heterogeneity in cholesterol-containing membranes". Sabina Maté*, Jon V. Busto, Aritz B. García-Arribas, Jesús Sot, Romina Vazquez, Vanesa Herlax, Claude Wolf, Laura Bakás and Félix M. Goñi. Biophys J. 2014 Jun 17;106(12):2606-16.

ABSTRACT This study was conducted to explore how the nature of the acyl chains of sphingomyelin (SM) influence its lateral distribution in the ternary lipid mixture SM/cholesterol/1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), focusing on the importance of the hydrophobic part of the SM molecule for domain formation. Atomic force microscopy (AFM) measurements showed that the presence of a double bond in the 24:1 SM molecule in mixtures with cholesterol (CHO) or in pure bilayers led to a decrease in the molecular packing. Confocal microscopy and AFM showed, at the

meso- and nanoscales respectively, that unlike 16:0 and 24:0 SM, 24:1 SM does not induce phase segregation in ternary lipid mixtures with DOPC and CHO. This ternary lipid mixture had a nanomechanical stability intermediate between those displayed by liquid-ordered (Lo) and liquid-disordered (Ld) phases, as reported by AFM force spectroscopy measurements, demonstrating that 24:1 SM is able to accommodate both DOPC and CHO, forming a single phase. Confocal experiments on giant unilamellar vesicles made of human, sheep, and rabbit erythrocyte ghosts rich in 24:1 SM and CHO, showed no lateral domain segregation. This study provides insights into how the specific molecular structure of SM affects the lateral behavior and the physical properties of both model and natural membranes. Specifically, the data suggest that unsaturated SM may help to keep membrane lipids in a homogeneous mixture rather than in separate domains.

Participación personal: diseño y ejecución de los experimentos para el estudio de las composiciones lipídicas mediante espectrometría de masas de eritrocitos de diferentes especies de animales; discusión de los resultados y redacción del trabajo.

3- “The novel evidence of the specific interaction between cholesterol and a RTX toxin” Romina Vazquez, Sabina Maté, Laura Bakás, Marisa Fernandez, Emilio Malchiodi y Vanesa Herlax. *Biochemical J.* 2014 458(3): 481-489.

ABSTRACT: Several toxins that act on animal cells present different, but specific, interactions with cholesterol or sphingomyelin. In the present study we demonstrate that HlyA (α -haemolysin) of *Escherichia coli* interacts directly with cholesterol. We have recently reported that HlyA became associated with detergent resistant membranes enriched in cholesterol and sphingomyelin; moreover, toxin oligomerization, and hence haemolytic activity, diminishes in cholesterol-depleted erythrocytes. Considering these results, we studied the insertion process, an essential step in the lytic mechanism, by the monolayer technique, finding that HlyA insertion is favoured in cholesterol- and sphingomyelin containing membranes. On the basis of this result, we studied the direct interaction with either of the lipids by lipid dot blotting, lysis inhibition and SPR (surface plasmon resonance) assays. The results of the present study demonstrated that an interaction between cholesterol and HlyA exists that seems to favour a conformational state of the protein that allows its correct insertion into the membrane and its further oligomerization to form pores.

Participación personal: diseño y ejecución de los experimentos de monocapas (inserción de HlyA en sistema modelo de membranas), participación en la discusión de los resultados y redacción del trabajo.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

- 7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*
- 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*
- 7.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*
- 7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*
- 8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.**
- 8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*
- 8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.** *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*
- 8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.** *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*
- 8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES** *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*
- 8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.**
- 9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.** *Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.*
- 10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**
- 10.1 DOCENCIA**
- 10.2 DIVULGACIÓN**
- 11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.** *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

Codirectora del Becario del Proyecto de Extensión titulado "Fortalecimiento de capacidades locales para mejorar el hábitat". Dicho Proyecto ha sido acreditado y financiado por la Comisión de Extensión de las Actividades Universitarias, UNLP.

12. DIRECCION DE TESIS. *Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.*

Co-directora de Tesis de la Bioquímica Romina Vazquez. Título: "Mecanismo de acción de alfa-hemolisina de E. coli en eritrocitos a concentraciones sublépticas".

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Presentaciones en Congresos Nacionales:

1- "Caracterización del proceso eriptótico desencadenado por concentraciones sublépticas de alfa hemolisina de E. coli". Fernanda Carrizo, Sabina Maté, Laura Bakás y Vanesa Herlax, presentado en las Jornadas de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP, 2014.

2- "Producción de factor de crecimiento epidermal humano recombinante biológicamente activo". Daniela Lufrano, Javier García Pardo, Julia Lorenzo, David Obregón, Sabina Maté y Laura Bakas, presentado en las Jornadas de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP, 2014.

3- "Preparación de bicapas lipídicas soportadas mediante SPR". M. Antonieta Daza Millone, M. Elena Vela, Vanesa S. Herlax y Sabina Maté. Presentado en el V Encuentro Argentino de Materia Blanda, INIFTA, Septiembre de 2014.

4- "Supported lipid bilayers for molecular interaction studies by SPR". M. Antonieta Daza Millone, M. Elena Vela, Vanesa S. Herlax and Sabina Maté. Trabajo aceptado para ser presentado (Comunicación oral) en la XLIII Reunión Anual de SAB, Sierra de la Ventana, Diciembre de 2014.

5- "Interaction of Cholesterol with Sphingomyelins: kinetics of cholesterol extraction by ciclodextrin from natural and model membranes". Daza Millone, M.A.; Herlax, V.; Vela, M. E.; Bakás, L. and Maté, S. Trabajo aceptado para ser presentado (Poster) en la XLIII Reunión Anual de SAB, Sierra de la Ventana, Diciembre de 2014.

6- "Synthesis, purification and characterization of peptides derived from E. coli alpha hemolysin". Fanny Guzmán, Sabina Maté, Laura Bakás and Vanesa Herlax. Trabajo aceptado para ser presentado (Poster) en la XLIII Reunión Anual de SAB, Sierra de la Ventana, Diciembre de 2014.

7- "N-Nervonoylsphingomyelin (C24:1) in cholesterol- containing membranes. An AFM study of bilayer heterogeneity". Aritz B. García-Arribas, Sabina Maté, Jon V. Busto, Jesús Sot, Romina Vazquez, Vanesa Herlax, Claude Wolf, Laura Bakás and Félix M. Goñi. Presentado en el 18 th IUPAB Congress Brisbane, Australia, 3-7 Agosto de 2014.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

1- Subsidio Institucional para Investigadores de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Año 2014. Monto recibido: \$7000.

2- Proyecto: "Toxinas de interés para la biomedicina (BIOTOX). Institución otorgante: CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. N° de

resolución: 212RT0467 Director: Dr. Carlos Manuel Álvarez Valcárcel. Integrante del Grupo Argentina. Duración: 2012-2015.

3- Proyecto: "Relación estructura-función de HlyA de E.coli: Caracterización de sitios de unión a colesterol y rol de los residuos de triptófano en el mecanismo de acción". Institución otorgante: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). Subsidio PICT-Grupo Reciente Formación PICT 2013 2657. Duración: 3 años (2014-2016). Directora: Dra. Vanesa Herlax. Grupo responsable: Dra. Sabina Maté. Monto total: \$199.500.

4- Proyecto "Equipamiento para la implementación de tecnologías emergentes en bioquímica, biofísica y biología molecular". Institución otorgante: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). Subsidio PICT-E 2014. Monto total: \$ 1.460.000. Director: Horacio Garda. Miembro del Grupo Responsable.

5- Proyecto: "Relación estructura-función de HlyA de E.coli: Caracterización de sitios de unión a colesterol y rol de los residuos de triptófano en el mecanismo de acción". Institución acreditadora: Secretaría de Ciencia y Técnica de UNLP (M11-181). Año de inicio – año de finalización: 2014-2015. Monto primer año: \$13000. Director: Dra. Laura Bakás. Integrantes: Dra. Sabina Maté-Dra. Vanesa Herlax- Bioq. Romina Vázquez.

6- Proyecto: "Diseño de nanopartículas conteniendo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) para el tratamiento de las úlceras del pie diabético". Institución acreditadora: Secretaría de Ciencia y Técnica de UNLP (M11). Año de inicio – año de finalización: 2014-2017. Monto primer año: \$13000. Director: Dra. Laura Bakás. Integrante: Dra. Sabina Maté.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

- Mención en el Premio ARQUISUR a la Extensión 2014, XXXIII Encuentro y XVIII Congreso - Premio ARQUISUR Arq. José Miguel Aroztegui, Septiembre de 2014, La Paz, Bolivia. Trabajo correspondiente al Proyecto de Extensión FAU "Construcción de conocimientos compartidos para actuar sobre los condicionantes y determinantes de la salud" - Autores: Arqs. Julio S. Caviglioni - Adrian Saenz - Luciano Lafosse - Dra. Sabina Maté/ Facultad de Cs. Médicas (INIBIOLP). Guillermo Maltempo - Leandro Bonnin (estudiantes).

- Premio al mejor trabajo de Investigación Básica presentado en las Jornadas de la Facultad de Ciencias Médicas de UNLP, 2014. "Caracterización del proceso eriptótico desencadenado por concentraciones subléxicas de alfa hemolisina de E. coli". Fernanda Carrizo, Sabina Maté, Laura Bakás y Vanesa Herlax.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

JEFE DE TRABAJOS PRÁCTICOS ORDINARIO con Dedicación Exclusiva. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Las tareas inherentes al Cargo docente que desempeño en la Catedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Fac. de Cs. Médicas de la UNLP insumen un 20 % de mi tiempo de trabajo.

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

- Codirectora del Proyecto de Extensión titulado "Fortalecimiento de capacidades locales para mejorar el hábitat". Dicho Proyecto ha sido acreditado y financiado por la Comisión de Extensión de las Actividades Universitarias, UNLP.

- Jurado del Trabajo Final, Laboratorio de Procesos Biotecnológicos de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la Srta. Geraldine Garrahan. Facultad de Cs. Exactas, UNLP. Año 2014.

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

PROYECTO 1: Puesta a punto de metodologías de reciente desarrollo para el estudio de interacciones lípido-lípido y lípido-proteínas.

El objetivo principal de la línea de trabajo consiste en el estudio de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína para la organización y estructura de membranas biológicas. Para el desarrollo de la presente línea se utilizan metodologías bioquímicas y biofísicas clásicas así como también metodologías de desarrollo más reciente, como AFM y espectroscopía de fuerzas, Resonancia de Plasmones Superficiales, Balanza de Langmuir-Microscopía de Angulo de Brewster, entre otras. El objetivo específico para el año en curso consiste en el desarrollo de sistemas modelo de membranas biológicas sobre sustratos plasmónicos de oro modificados químicamente. Se empleará la técnica de SPR para seguir la formación del sistema y se analizará la calidad de las bicapas formadas mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Estos estudios se realizarán en el marco de una colaboración ya establecida con la Dra. Maria Elena Vela y la Dra. María A. Daza Millone, de INIFTA.

Las membranas biológicas actúan como barreras para separar y proteger a la célula y sus componentes del medio externo. También proveen un ambiente adecuado para soportar moléculas y macromoléculas que intervienen en un amplio rango de procesos biológicos. Realizar investigaciones sistemáticas utilizando membranas biológicas "naturales" puede resultar engorroso debido a su complejidad intrínseca y a sus heterogeneidades [1]. Por esta razón, desde hace varias décadas se emplean estructuras de membrana biomiméticas, de las cuales las bicapas de fosfolípidos soportadas (SLBs) se encuentran entre los modelos comúnmente aceptados [2]. Entre sus ventajas radica el hecho de que son capaces de autoensamblarse en formaciones planares sobre sustratos, convirtiéndolas en modelos ideales para estudios estructurales y funcionales mediante técnicas de superficie. En este punto es crucial el diseño de la química de superficie del sustrato para lograr una adsorción estable y evitar la desnaturalización de sus componentes.

Dentro de las técnicas empleadas para el estudio en SLBs existe un creciente desarrollo en aquellos ensayos que no requieren marcadores ("label-free"), ya que de este modo se prescinde del empleo de reactivos que pueden interferir en una interacción determinada. Este punto es crítico para la eficiencia de biosensores para diagnóstico o bien para sistemas de screening de fármacos, en los cuales se requiere una alta sensibilidad para el reconocimiento molecular. Además, se elimina el problema de falsos positivos que ocurre frecuentemente con el empleo de sondas fluorescentes. Entre las técnicas "label-free", la resonancia de plasmones superficiales (SPR) se considera una de las técnicas bioquímicas más importantes para el estudio de interacciones moleculares [3].

En un experimento típico de SPR, se forma una membrana de lípidos (ligando) encima de una superficie de oro recubierta con una monocapa hidrofílica denominada “chip-sensor”, sobre la que luego se hace pasar un flujo de una solución de proteína (analito) a una determinada concentración. La unión de la proteína a la membrana cambia el índice de refracción cerca de la superficie, lo que resulta en el cambio del ángulo de resonancia al cual se sintonizan los plasmones de superficie, que son excitados con un laser de 670 nm en condición de reflexión total interna (TIR). El cambio se expresa en unidades de corrimiento del ángulo de resonancia y es linealmente proporcional a la cantidad de proteína unida [4]. Las curvas de unión (sensogramas) se utilizan para determinar las velocidades de asociación y disociación ajustando los datos experimentales a un modelo de unión. Si bien mediante esta técnica es posible seguir in situ la formación de una SLB, es necesario recurrir a otras técnicas para verificar el grado de cubrimiento de la superficie, la continuidad de la bicapa y su homogeneidad. En el marco de este proyecto, durante el año en curso se planea entonces caracterizar las distintas superficies mediante microscopías de fuerzas atómicas. Una vez puesta a punto esta metodología de trabajo, esta técnica se utilizará para el estudio de interacciones de diferentes drogas con membranas, como metil beta ciclodextrina, así como también para el estudio de la interacción entre la toxina bacteriana alfa hemolisina, secretada por ciertas cepas patógenas de *E. coli*, y distintos tipos de esteroides (ver Proyecto 2).

Metodología

Las membranas soportadas se prepararán a partir de vesículas artificiales compuestas por un único fosfolípido (ej: DPPC, DPPE, esfingomielinas) o bien por mezclas binarias (ej: DPPC/esfingomielina, DPPC/colesterol) o ternarias (ej: DPPC/esfingomielina/colesterol). La superficie de oro sensora se modificará con una SAM de DTT para lograr la interface hidrofílica necesaria para la fusión de vesículas. La formación de la SAM se realizará ex situ mediante la inmersión de la placa de oro en una solución de DTT 100 μ M en etanol durante media hora a temperatura ambiente.

Entre los parámetros a optimizar se encuentran:

- 1) Tamaño, estructura (unilamelares/multilamelares) y concentración de las vesículas lípidicas.
- 2) Buffer de corrida
- 3) Velocidad de flujo del buffer de corrida
- 4) Solución de lavado para remoción de multicapas
- 5) Método de regeneración de la superficie (eliminar in situ la bicapa formada para un nuevo ensayo) sin afectar a la SAM de DTT

Bibliografía

- [1] Lipowsky, R. European White Book on Fundamental Research in Materials Science. (ed. M. Rühle) 78-82 (Max-Planck-Institut für Metallforschung, Stuttgart; 2001)
- [2] Groves, J.T. Supported Lipid Bilayers as Mimics for Cell Surfaces and as Tools in Biotechnology in BioMEMS and Biomedical Nanotechnology. (eds. M. Ferrari, T. Desai, S. Bhatia) 305-323 (Springer US, Boston, MA; 2006).
- [3] Besenicar, M., Macek, P., Lakey, J. H. Anderluh, G. Chemistry and Physics of Lipids 141 (2006) 169–178
- [4] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky. J. Colloid Interface Sci. 143 (1991) 513-526.

PROYECTO 2: Durante el presente año espero continuar colaborando con el Estudio del mecanismo de acción de la toxina alfa-hemolisina de *E. coli*.

En nuestro país la bacteria *Escherichia coli* causa del 75% al 90% de los episodios de infecciones urinarias, prevaleciendo en la infección urinaria neonatal, pediátrica, en la cistitis no complicada o recurrente de la mujer fértil, así como en la pielonefritis [1]. Existe un grupo de cepas de *E. coli* denominadas cepas patogénicas extraintestinales

(ExPEC), estos patógenos son comensales normales del intestino, pero una vez que salen del mismo producen una serie de patologías como infección urinaria, meningitis y septicemia. A estas cepas se las denomina cepas uropatogénicas de *E. coli* (UPEC). La habilidad de las mismas para invadir y colonizar otros tejidos está determinado por un conjunto de factores, donde se incluyen: factores de adherencia, toxinas, sistemas de adquisición de hierro (sideróforos) y antígenos capsulares [2]. Dentro de las toxinas que estas cepas secretan se encuentra alfa hemolisina (HlyA) y el factor citotóxico necrotizante 1 (CNF-1). Ambas han demostrado alta correlación con septicemia y daño renal [3].

HlyA presenta un amplio espectro de células blanco, como fibroblastos, células endoteliales, granulocitos, monocitos y macrófagos de diferentes especies. El mecanismo de acción lítica es un mecanismo complejo que finaliza en la lisis celular. En este proceso, se han reconocido al menos 3 etapas: unión a la membrana de la célula blanco, inserción y oligomerización. En cuanto a la interacción con las células, se proponen al menos dos fases en la citotoxicidad de HlyA: una fase de adsorción pasiva a la superficie de la célula y luego una fase de inserción a la membrana. Por estudios con liposomas se determinó que la fase de adsorción es reversible, está gobernada por fuerzas electrostáticas y no necesariamente conduce a la lisis celular [4]. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que HlyA interacciona con el colesterol presente en la membrana y que dicha interacción induce un cambio conformacional en la toxina que favorece su inserción en la membrana, necesaria para la oligomerización y la formación del poro [5]. Durante el año en curso se estudiara la interacción preferencial entre la toxina y diferentes esteroides, como colesterol y ergosterol, a fin de elucidar los determinantes moleculares de la interacción HlyA-Colesterol.

Se estudiará la actividad hemolítica de la toxina frente a liposomas conteniendo DOPC/esterol (colesterol o ergosterol) en diferentes relaciones molares, así como su unión (mediante SPR) e inserción (mediante balanza de Langmuir) a/en membranas de diferente composición lipídica.

La técnica de SPR se utilizará para el estudio del primer paso del mecanismo de acción de HlyA, esto es, la unión de la toxina a la membrana. La Resonancia de plasmones superficiales permite la determinación de forma rápida y directa de las velocidades de asociación y disociación y el monitoreo de la unión de las proteínas a una membrana sin necesidad del marcaje de la proteína o los lípidos con sondas específicas. Esta técnica posee una alta sensibilidad de detección, lo que posibilita trabajar con bajas concentraciones de muestra (en el rango nM). Los experimentos de SPR no sólo permiten obtener información relativa a la afinidad entre biomoléculas (cálculo de las constantes de unión), sino que también proveen información cinética, que puede ayudar a comprender el modo de unión, la existencia de cambios conformacionales y de eventos de oligomerización [6].

Existen diferentes métodos experimentales para la preparación de la superficie del sensor de SPR mimetizando membranas lipídicas. Estos métodos contemplan tanto la preparación de membranas lipídicas planas como de liposomas intactos "capturados" sobre el sensor. La puesta punto de la metodología para el estudio de las interacciones entre HlyA y membranas de diferentes composiciones lipídicas se contempla en el Proyecto 1.

Mediante la técnica de monocapas lipídicas se puede diseccionar el proceso de inserción de la toxina del proceso de lisis, dado que la monocapa no experimenta la reestructuración tridimensional requerida para alterar la barrera de permeabilidad de membrana que tiene lugar durante la lisis. La inserción de la toxina en las monocapas de diferente composición lipídica se evaluará a partir de los cambios en la presión lateral de la monocapa como consecuencia de la inserción de la toxina, agregada en la subfase acuosa.

Bibliografía

- [1]- Casellas, J. M. (2008) Anuario Fundación Dr. J.R Villavicencio 16, 150-154
 - [2]-Wiles, T. J., Bower, J. M., Redd, M. J., and Mulvey, M. A. (2009) PLoS Pathog 5(12), e1000697
 - [3]-Marrs, C. F., Zhang, L., and Foxman, B. (2005) FEMS Microbiol Lett 252, 183–190
 - [4]-Ostolaza, H., Bakas, L., and Goñi, F. (1997) J Membr Biol. 158(2), 137-145
 - [5]- Vazquez, R., Maté, S., Bakás, L., Fernandez, M., Malchiodi, E., and Herlax, V. Biochemical J. 2014 458(3): 481-489.
 - [6]- de Mol, N. J., Fischer, M.J., 2010. Surface Plasmon Resonance: A general introduction. In: de Mol, N.J., Fisher M. J. E. (Eds) Fischer Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols. Humana Press, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
-

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda “Informe Científico Período”.
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.