

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y  
TECNOLÓGICO**  
**Informe Científico**<sup>1</sup>

**PERIODO** <sup>2</sup>: **2013**

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): smate@med.unlp.edu.ar*

**2. TEMA DE INVESTIGACION**

Participación de microdominios de membrana en el mecanismo de acción de la toxina HlyA.  
Validación de métodos para trabajar con membrane rafts.

**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°:*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:*

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

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

<sup>2</sup> 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.

.....  
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.*

1- El objetivo general del proyecto de investigación en el que participo consiste en profundizar el conocimiento concerniente al mecanismo de acción de la toxina proteica alfa-hemolisina (HlyA), secretada por ciertas cepas patógenas de Escherichia coli. En relación con dicha línea se encuentra el estudio de la Validación de métodos de estudio de membrane rafts.

Durante el periodo que informo en esta oportunidad (año 2013) se realizaron experimentos, revisión de resultados, re-redacción de los trabajos, etc requeridos por los referees para la publicación de dos papers, en los que se estudió:

a) la influencia de la composición y propiedades de membranas (segregación de fases) en la inserción de la toxina HlyA. Para ello se realizaron experimentos en sistemas modelo de membrana, empleado la técnica de monocapas y microscopía de fuerza atómica, en bicapas soportadas sobre mica. En ese trabajo se visualizó por primera vez, en tiempo real, la interacción de HlyA con membranas; se determinó que la toxina se inserta preferencialmente en fases líquido-desordenadas (ld), donde el empaquetamiento lipídico es menor, en comparación con fases líquido-ordenadas (lo). En este trabajo se muestra entonces que una proteína acilada, que se ha visto asociada a DRM, se inserta preferencialmente en fases ld, contribuyendo al esclarecimiento de una cuestión controvertida, referente a la interacción de este tipo de proteínas con membranas. El paper correspondiente ("Escherichia coli alpha-hemolysin, an acylated protein: preferential insertion into liquid-disordered domains of membranes—a Real-time study") fue enviado para su publicación a la revista BBActa y, al mes de Diciembre de 2013, se encontraba en segunda ronda de revisión.

b) el rol del Cho en el mecanismo de acción lítico de la toxina en estudio. Se encontró, mediante estudios de lipid dot blot y surface plasmon resonance (SPR) que la interacción directa entre HlyA y el Cho induce un cambio conformacional en la toxina que facilita su inserción en la membrana. El paper correspondiente ("The novel evidence of the specific interaction between cholesterol and a RTX toxin") fue enviado para su publicación a la revista Biochemical Journal y, al mes de Diciembre de 2013, se encontraba en prensa.

Además, durante el año 2013 y a partir del intercambio con el Dr. Felix Goñi (de la Universidad del País Vasco), se realizaron algunos experimentos y se redactó la versión final de un trabajo titulado "N-nervonoylsphingomyelin (C24:1) prevents lateral heterogeneity in cholesterol-containing membranes". En dicho trabajo se estudió la influencia de la estructura de la esfingomielina en la organización lateral de membranas biológicas. En el mismo se combinaron diferentes técnicas como Microscopía confocal, AFM -espectroscopia de fuerzas y espectrometría de masas.

Finalmente, durante el período informado (año 2013) comencé a realizar trabajos 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". Actualmente contamos con un subsidio de Florentino Fiorini para su financiación. Mi participación en este proyecto tiene que ver con la participación de microdominios de membrana en las vías de transducción desencadenadas por los endocannabinoideos.

## **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- Mecanismo de acción de la toxina alfa-hemolisina de Escherichia coli. Bakás Laura, Maté Sabina, Vazquez Romina y Herlax Vanesa. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Volumen 47, Nro.2 353-361 (2013).

Abstract. Escherichia coli es una de las bacterias anaerobias facultativas más predominantes en el intestino, siendo, en la mayoría de los casos, inocua para el huésped. Existen cepas que traslocan al torrente sanguíneo causando enfermedades extraintestinales como infecciones urinarias, septicemia y meningitis. Dentro de éstas se encuentran las cepas uropatogénicas (Uropathogenic Escherichia coli: UPEC), que secretan varios factores de virulencia. Estos últimos incluyen: toxinas, sistemas de adquisición de hierro, adhesinas y antígenos capsulares. Las principales toxinas secretadas son: alfa-hemolisina (HlyA) y el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1). En esta revisión se presenta una descripción exhaustiva de HlyA, incluyendo su síntesis, maduración y exportación desde la bacteria. La acilación de la proteína en dos residuos internos de lisina la convierte en una toxina muy virulenta al exponer regiones intrínsecamente desordenadas que son esenciales en diferentes pasos del mecanismo de acción de la misma. Específicamente, la exposición de estas regiones está involucrada en interacciones proteína-proteína dentro del proceso de oligomerización. La formación del oligómero es responsable de la permeabilidad inducida en las células blanco. Finalmente, basado en los conocimientos acerca de las características estructurales y funcionales de HlyA, se presentan potenciales usos de HlyA en terapias basadas en toxinas

Participación personal: participación en la discusión de los resultados para la 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.*

1-“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.* (en prensa).

Abstract. Several toxins that act on animal cells present different but specific interactions with cholesterol or sphingomyelin. In the present investigation we demonstrate that alpha-hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) 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 hemolytic activity—diminishes in cholesterol depleted erythrocytes. Considering these results, we studied the insertion process -essential step in the lytic mechanism- by the monolayer technique, finding that HlyA insertion is favored 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 surface-plasmon-resonance assays. The results demonstrated that an interaction between cholesterol and HlyA exists that seems to favor a conformational state of the protein allowing the correct insertion into the membrane and 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.

### **7.3 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.*

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. En segunda ronda de revisión para su publicación en *Biochem. Biophys. Acta*.

Abstract:  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) is a protein toxin, 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. Atomicforce-microscopy imaging reported that phase boundaries favors 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. However, our AFM images 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.

### **7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

- 1- "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.

**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 made of 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. AFMforce spectroscopy measurements showed that the presence of the double bound in the 24:1 $\Delta$ 15SM molecule, in mixtures with cholesterol (CHO) or in pure bilayers, led to a decrease in the molecular packing. Confocal and atomic force microscopy (AFM) showed, at meso and nanoscale respectively, that unlike 16:0 and 24:0SM 24:1SM 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, evidencing that 24:1SM 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 24:1SM and CHO, showed no lateral domain segregation. This study provides insights on how the specific molecular structure of SM affects the lateral behavior and the physical properties of both model and natural membranes.

**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.

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". En ejecución.

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.

1- "Early effects produced by the interaction of sublytical concentration of alpha hemolysin of E.coli with erythrocytes. Romina Vazquez, Fernanda Carrizo, Sabina Maté, Laura Bakás and Vanesa Herlax. Presentado en la XLI Reunión Anual de SAB, en Carlos Paz, Córdoba, 3 al 6 de Diciembre de 2013.

2- "Estudio en tiempo real de la inserción de alfa-hemolisina en dominios líquido desordenado de membrana". Vela, M.E. Mate, S. Herlax, V. Vazquez, R., Daza Millone, M.A., Fanani L., Maggio, B. Bakas, L., 12th Interamerican Microscopy Congress, 24 al 28 de Septiembre del 2013, Cartagena de Indias, Colombia.

3- "La microscopía de fuerzas atómicas como herramienta para la investigación en el área de las ciencias médicas", Mate, S; Herlax, V; Vazquez, R; Bakás,L, Ramella, NA, Tricerri, MA, Vela M,E., 1º Congreso Internacional de la Fac. Ciencias Médicas, 28 al 30 de noviembre de 2013, La Plata, Argentina.

4- "Efectos tempranos en la interacción de concentraciones sublépticas de la toxina alfa hemolisina de E.coli con eritrocitos", Vazquez, R., Carrizo-Velazquez, F., Maté, S., Bakás, L. y Herlax, V. 1º Congreso Internacional de la Fac. Ciencias Médicas, 28 al 30 de noviembre de 2013, La Plata, Argentina.

5- "New insights into the mechanism of action of E. coli alpha hemolysin: Cholesterol as a modulator of toxin activity? Romina Vazquez; Sabina Maté; Laura Bakás; Marisa Fernández; Emilio Malchiodi and Vanesa Herlax. XI Congress of the Pan American Section of the International Society on Toxinology and the XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology from 3 to 8 November 2013, in Guarujá, São Paulo.

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

1- Curso “Monocapas lipídicas como Modelo de Membranas Biológicas”, dictado por la Dra. Laura Fanani, del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la UNC. Realizado en el INIBIOLP, los días 25 y 26 de Abril de 2013.

**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 2013. Monto recibido: \$6000.

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- Subsidio Florencio Fiorini para Investigación en Ciencias Biomédicas. Título del Proyecto: “Efectos de la hipoxia en la fisiología placentaria. Participación del sistema endocannabinoide”. Monto otorgado: \$ 40000. Directora: Dra. Mariana Farina. Grupo Colaborador: Dra. Sabina Maté. Año 2013.

4- Programa de Subsidios para Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica de la CIC Pcia. De Buenos Aires. Título: Diseño de nanopartículas conteniendo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) para el tratamiento de las úlceras del pie diabético. Directora: Dra. Laura Bakás. Grupo Integrante: Dra. Sabina Maté. Financiamiento aprobado por el Directorio de la CIC Pcia. Bs As en Acta....Monto aprobado: \$25000 (pesos).

**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.**

**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.*

- Miembro del Proyecto de Extensión titulado "Capacidades locales para mejorar el ambiente, fortalecimiento, ejecución. Fortalecimiento de las capacidades locales para mejorar el ambiente (FdeC). Sus implicancias y ejecución en el territorio ", perteneciente al area tematica Ambiente, Urbanismo y Patrimonio. Proyecto presentado en el año 2013, acreditado sin subsidio, por la Comisión de Extensión de las Actividades Universitarias.

- Carrera de especialización en docencia Universitaria (Categoría A, Resolución N° 262/13 CONEAU). Materias cursadas de la Carrera de Especialización en docencia universitaria que se dicta en la Universidad Nacional de La Plata (constituye el 90 % de la carrera aprobada):

- .Problemática de enseñanza en Ciencias de la salud
- .Perspectiva sociopolítica del sistema universitario
- .Diseño y coordinación de procesos formativos
- .Proceso de evaluación en la Universidad
- .Desarrollo e Innovación Curricular
- .Investigación e intervención en la práctica docente universitaria
- .Pedagogía y Universidad
- .Políticas Educativas y Educación superior comparada.
- .Taller de Producción del Trabajo Final

- Organización del curso "Monocapas lipídicas como Modelo de Membranas Biológicas", dictado por la Dra. Laura Fanani, del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la UNC. Realizado en el INIBIOLP, los días 25 y 26 de Abril de 2013.

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

Fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) son las clases lipídicas mayoritarias de la hemicapa externa de la membrana plasmática de células de mamíferos. El esqueleto mas comun de la SM es la esfingosina, un aminoalcohol que contiene una cadena hidrocarbonada larga e insaturada (1). En la SM, el grupo hidroxilo primario de la esfingosina esta esterificado a la fosforilcolina; además, el grupo amino de la esfingosina esta unido a un ácido graso mediante un enlace amida. Si bien tradicionalmente se considera que estos ácidos grasos son típicamente largos (16-24 C) y saturados, muy recientemente se ha reconocido a la 24:1  $\Delta$ 15 SM como cadena acilo comun (incluso, a veces, mayoritaria) en algunas SM naturales (2), (3).

Se propone que interacciones preferenciales entre la SM y el colesterol (Cho) constituyen un elemento clave en la formación y estabilización de dominios de membrana, que se conocen como membrane rafts (4),(5),(6). Ambos lípidos poseen tanto grupos dadores como aceptores de hidrógeno, los que, sumado a la estructura plana y extendida del Cho, promueven un alto grado de empaquetamiento entre ambos lipidos, dando origen a los arreglos o estados de fase conocidos como liquido ordenados (Lo arrangement) (7). La fase Lo se caracteriza por poseer un empaquetamiento lipídico similar al de fases en estado gel pero, también, por poseer coeficientes de difusión laterales similares a los de fases liquido desordenadas (8). En un trabajo muy reciente (9), realizado en colaboración con el grupo del Dr. Félix Goñi, de la Universidad del Pais Vasco, estudiamos el efecto de la presencia de la 24:1 SM, en comparación con 24:0 y 16:0 SM, en la formación de dominios de membrana (Trabajo que se envió para su



publicación al *Biophys. J* a principios del año 2014). En dicho trabajo, mediante microscopia confocal y AFM (atomic force microscopy), demostramos que la 24:1 SM suprime la segregación de fases en mezclas lipídicas ternarias (DOPC/SMs/Cho) y en membranas biológicas (G-Ghosts derivados de eritrocitos de carnero, conejo y humanos).

En el presente plan de trabajo proyectamos profundizar el estudio de los efectos de la presencia de la 24:1 SM en las membranas biológicas. El objetivo para el presente año consiste en el estudio de la extracción de Cho con metil- $\beta$ -CD, tanto en sistema modelo como en membranas biológicas. Las ciclodextrinas (CDs) conforman una familia de oligómeros cíclicos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos; los miembros de dicha familia difieren en el número de unidades de glucosa que forman parte del anillo. Varias CDs y sus derivados se han utilizado durante muchos años en investigaciones farmacológicas como carriers de drogas y, en las últimas décadas, en estudios biofísicos y bioquímicos relativos al rol del Cho en membranas biológicas (10). Por ejemplo, la metil- $\beta$ -CD se ha utilizado en estudios de extracción de Cho de membranas biológicas (11). En este contexto, recientemente Besenica et al (11) reportaron que la presencia de SM reduce drásticamente la extracción de Cho, tanto de membranas sintéticas como de membranas naturales (eritrocitos).

Los objetivos específicos contemplan el uso de variadas metodologías:

Experimentos en sistemas modelo:

1- Estudiar la cinética de extracción de Cho de vesículas unilamelares grandes (LUVs) compuestas por PC/16:0SM/Cho o PC/24:1SM/Cho con metil- $\beta$ -CD. Se incubarán las LUVs en presencia de diferentes concentraciones de CD y la extracción de Cho a partir de las mismas se estudiará mediante determinación del cambio de tamaño de las LUVs en el tiempo, por light scattering.

Se plantea también estudiar la cinética de extracción de Cho con CD a partir de liposomas (PC/16:0SM/Cho o PC/24:1SM/Cho) inmovilizados, mediante surface plasmon resonance. Estos experimentos se realizarán en colaboración con la Dra. María Elena Vela, en el INIFTA, donde se encuentran los equipos de SPR y el Z-seizer.

2- Estudiar el efecto producido por la extracción de Cho de las LUVs (permeabilización): se prepararán LUVs de PC/16:0SM/Cho o PC/24:1SM/Cho, cargados con calceína, y se incubarán en presencia de CD. La permeabilización inducida por CD se expresará como % de la máxima permeabilización obtenida en presencia del detergente TX-100 2 mM.

Experimentos en membranas biológicas:

3- Estudiar la extracción de Cho con CD a partir de eritrocitos de caballo y carnero, los cuales difieren tanto en su contenido total de SM como en su composición (16:0 vs 24:1 SM).

4- Estudiar el efecto producido por la extracción de Cho con CD sobre la membrana de los eritrocitos de caballo y carnero. La rigidez de las membranas de eritrocitos control y depletados de Cho se realizará mediante determinación de la polarización generalizada (GP) de la sonda Laurdan mediante microscopía de dos fotones. Estos experimentos se realizarán en colaboración con la Dra. Susana Sánchez, en el Laboratory of Fluorescence Dynamics at University of California at Irvine.

Bibliografía

- 1- Barenholz, Y. and T.E. Thompson. (1980). *Biochim Biophys Acta* 604: 129–58.
- 2- Jaikishan, S. and J.P. Slotte. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 1940–1945.
- 3- Slotte, J.P. (2013). *Prog Lipid Res.* 52: 206-19.
- 4- Slotte, J.P. (1999). *Chem. Phys. Lipids.* 102:13–27.
- 5- Lonnfors, M., J.P. Doux, J.A. Killian, T.K. Nyholm, and J.P. Slotte. (2011). *Biophys J.* 100: 2633-2641.
- 6- Simons, K. and E. Ikonen. (1997). *Nature.* 387: 569–572.
- 7- Quinn, P.J. and C. Wolf. (2009). *Biochim. Biophys. Acta.* 1788: 1877-89.
- 8- Giocondi, M.C., D. Yamamoto, E. Lesniewska, P.E. Milhiet, T. Ando, and C. Le

- Grimellec. (2010). *Biochim Biophys Acta*. 1798: 703-718.
- 9- Maté, S., Busto, J.V., García-Arribas, A.B., Sot, J., Vazquez, R., Herlax, V., Wolf, C., Bakás and Goñi, F.M. *Biophys. J.* (2014, en prensa).
- 10- Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007) *Biochim Biophys Acta*. 1768(6), 1311-1324.
- 11-Besenicar, M. P., Bavdek, A., Kladnik, A., Macek, P., and Anderluh, G. (2008) *Biochim Biophys Acta*. 1778(1), 175-184.

PROYECTO 2: Durante el presente año espero continuar colaborando con el Estudio del mecanismo de acción de la toxina alpha-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 (Trabajo en vías de publicación, ver ítem 3).

HlyA posee en su secuencia cuatro triptófanos localizados en las posiciones 431, 479, 578 y 913. Estudios previos indican que la oxidación de los triptófanos expuestos al solvente con N-bromosuccinimida (NBS) lleva a una pérdida de la actividad lítica de HlyA, indicando que alguno o algunos de estos residuos son imprescindibles en algún paso del proceso hemolítico (5). Por lo anteriormente expuesto el objetivo de este trabajo es estudiar el rol de los triptófanos en la estructura y función de HlyA. Para ello se utilizarán mutantes puntuales donde uno de los cuatro triptófanos (W) fue reemplazado por cisteína (C): W431C, W479C; W578C y W913C. Se estudiará la actividad hemolítica de los mutantes, su unión a membranas, su inserción en membranas de diferente composición lipídica, la oligomerización y la potencial unión específica a colesterol. En el marco de este proyecto, durante el presente año me dedicaré, específicamente, al estudio de la interacción de dichos mutantes de HlyA con membranas, mediante las técnicas de monocapas y microscopía de fuerza atómica.

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 los mutantes se evaluará a partir de los cambios en la presión lateral de la monocapa como consecuencia de la inserción del

correspondiente mutante, agregado en la subfase acuosa. El Microscopio de fuerza atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico capaz de registrar continuamente la topografía de una muestra; ha sido esencial para la caracterización y visualización de muestras biológicas en condiciones fisiológicas, a dimensiones nanométricas. Durante el presente año se prevee la puesta a punto de la metodología para la caracterización mediante AFM en líquidos, del oligomero formado por HlyA y por el/los mutantes que se considere necesario, en función de los resultados previos que se obtengan.

Cabe mencionar que la realización de estos experimentos estaba planeada para el año pasado (2013) pero no pudo llevarse a cabo por falta de tiempo.

#### 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-Verza, G.; Bakás, L. (2000) Biochim Biophys Acta. 15;1464(1):27-34.

Por ultimo, durante el año en curso se prevee continuar con la colaboración establecida 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”. Actualmente estamos trabajando en 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 endocannabinoides.

---

#### **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](mailto: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.