



CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2008-2009

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: BAKAS

NOMBRES: LAURA SUSANA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): lbakas@biol.unlp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

INTERACCION LIPIDO-PROTEINA EN LIPOPROTEINAS Y MEMBRANAS

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 1990

ACTUAL: Categoría: Independiente desde fecha: 2003

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata. CONICET

Facultad: Ciencias Médicas

Departamento:

Cátedra:

Otros: Instituto de Investigaciones Bioquímicas La Plata (INIBIOLP)

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Cargo que ocupa: Investigador Independiente

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

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

.....

.....

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 2006 deberá informar sobre la actividad del periodo 1-1-2004 al 31-12-2005.



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 A : Estudio del mecanismo de acción de la toxina proteica Hemolisina de *Escherichia coli*

(Esta línea forma parte del proyecto Mecanismo de acción de alfa Hemolisina de *Escherichia.coli* a concentraciones líticas y sublíticas ANPCyT-PICT 2007 00647)

La toxina extracelular alfa-Hemolisina (HlyA), miembro representativo de la familia de toxinas designadas RTX, es un importante factor de virulencia producido por varias cepas patógenas de *Escherichia coli*. En particular HlyA se ha relacionado con enfermedades extraintestinales como infecciones del tracto genitourinario, peritonitis, meningitis y septicemia. Como otras proteínas de la familia RTX, un operón compuesto por 4 genes (hlyABCD) es responsable de la síntesis, activación por maduración postraduccional y secreción de la toxina activa. El gen estructural hlyA da lugar a la proteína de 1024 aminoácidos que no es tóxica hasta que es activada intracelularmente por el producto del gen hlyC y extracelularmente por Ca²⁺. HlyA se secreta al medio inmediatamente después de su síntesis por una ruta de transporte específica formada por HlyB, HlyD y TolC.

En cuanto a la activación de la protoxina por HlyC, proceso que consiste en la introducción de 2 ácidos grasos en las lisinas K564 y K690 , este es un hecho único en procariotes. Este proceso de maduración es esencial para la actividad formadora de poros de esta toxina. Recientemente hemos finalizado la caracterización fisicoquímica de los cambios estructurales que la presencia de los ácidos grasos producen en la proteína en su forma soluble .

Por otro lado, está ampliamente aceptado que la acilación de proteínas es una propiedad importante en la asociación de proteínas a raft. Los raft son microdominios que concentran proteínas de membrana tales como las de la vía de señalización intracelular, receptores como el ABC implicado en el proceso de transporte reverso de colesterol y receptores de toxinas, promoviendo procesos de multimerización. En este informe se presentan resultados de experimentos realizados para determinar el rol de los ácidos grasos en el proceso de oligomerización de HlyA y la participación de los microdominios de membrana en los mismos, empleando fantasmas de glóbulos rojos.

En cuanto al mecanismo de secreción de HlyA , este ha sido caracterizado como perteneciente al sistema de secreción Tipo I en el que participan HlyC, HlyD y Tol C formando un canal a través de la membrana interna y externa de la bacteria, nosotros estudiamos la posibilidad de que esta toxina se libere asociada a vesículas de membrana externa. Estas vesículas se liberan constantemente de las bacterias, estando su liberación incrementada bajo condiciones de estrés como es el uso de antibióticos. encontrándose también en suero de pacientes con infecciones a microorganismos Gram negativos.

Nuestros resultados han permitido caracterizar vesículas obtenidas por ultracentrifugación de un sobrenadante de cultivo de bacterias superproductoras de HlyA, tanto por microscopia electrónica como por análisis de la composición lipídica y proteica, confirmando que derivan de la membrana externa de la bacteria. Por otro lado, análisis de Western blot empleando anticuerpos monoclonales antiHlyA han confirmado la presencia de toxina en estas vesículas. Por ultimo, nuestros resultados han permitido demostrar que estas vesículas actúan como un mecanismo de concentración de la toxina. En cuanto al mecanismo de acción lítica sobre glóbulos rojos, determinamos que no existen mecanismos de fusión, al igual que en el caso de la toxina libre. La



toxina se transfiere desde las VMEs a la membrana de la célula blanco, causando así la lisis.

Los resultados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Relevance of fatty acid covalently bound to Escherichia coli alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. Herlax VS, Mate S, Rimoldi O, Bakas L. J Biol Chem. 2009 Sep 11;284(37):25199-210 (publicación 7.2)

2. The lytic mechanism of Escherichia coli α -hemolysin associated to outer membrane vesicles.

Herlax, V., Henning, M.F., Bernasconi, A.M., Goñi, F.M. and Bakás, L. Health 2009 (por invitación)

Aceptado febrero 2010 publicación 7.3)

PROYECTO B: Diseño de variantes de Apolipoproteínas con eficiencia incrementada de neutralización de lipopolisacáridos bacterianos para su aplicación en el shock endotóxico.

Esta línea forma parte del proyecto Lipoproteínas: Bases estructurales de su funcionalidad SCyT, UNLP M124. Director H. Garda, Codirectora Laura Bakas (2007-2010)

El lipopolisacárido bacteriano (LPS), también denominado endotoxina, es el constituyente mayoritario de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Esta molécula es liberada de la bacteria a circulación exhibiendo una amplia variedad de efectos tóxicos y pro-inflamatorios los cuales están asociados al lípido A y a su vez están relacionados a la patogénesis de la sepsis. Muchos de los fenómenos fisiológicos producidos por el LPS resultan de la capacidad de esta molécula de activar las células del sistema inmune del huésped, entre ellas monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Este proceso produce una inflamación local, proceso beneficioso para el huésped. Sin embargo, si la cantidad de LPS liberado excede cierta concentración crítica umbral, la exacerbada liberación de citoquinas inflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa) e interleuquinas (IL) resulta en sepsis severa, lo que hace necesario encontrar nuevas opciones terapéuticas capaces de neutralizar la endotoxina circulante.

En estudios realizados in vitro se ha encontrado que las lipoproteínas unen y neutralizan los efectos tóxicos del LPS. Sin embargo, en la respuesta de fase aguda, definida como el conjunto de cambios fisiológicos y metabólicos que ocurren en respuesta a la infección o injuria de tejidos, un componente clave es la síntesis hepática alterada de proteínas involucradas en la coagulación, sistema de complemento y metabolismo de lípidos. Esto origina que en pacientes sépticos las concentraciones de lipoproteínas y en particular de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) estén disminuidas, estando los cambios observados en relación directa con la gravedad de la infección, perpetuando de esta manera la respuesta inflamatoria.

Es este el motivo por el cual se han diseñado algunas estrategias enfocadas a la neutralización del LPS. En este proyecto presentamos resultados obtenidos empleando apolipoproteína AI, componente proteico mayoritario de las HDL.

Los resultados obtenidos nos permitieron dilucidar que si bien la parte proteica de las HDL es la responsable de la unión de LPS, habiendo incluso podido identificar la porción de la proteína involucrada en la unión, la parte lipídica de estas lipoproteínas favorece la partición del LPS facilitando la interacción con dominios de la proteína involucrados en la unión a lípidos. Los resultados anteriores nos permitirán una etapa posterior sintetizar péptidos que contengan esta secuencia, los que serán ensayados in vitro y en modelo animal con la finalidad de evaluar su efecto endotóxico.

Los resultados se presentan en las siguientes publicaciones:

- Contributions of the C-terminal helical segments of apoAI to interaction with Bacterial Lipopolysaccharide. María Florencia Henning, Vanesa Herlax Laura Bakás (publicación 7-4)

- Insertion of Lipopolysaccharides into Lipid Membranes : Implication of High Density Lipoprotein in the neutralization of the endotoxic effect by HDL. María Florencia Henning, Laura Bakás. (publicación 7-8)



PROYECTO C: Caracterización de Microdominios lipídicos en Membranas (LIPID RAFT)

Esta línea forma parte del proyecto Mecanismo de acción de alfa Hemolisina de *Escherichia coli* a concentraciones líticas y sublíticas ANPCyT-PICT 2007 00647 .

Los estudios acerca de los aspectos funcionales del tráfico de lípidos y la transducción de señales sugieren que los lípidos y las proteínas de membrana no difunden libremente en el plano de la monocapa alcanzando una distribución homogénea, como lo sugiere el modelo de Singer y Nicholson. Ciertas clases de proteínas son secuestradas dentro de pequeños compartimentos o microdominios llamados lipid-raft, favoreciendo de esta manera interacciones proteína-proteína y activando la vía de transducción de señales. Debido al alto contenido de colesterol en los lípidos raft, y al hecho que altas concentraciones de colesterol originan la formación de las denominadas fases líquidas ordenadas (Lo) en bicapas lipídicas, se considera que estos microdominios estarían también en fase Lo. Como resultado de esto, las fases ricas en esfingolípidos y colesterol promueven la formación de fases líquidas ordenadas, las cuales son insolubles frente a ciertos detergentes no iónicos.

Estudios realizados de Espectrometría de Masas han permitido caracterizar las especies moleculares de lípidos presentes en eritrocitos de diferentes especies y aquellos presentes en las fracciones resistentes a detergentes. Simultáneamente pudo determinarse que en eritrocitos de carnero, los que tienen una composición lipídica particular (presencia mayoritaria de SM insaturadas,) la ciclodextrina, extrae colesterol efectivamente de los DRMs.

.-LONG AND UNSATURATED SPHINGOMYELIN DETERMINES SELECTIVE CHOLESTEROL EXTRACTION FROM SHEEP ERYTHROCYTES DETERGENT-RESISTANT MEMBRANES.

Sabina M. Maté (a), Antonin Lamazière (b), Vanesa S. Herlax (a), María J. Tacconi de Alaníz (a), Claude Wolf (b) and Laura S. Bakás (a, c). (publicación 7.7)

Estos experimentos se han realizado en Francia, como resultado de la colaboración establecida con el Dr Wolf.

Por otro lado, resultados publicados recientemente por McIntosh postulan que los lipopolisacáridos constituyentes de la pared externa de bacterias Gram negativas otorgan propiedades equivalentes al colesterol presente en células de mamíferos.

Además, se sabe que la endotoxina interacciona con las membranas desencadenando la activación de vías de señalización intracelular relacionadas con la producción de mediadores inflamatorios. Se ha propuesto que los raft participan en este proceso y que receptores involucrados como CD14, se traslocan a estos dominios luego de la unión de LPS. Sin embargo, dado que el LPS interacciona con membranas lipídicas incluso en ausencia de LBP otorgando un comportamiento similar al colesterol, podría ser el mismo LPS el generador de dominios con propiedades similares a los ya descritos para el colesterol.

Esta hipótesis se apoya en resultados encontrados recientemente que muestran que, cuando patógenos intracelulares tales como *Brucella abortus* es capturada por macrófagos, el LPS constituyente de su pared es reciclado hacia la membrana plasmática donde se lo ha encontrado formando macrodominios, como revelan las estructuras densas encontradas por microscopía electrónica, que secuestran componentes de los lipid rafts incluyendo CD14 y MHCII.

Como parte de este proyecto hemos caracterizado por microscopía bifotónica y solubilización de membranas con tritón X100 membranas conteniendo LPS, en un proyecto en colaboración con la Dra Susana Sanchez de la Universidad de Irvine, Estados Unidos.

Los resultados se presentan en la publicación:

Visualization and analysis of LPS distribution in binary phospholipid bilayers. Henning MF, Sanchez Susana and Bakas L. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 22;383(1):22-6 (publicación 7-2)



Importancia de estos trabajos en relación a los intereses de la PBA.

Las investigaciones que vengo desarrollando en los últimos años, están dirigidas a encontrar opciones terapéuticas a un problema que trae aparejado un elevado y creciente número de muertes en la Provincia de Buenos Aires, así como a nivel nacional y mundial, como son las infecciones intrahospitalarias. Además de constituir un importante aporte a aspectos básicos de la biofísica de la interacción lípido-proteína, las dos principales líneas de trabajo están dirigidas: 1) al conocimiento del mecanismo de acción de la hemolisina de *Escherichia coli*, toxina asociada a cepas virulentas de esta bacteria relacionada con infecciones extraintestinales y 2) a la interacción de proteínas, en particular la apolipoproteína AI con lipopolisacáridos bacterianos, con la finalidad de neutralizar los efectos endotóxicos de esta molécula liberada por bacterias gram negativas como consecuencia de la muerte bacteriana y tratamiento con antibióticos, responsable por otro lado de las muertes por shock séptico.

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

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.

En todas las publicaciones que se detallan en este punto he sido la responsable de la formulación de las hipótesis, diseño de los experimentos, análisis de los resultados y escritura y corrección del trabajo.

1. Visualization and analysis of LPS distribution in binary phospholipid bilayers.

Henning MF, Sanchez Susana and Bakas L. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 22;383(1):22-6

Lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin released from the outer membrane of Gram negative bacteria during infections. It has been reported that LPS may play a role in the outer membrane of bacteria similar to that of cholesterol in eukaryotic plasma membranes.

In this article we compare the effect of introducing LPS or cholesterol in liposomes made of dipalmitoylphosphatidylcholine/dioleoylphosphatidylcholine on the solubilization process by Triton X-100. The results show that liposomes containing LPS or Cholesterol are more resistant to solubilization by Triton X-100 than the binary phospholipid mixtures at 4°C.

The LPS distribution was analyzed on GUVs of DPPC:DOPC using FITC-LPS. Solid and liquid-crystalline domains were visualized labeling the GUVs with LAURDAN and GP images were acquired using a two-photon microscope. The images show a selective distribution of LPS in gel domains.

Our results support the hypothesis that LPS could aggregate and concentrate selectively in biological membranes providing a mechanism to bring together several components of the LPS-sensing machinery.

2. Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process.

Herlax VS, Mate S, Rimoldi O, Bakas L. *J Biol Chem*. 2009 Sep 11;284(37):25199-210.



Alpha-hemolysin (HlyA) is an exotoxin secreted by some pathogenic strains of *E. coli* that causes lysis of several mammalian cells, including erythrocytes of different species. HlyA is synthesized as a protoxin, ProHlyA, which is activated by acylation at two internal lysines - K563 and K689. It has been proposed that pore formation is the mechanism of cytolytic activity for this toxin, as shown in experiments with whole cells, planar lipid membranes, and liposomes, but these experiments have yielded conflicting results about the structure of the pore. In this study, HlyA cysteine-replacement mutants of aminoacids have been labeled with Alexa-488 and Alexa-546. FRET measurements employing labeled toxin bound to sheep ghost erythrocytes have demonstrated that HlyA oligomerizes on erythrocytes membranes. As the cytotoxic activity is absolutely dependent upon acylation, we have studied the role of acylation in the oligomerization, demonstrating that fatty acids are essential in this process.

On the other hand, FRET and the hemolytic activity decrease when the erythrocytes ghosts are cholesterol depleted, indicating the role of membrane microdomains in the clustering of HlyA. Simultaneously, HlyA was found in detergent-resistant membranes (DRMs). Moreover, ProHlyA has also been found in DRM, demonstrating that the importance of acyl chains in toxin oligomerization is to promote protein-protein interaction. These results change the concept about the main role assigned to acyl chain in the targeting of proteins to membrane microdomains.

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.*

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.*

3- The lytic mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin associated to outer membrane vesicles.

Herlax, V., Henning, M.F., Bernasconi, A.M., Goñi, F.M. and Bakás, L. Health 2010 (por invitación, en prensa)

Alpha-hemolysin (HlyA) is an extracellular toxin secreted by *Escherichia coli*, targeting to plasma membranes of eukaryotic cells. Recently it was found that this toxin is released to external media associated to bacterial outer membrane vesicles (OMVs), but the hemolytic mechanism in this way has not been studied yet. Our results report that HlyA is the only protein present in OMVs that is responsible for erythrocyte lysis, and show that no fusion event is involved in the lytic mechanism of OMVs-HlyA. Furthermore, the specific hemolytic activity is approximately 10 fold higher than that of purified free-HlyA, showing the same relative lysis efficiency and specificity for erythrocytes from different species. OMVs could be an important auxiliary way of secretion, acting mainly as a concentration mechanism of HlyA near the target cells. Cell lysis would occur after toxin transfer from OMVs to target membranes, as demonstrated by hemolysis kinetic studies, lipid mixing and western blot assays.



4.- Contribution of the C-terminal end of apolipoprotein AI to eutralization of lipopolysaccharide endotoxic effect. Henning, MF, Herlax, V and Bakas,L . *Innate Immunity* (2010) en prensa

It is well known that high density lipoprotein (HDL) binds bacterial lipopolysaccharide (LPS) and neutralizes its toxicity. The aim of our study was to investigate the effect of LPS interaction on the structure of apolipoprotein AI (apo AI), the major protein of HDL, and determine the protein domain involves in LPS binding.

The present data indicate that LPS does not lead to major changes in the structure of apo AI, judging from Trp fluorescence spectra. However, analysis of denaturation behavior and binding of ANS shows that LPS induce a loosen protein conformation. The sensitivity of apo AI to proteases digestion shows that the digestion of protein in presence of LPS leads rapidly to multiple mid-sized fragments; and upon further digestion, the intermediates convert to smaller sized fragments consistent with nearly complete digestion.

Further evidence for an apo AI-LPS specific interaction was obtained by incubation of the protein with ¹²⁵I-ASD-LPS. The results show that the protein, according its amphiphatic nature, have a multiple region able to react with LPS.

Finally, the contribution of the purified C-terminal fragment of the protein in the endotoxin neutralization of apoAI was evaluated by comparison between the effect of apo AI and Cterminal fragment. Our results on the role of C-terminal end of apo AI in the binding of LPS may provide innovative pharmacological tools in the endotoxin neutralization therapies.

5.- Modulation of LPS-induced inflammation by polyunsaturated fatty acids: therapeutic potential. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. Bakas L. Editor invitado

It is clearly established a link between lipid metabolism and systemic inflammation. The acute phase reactions, associated with injury, inflammation, or sepsis, markedly affect the concentration and composition of plasma lipids and lipoproteins increasing their inflammatory properties. Apolipoprotein A-I mimetic peptides, reconstituted high density lipoproteins (HDLr), lipid emulsions and therapeutic lifestyle changes appear to mitigate these proinflammatory features.

Lipids used in nutritional support of surgical or critically ill patients have been based on soybean oil, which is rich in the ω -6 fatty acid (FA) as linoleic acid (18:2) (LA), which is the precursor of arachidonic acid (20:4 ω -6)(AA).

Typically, human inflammatory cells contain high proportions of ω -6 FA and low proportions of ω -3 FA. The significance of this difference is that AA is the precursor of 2-series prostaglandins and 4-series leukotrienes. These compounds can act as regulators of processes, such as platelet aggregation, blood clotting, smooth muscle contraction, leukocyte chemotaxis, inflammatory cytokine production and immune function. There is a view that an excess of ω -6 FA should be avoided since this could contribute to a state where physiological processes become dysregulate and one alternative is the use of fish oil. The rationale of this latter approach is that fish oil contains long chain ω -3 FA, such as eicosapentaenoic acid (EA). When fish oil is provided, EA is incorporated into cell membrane phospholipids, partly at the expense of AA, thus, there is less AA available for eicosanoid synthesis. Hence, fish oil decreases production of prostaglandins like PGE₂ and of leukotrienes like LTB₄.

This response alone is a potentially beneficial anti-inflammatory effect of ω -3 FA. However, ω -3 FA have a number of other effects which might occur downstream of altered eicosanoid production or might be independent of this activity. For example, animal and human studies have shown that dietary fish oil results in suppressed production of pro-inflammatory cytokines and can decrease adhesion molecule expression. These effects occur at the level of altered gene expression. This action might come about through antagonism of the effects of AA-derived mediators or through more direct actions on the intracellular signalling pathways which lead to activation of transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF κ B).



The objectives of this review are to summarize the beneficial effects of ω -3 FA against the effects of endotoxin and similar inflammatory challenges and describe the mechanism involved in the ω -3 FA modulation of the host response to inflammation .

TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.
Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

6.-Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. Vanesa Herlax(a), Romina Vazquez(a), Sabina Mate(a) y Laura Bakás(a,b).

Similar to apoptosis of nucleated cells, suicidal erythrocyte death or eryptosis is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing and membrane phospholipid scrambling with phosphatidylserine exposure at the cell surface.

A wide variety of drugs, environmental contaminants, endogenous substances, clinical conditions and illness triggers the eryptosis process. Examples presented include drug side effects, sepsis, haemolytic uremic syndrome, Wilson's disease and phosphate depletion between others.

This process is stimulated by the activation of ionic channels and formation of ceramide triggering the activation of a complex signaling pathway.

Injuries triggering eryptosis and the molecules involved in the signaling of eryptosis, may be involved in the regulation of apoptosis, so, in both cases, the same mechanisms may be involved.

For these reasons, the results from the analysis of the eryptosis may be potentially used as a model of the pathogenesis of the nucleated cells.

7.-LONG AND UNSATURATED SPHINGOMYELIN DETERMINES SELECTIVE CHOLESTEROL EXTRACTION FROM SHEEP ERYTHROCYTES DETERGENT-RESISTANT MEMBRANES.

Sabina M. Maté (a), Antonin Lamazière (b), Vanesa S. Herlax (a), María J. Tacconi de Alaníz (a), Claude Wolf (b) and Laura S. Bakás (a, c).

Much of the evidence reported in cell or model systems suggest that cholesterol distribution in the cell membrane is heterogeneous and that it is concentrated in cholesterol and sphingomyelin-rich membrane domains called membrane rafts. Cholesterol depletion by cyclodextrins is a very used tool in rafts research and most of the literature assumed that if a cellular process is affected by cholesterol depletion, membrane rafts are involved. However, there are in the bibliography discrepancies about the question if cyclodextrins selectively remove cholesterol from rafts domains and it has been reported that the presence of sphingomyelin drastically reduced cholesterol extraction. In this study, we have utilized [4-¹⁴C]cholesterol labeled sheep erythrocytes, which are characterized for a very high SM content. We assayed cholesterol extraction by cyclodextrin treatment and the detergent-resistant membrane technique. We detected and quantified cholesterol in different membrane domains. The results show that sheep erythrocytes membrane properties, determined by a very particular sphingomyelin content and chain composition, could explain a selective cholesterol extraction by cyclodextrin from domains of the membrane where this lipid is more concentrated.

8.-. Insertion of LPS into Liposomes Membranes.

Implications in endotoxin neutralization. Henning MF and Bakas L.

During infections, lipopolysaccharides (LPS) are released from the outer membranes of Gram negative bacteria as single molecules and cell wall fragments or sheds as outer membrane vesicles, producing many pathophysiological effects even death by septic shock. As therapeutic approach to endotoxin



lipopolysaccharide (LPS) blockade we assay the ability of liposomes to bind and neutralize LPS.

In this paper, LPS-liposomes association was first demonstrated by shift of zeta potential of dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes (DMPC-MLVs) to negative values after incubation with LPS. By resonance energy transfer between NBD-PE and Rh-PE incorporated into lipid membrane, we demonstrate that LPS intercalates into phospholipid of liposome membranes and this effect is membrane composition dependent. These facts indicate that LPS penetrates into the lipid bilayer, in competition, or maybe in equilibrium, with self-aggregation. Our results confirm that LPS intercalation into neutral phospholipid membrane takes place when LPS is incubated with liposomes, even in the absence of LBP, with a concomitant diminishing in the LPS endotoxic effect on RAW 264.7 cells, as observed in the decrease in released TNF-alpha level. Finally the important role of lysoPC generated by hydrolysis of PC in the endotoxin neutralization therapy is also discussed. In conclusions, our results may provide an innovative use of liposomes as pharmacological tools against the detrimental consequences of diseases or conditions associated with inflammatory dysfunction

COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

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.

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.*

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.*

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.*

OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

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:
DOCENCIA**

DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

BECARIOS

-Directora de la Biotecnóloga Florencia Henning .Beca de Formación de Posgrado, CONICET. ABR 2004-2008

Tema. Estudio de la Interacción de lipoproteínas de alta densidad (HDLr) con lipopolisacáridos bacterianos.

-Directora de la Dra Vanesa Herlax. Beca Posdoctoral del CONICET. Abril 2007-2008.

Tema: "Mecanismo de acción de α -Hemolisina de Escherichia coli en glóbulos rojos a concentraciones sublétricas: aportes a la eritropoiesis"

-Codirectora de la Dra Sabina Mate . Beca Posdoctoral del CONICET. Abril 2007-2008

Tema: Caracterización glicerofosfolipídica de dominios resistentes a detergentes (DRMs) oValidación de los métodos para la obtención de los mismos-

-Directora de la Bioqca Daniela Lufrano, Beca de Formación de posgrado CONICET, Abr 2008-2012.

Tema Compuestos peptídicos derivados de proteasas asparticas de origen vegetal con actividad biológica

-Directora de la Dra Florencia Henning .Beca Posdoctoral , CONICET. ABR 2010-2012
Tema:Caracterización de dominios resistentes a detergentes (DRMs) obtenidos a partir de células en reposo y activadas por LPS bacteriano.

INVESTIGADORES

-Dra Vanesa Herlax. Investigadora Asistente CONICET 2008

-Dra Sabina Mate. Investigadora Asistente CIC 2009

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.*

Doctorado (finalizadas)

- Directora de la Biotecnóloga Florencia Henning .Alumna del Doctorado de la Fac de Cs Exactas.UNLP aprobada 11 de diciembre de2009

Tema. Estudio de la Interacción de lipoproteínas de alta densidad (HDLr) con lipopolisacáridos bacterianos

Doctorado (en curso)

- Codirectora de la Lic. Angela Luz Cuellar. Alumna del Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas - UNLP. 2007

Tema : Adaptabilidad conformacional de apolipoproteína AI en complejos lipoprotéicos discoidales.

- Directora de la Bioqca Daniela Lufrano,Alumna del Doctorado de la Fac de Ciencias Exactas (2008)

Compuestos peptídicos derivados de proteasas asparticas de origen vegetal con actividad biológica



Maestría (finalizadas)

-Directora del Lic Juan Martín Laborde Alumno de la Maestría en Biología Molecular y Biomedicina de la Universidad del País Vasco, España. (Dirección compartida con el Dr Goñi por la Universidad del País Vasco (Las tareas experimentales se realizaron en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas –UNLP). año 2008

Tema : Análisis de los factores que determinan la eficiencia de hemólisis de a-hemolisina (HlyA) de Escherichia coli en glóbulos rojos de diferentes especies.

Maestría (en curso)

- Directora de la Lic Gabriela Finarelli. Alumna de la Maestría en Plantas Medicinales, Fac de Ciencias Exactas, UNLP (2008)

Tema: "Determinación de la actividad apoptótica en extractos de Plantas medicinales autóctonas

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.*

NACIONALES

1-Visualización y análisis de la distribución del lipopolisacárido en mezclas binarias de fosfolípidos . Henning , MF, Sanchez S. y Bakás L. XXXVII Reunion SAB.6 a 8 de diciembre de 2008 La Plata, Buenos Aires

2- Cambios de Gp de Laurdan en eritrocitos tratados con HlyA no se correlacionan con la susceptibilidad a la toxina. Herlax, V., Sanchez S., Mate, S. y Bakas L. XXXVII Reunion SAB.6 a 8 de diciembre de 2008 La Plata, Buenos Aires

3- La acilación de proteínas no es indispensable para el targeting a microdominios de membrana. Mate, S. Herlax, V. y Bakas L. XXXVII Reunion SAB.6 a 8 de diciembre de 2008 La Plata, Buenos Aires

INTERNACIONALES

1- "The interaction of α -Hemolysin with specific microdomains at sublytic concentration" Herlax, V., Mate, S., Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., and Bakas, L. ha presentarse en 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society and 16th IUPAB International Biophysics Congress 2 al 6 de febrero 2008, Long Beach, California, EEUU.

2.- Membrane Properties that determine the susceptibility of erythrocytes to HlyA of Escherichia coli Sabina Mate, Vanesa Herlax and Laura Bakás
30 sep a 3 oct 2009 Buzios, Brasil.

3.- Alpha Hemolysin induces an increase of erythrocytes calcium: A fluorescence lifetime imaging microscopy study. Susana Sanchez, Laura Bakas, Enrico Gratton and Vanesa Herlax 30 sep a 3 oct 2009 Buzios, Brasil

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

-Estadía de trabajo en el Departamento de Física, Universidad del Litoral para realizar medidas de Resonancia Paramagnética de Spin electrónico en sistemas modelo de membranas. financiado con un subsidio otorgado por la UNLP para realizar una estadía de trabajo en la Universidad del Litoral. MAY 2009

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

-Lipoproteínas: Bases estructurales de su funcionalidad SCyT, UNLP M124. Director H. Garda, Codirectora Laura Bakas (2007-2010)



-Subsidio Investigadores CIC (3500\$) 2008

-Mecanismo de acción de alfa Hemolisina de Escherichia.coli a concentraciones líticas y sublíticas en eritrocitos SCyT UNLP M127 (2008-2010)7000\$

-Mecanismo de acción de alfa Hemolisina de Escherichia.coli a concentraciones líticas y sublíticas ANPCyT-PICT 2007 00647(2009-2012) 228210\$

-Subsidio Investigadores CIC (3900\$) 2009

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 mejor Tesis en biofísica a la Dra Vanesa Herlax, Directora L. Bakas, en el período 2006-2009 otorgado por la Sociedad Argentina de Investigaciones Biofísicas SAB.

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.*

-Miembro de Comisiones Evaluadoras en Organismos Científicos

-Evaluador de proyectos la Agencia de Promoción Científica- Tecnológica, 2008.

-Evaluador de proyectos la Agencia de Promoción Científica- Tecnológica, 2009.

-Evaluador externo del CONICET de becas de formación de posgrado, becas posdoctorales , ingreso a la carrera del investigador y promociones. 2008-2009.

-Miembro representante por el claustro de profesores del Departamento de Ciencias Biológicas en concursos para cubrir cargos de Auxiliares Docentes y Profesores (2008-2009)

-Miembro de la Comisión asesora especial para la evaluación de la grilla empleada en los concursos docentes 2007-

-Miembro de la Comisión Instructora para Juicios Academicos de la Facultad de Ciencias Exactas- 2008

-Miembro del Consejo Directivo del INIBIOLP 2008-2009

- Miembro de la Comisión Técnica Asesora (CAT) en Ciencias Naturales, UNLP 2009-

-Tesorera de la Sociedad Argentina de Biofísica (2007-2008)

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

25%

-Profesor Titular DS (caracter ordinario-por concurso).

Cátedra de Biología General. Fac.de Ciencias Exactas-UNLP. 01/06/07-actual.

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.*

Jurado de Tesis Doctoral de la Lic Nadia Charamoni. 06/08 Universidad Nacional de Quilmes

-Jurado del a tesis Doctoral del Lic Axel Hollman 10/09Universidad Nacional de Quilmes.



21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicitar la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Proyecto A) DETERMINACION DEL MECANISMO DE ACCION DE HlyA A CONCENTRACIONES SUBLITICAS; APORTES AL CONOCIMIENTO DEL PROCESO DE ERIPTOSIS.

Es sabido que cuando células sensibles de la serie blanca son tratadas con concentraciones sublíticas de otras toxinas RTX del cual HlyA es el prototipo de la familia, eventos apoptóticos como fragmentación de ADN ocurren dentro de las 6 hs. Si bien los eritrocitos al estar desprovistos de núcleo y mitocondrias eran consideradas células incapaces de experimentar apoptosis, se ha demostrado recientemente que el ionóforo de calcio la ionomicina dispara eventos típicos encontrados en la apoptosis de células nucleadas. De esta forma, la eriptosis podría ser un mecanismo para que los eritrocitos afectados evadan la hemólisis, como se ha encontrado para el síndrome urémico hemolítico. Además la exposición de fosfatidilserina, evento característico de la eriptosis, favorece la adhesión de los eritrocitos a la pared vascular interfiriendo con la microcirculación, evento relacionado con la producción de falla renal. Para caracterizar el proceso de eriptosis se propone:

a) Caracterización del poro a concentraciones sublíticas mediante ensayos de Trnsfwerencia de Energía de Fluorescencia de proteínas derivatizadas con Alexa.

b) Binding de Anexina para determinación de externalización de Fosfatidilserina como indicativo de apoptosis.

c) Estudio de "flip-flop" utilizando sistemas modelo mediante la técnica de FRET, para determinar si la externalización de PS se produce por las características proteod

d) Caracterización de canales por Patch clamp: Se realizarán experimentos en configuración célula entera de eritrocitos control y tratados con HlyA. se medirán las corrientes endógenas o inducidas por HlyA, las cuales serán amplificadas usando AXOPATCH 200 A. Para diferenciar si la corriente medida es por la presencia del poro producido por HlyA o por la inducción de canales endógenos se bloquearán los canales Gardos, canales catiónicos no selectivos, canales aniónicos y la ciclooxigenasa presentes en los eritrocitos con Ba²⁺, y clotrimazol, amiloride ,perantina y diclofenac, respectivamente).

Estos experimentos se realizarán en colaboración con el Dr. Alejandro Aiello, de la Cátedra de Fisiología de la Fac. Ciencias Médicas-UNLP.

Proyecto B) CARACTERIZACION DE MICRODOMINIOS LIPIDICOS EN MEMBRANAS (LIPID RAFT)

Los estudios acerca de los aspectos funcionales del tráfico de lípidos y la transducción de señales sugieren que los lípidos y las proteínas de membrana no difunden libremente en el plano de la monocapa alcanzando una distribución homogénea, como lo sugiere el modelo de Singer y Nicholson. Ciertas clases de proteínas son secuestradas dentro de pequeños compartimentos o microdominios llamados lipid-raft, favoreciendo de esta manera interacciones proteína-proteína y activando la vía de transducción de señales. Estos microdominios están enriquecidos en esfingolípidos y colesterol junto a proteínas específicas. Hipótesis recientes están a favor que la distribución inhomogénea de proteínas se origina por una mezcla espontánea de lípidos para formar dominios con diferentes propiedades y por lo tanto, brindando diferentes microentornos a ciertas proteínas de membrana. Debido al alto contenido de colesterol en los lípidos raft, y al hecho que altas concentraciones de colesterol originan la formación de las denominadas fases líquidas ordenadas (Lo) en bicapas lipídicas, se considera que estos microdominios estarían también en fase Lo. Como resultado de esto, las fases ricas en esfingolípidos y colesterol promueven la formación de fases líquidas ordenadas, las cuales son insolubles frente a ciertos detergentes no iónicos.



Por este motivo, se ha asociado a los raft con membranas resistentes a detergentes (DRMs) aunque se encuentra en discusión si las proteínas asociadas a los DRMs corresponden a las que se encuentran en los raft debido a que se han determinado variaciones en el contenido proteico según el detergente empleado. La composición lipídica también varía en función del detergente utilizado. Resultados obtenidos en sistemas modelo de membranas ponen en evidencia que TX-100 promueve por sí mismo la formación de dominios en mezclas lipídicas por lo tanto aunque este detergente es el mejor caracterizado y más ampliamente usado para la purificación de lipid raft existen importantes problemas asociados a su uso, tal como la solubilización de proteínas las que por otros criterios han sido asociadas a estas fracciones. En cuanto a su comportamiento frente a mezclas lipídicas, los estudios en sistemas modelo demuestran que la cantidad de TX-100 requerida para la solubilización de liposomas de fosfatidilcolina se incrementa de manera importante con la longitud de la cadena acílica y el grado de insaturación. Podría ser, entonces, que las propiedades de solubilización diferencial de los lípidos en cuanto a la naturaleza de los ácidos grasos sea el factor responsable de las modificaciones observadas en la distribución de proteínas de los rafts en función del detergente utilizado. Sin embargo, la información existente acerca de la composición glicerofosfolipídica de los raft es muy escasa.

Como se mencionara previamente, las técnicas que se basan en la utilización de detergentes son numerosas y muy útiles en este sentido pero es necesario ser cuidadosos con la terminología empleada y las conclusiones enunciadas. Es así como, por ejemplo, los conceptos de DRMs y rafts no deberían ser utilizados como sinónimos ya que representan entidades diferentes.

Considerando entonces los antecedentes mencionados resulta interesante contribuir a la determinación de la composición glicerofosfolipídica de los rafts en diferentes contextos biológicos (tipos celulares), con diferente composición proteica y relaciones SM/COL y obtención a partir de las mismas de DRMs, empleando diferentes detergentes.

Este proyecto tiene como finalidad más importante validar las técnicas actualmente empleadas en el estudio de microdominios lipídicos o rafts

- a) Obtención de DRMs a partir de diferentes tipos celulares y mediante uso de diferentes detergentes y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.
- b) Análisis por Western blot de proteínas presentes en DRMs.
- c) Caracterización glicerofosfolipídica de los DRMs
- d) Determinación de la distribución de lípidos y proteínas en la membrana empleando microscopía confocal. (este equipo obtenido por un PME y del cual soy responsable de un nodo, está en las últimas etapas del trámite de compra y será instalado en la Fac de Ciencias Exactas)

PROYECTO C: Compuestos peptídicos derivados de proteasas aspárticas de origen vegetal con actividad biológica

El objetivo general de este proyecto es aislar, purificar y caracterizar proteasas aspárticas y sus precursores a partir de flores de especies pertenecientes a la familia Asteraceae

El proyecto intenta avanzar en el área de conocimiento de las relaciones estructura función de proteasas aspárticas y sus precursores así como del inserto PSI (plant specific insert) presente en el precursor. Se evaluará la interacción de las mismas con membranas a fin de evaluar la similitud propuesta con la familia de las saposinas con la finalidad no solo de dilucidar su función in vivo sino por sus potenciales aplicaciones. El comprender estos mecanismos a nivel molecular es importante para permitir el desarrollo y diseño racional de estrategias terapéuticas.

Para lograr estos propósitos se plantean los siguientes objetivos específicos:



**Comisión de
Investigaciones Científicas**

Gobierno de la Provincia
de Buenos Aires

1. Aislar y purificar aspartil proteasas presentes en flores de la familia Asteraceae que crecen en nuestro país.
2. Caracterizar bioquímica, funcional y estructuralmente la/s proteasa/s aislada/s y los precursores (zimógenos).
3. Obtener PSI mediante técnicas de biología molecular péptidos
4. Caracterizar estructuralmente PI en solución y asociado a membranas.
5. Ensayar actividad citotóxica, antitumoral, antimicrobiana de PSI

Condiciones de la presentación:

La presentación deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21)
- b. Una copia en soporte electrónico, la que será remitida por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gov.ar. Deberá realizarse en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus. Si se trabaja sobre el documento modelo, se deberán eliminar las instrucciones.
- c. En el mismo correo electrónico referido en el punto b), 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.
- d. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en una carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
- e. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.

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.