

Facultad de Ciencias Médicas

FUNCTIONAL STUDY OF CRAC AND CARC PEPTIDES DERIVED FROM E. COLI ALPHA HEMOLYSIN Cane Lucia

Herlax Vanesa (Dir.), Maté Sabina (Codir.)

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.

lucane21@hotmail.com

PALABRAS CLAVE: Hemolysin, Immunotoxin, Peptides.

Escherichia coli alpha hemolysin (HlyA) is a pore-forming protein which belongs to the family of 'Repeat in toxins'(RTX). The CRAC domain refers to the Cholesterol Recognition/interaction Aminoacid Consensus sequence. The CARC domain is similar to the CRAC sequence, but exhibits the opposite orientation along the polypeptide chain. The aims of this work were to study the participation of CRAC and CARC in the stabilization of HlyA monomers in membranes by their interaction with cholesterol, to evaluate the role of Y347 in the interaction with membrane, and finally to find a cytotoxic peptide for the construction of an immunotoxin.

On the basis of experimental data and structural predictions, six peptides derived from HlyA were synthesized: PEP 1: transmembrane domain described as hemolytically active; PEP 2: also a transmembrane domain which sequence corresponds to a cholesterol binding domain (CARC); PEP3: similar to PEP2 but with residue Y347 substituted by A; PEP4:

similar to PEP2 but with a CRAC sequence; PEP5 and PEP6 correspond to CARC sequences located near the acylation sites. Peptides were synthesized by the solid phase peptide synthesis method (Fmoc strategy), purified by HPLC (C-18 column), the molecular mass was determined by mass spectrometry and peptide structure by circular dichroism. The hemolytic activity of peptides was measured using human erythrocytes and inhibition of hemolytic activity assays were performed pre-incubating erythrocytes with peptides and then adding them to wild type toxin.

Results describe PEP2 as hemolytic, which is promising and encourage us to use it in the design of immunotoxins. PEP3 was found not to be hemolytic suggesting residue Y347 is fundamental for the interaction of HlyA with lipidic membranes. PEP4 was found not to be hemolytic, which implicates the CRAC sequence added was unfavorable for peptide activity. PEP 6 competes with HlyA for binding sites in erythrocytes.

EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DEL EFECTO DE COMPUESTOS NATURALES SOBRE UN NOVEDOSO BLANCO TERAPÉUTICO PARA ATROSCLEROSIS

Castro María Agustina

García de Bravo Margarita (Dir.), Crespo Rosana (Codir.)

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.

magustinacg@gmail.com

PALABRAS CLAVE: Aterosclerosis, Aceite de cáscara de mandarina, Metabolismo lipídico.

La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular caracterizada por un engrosamiento de las paredes arteriales debido al depósito de lípidos, principalmente el colesterol (Col), y a una respuesta inflamatoria crónica promovida por macrófagos y células espumosas. Los niveles de Col plasmático se regulan por mecanismos como la síntesis de novo del Col o vía del mevalonato (VM). En las primeras etapas de la VM (reacciones pre-escualeno) se generan isoprenoides no esteroideos como ubiquinona, dolicol y grupos prenilos. La enzima óxido escualeno ciclasa (OSC) es quien cataliza la ciclación del escualeno para formar lanosterol, que es el primer componente cíclico de la VM del cual derivan todos los esteroides. La inhibición de la OSC representa un blanco terapéutico muy

prometedor como agente hipocolesterolémico debido a que interviene en una reacción post-escualeno, lo que implicaría inhibir la síntesis de Col sin afectar la de moléculas no esteroideas. Asimismo, su inhibición parcial produce oxisteroides, que son fuertes ligandos del receptor nuclear LXR involucrado en la regulación de la expresión de enzimas de la vía de síntesis de triglicéridos (GPAT) y de proteínas ABC responsables del transporte reverso del Col. El aceite de cáscara de mandarina (ACM) posee compuestos naturales, mayoritariamente limoneno (Li), con potencial actividad hipocolesterolémica y antiaterogénica. Objetivo: Evaluar el efecto del ACM sobre el metabolismo lipídico en hepatocitos y macrófagos, células que cumplen un rol fundamental en la

regulación de la homeostasis del Col y del proceso inflamatorio en lesiones vasculares, para encontrar nuevos blancos terapéuticos antiaterogénicos de baja toxicidad.

Se utilizaron concentraciones de 0-100 $\mu\text{L/L}$ de ACM y Li en una línea celular proveniente de un hepatoblastoma humano (HepG2) y una línea tumoral de macrófagos murinos (Raw 264.7). Las HepG2 fueron incubadas las últimas 3 hs de tratamiento con 14C-acetato. Los lípidos fueron extraídos, separados e identificados por TLC, cuantificados en contador de radiactividad y analizados en equipo Storm. Las Raw 264.7 se diferenciaron de macrófagos a células espumosas incubando 8 hs con LDLox (50 $\mu\text{g/mL}$). El contenido lipídico teñido con Oil-Red-O se analizó por espectrofotometría. La expresión de la enzima GPAT3 y del receptor CD36 se cuantificó por RT-qPCR.

Se observó que concentraciones menores a 60 $\mu\text{L/L}$ del ACM y Li en las células hepáticas inhiben la síntesis de Col pero incrementan los niveles de incorporación de 14C-acetato en productos de reacciones pre-escualeno. En células espumosas disminuyen los depósitos de lípidos

intracelulares y la expresión de receptores CD36 pero aumentan los niveles de GPAT3. Mayores concentraciones del ACM mostraron una disminución en la incorporación del 14C-acetato en Col, en todos los intermediarios de la VM y en distintos glicerolípidos. Los depósitos lipídicos en las células espumosas disminuyeron significativamente sólo en las células tratadas con el ACM.

Conclusiones: El ACM disminuye la síntesis de Col y los depósitos de lípidos intracelulares sugiriendo una inhibición de la enzima OSC principalmente por el Li. Estos resultados constituyen evidencias muy alentadoras para avanzar con la validación del ACM como inhibidor de la OSC, potencial blanco terapéutico para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis.

ROL DE LAS SECRECIONES VOLÁTILES DE *Tribolium castaneum* EN LA INTERACCIÓN CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*

Davyt Belen

Pedrini Nicolas (Dir.), Girotti Juan R. (Codir.)

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.

bdavyt@gmail.com

PALABRAS CLAVE: Tribolium, Hongos, Silenciamiento.

Se estima que un 30% de la producción agrícola mundial se pierde cada año durante la última etapa de la comercialización por la acción de insectos plaga (Fuente: FAO). La infestación primaria en granos almacenados es producida por insectos que son capaces de penetrar en los granos sanos y enteros, perforando su envoltura. En la infestación secundaria los insectos son de hábitos externos y se alimentan de granos partidos, quebrados o dañados por la infestación primaria, contaminando especialmente harinas y productos derivados. A este grupo pertenece el tenebriónido *Tribolium castaneum* (gorgojo de la harina), cuyo control constituye actualmente uno de los máximos desafíos a nivel internacional ya que no existe una herramienta efectiva para controlar la infestación en depósitos de trigo y sus productos derivados. Debido a las estrictas normas de seguridad impuestas para el uso de insecticidas químicos en los alimentos, su utilización para el control de plagas en granos almacenados no está recomendada, siendo totalmente inviable en la producción agrícola de tipo orgánico. Los hongos entomopatógenos resultan atractivos para el control de insectos plaga por ser seguros y no dejar residuos nocivos para el hombre y el medio ambiente. Los adultos de *Tribolium castaneum* secretan derivados de benzoquinonas (2-metil y 2-etil-1,4-benzoquinona) (BQ) como compuestos de defensa, que actúan como irritantes y repelentes de potenciales predadores. Estas sustancias son liberadas en gran cantidad cuando los insectos infestan depósitos de granos y sus derivados almacenados, modificando las propiedades de los alimentos a los cuales contaminan y confieren un olor desagradable. A su vez, las BQ han sido reportadas como inhibidores de crecimiento fúngico. Se ha descrito que

éstas inhiben el crecimiento y germinación del hongo *Beauveria bassiana*, lo que explica la baja susceptibilidad de estos coleópteros a este y otros hongos entomopatógenos.

Objetivo

Evaluar la susceptibilidad de *Tribolium castaneum* frente a la infección con *Beauveria bassiana* (ARSFF 2860), mediante bioensayos de mortalidad.

Para esto se inoculó el hongo con diferentes concentraciones de conidios (1x10³, 1x10⁵, 1x10⁷, 1x10⁹ conidios/mL) y se evaluó el porcentaje de mortalidad durante 15 días.

Resultados

Los resultados previos demuestran que no hay una diferencia significativa ($p < 0,5$) en el porcentaje de mortalidad entre los tratamientos y el control. Por lo que se podría suponer que efectivamente las BQ disminuyan la susceptibilidad del insecto frente a hongos entomopatógenos.

Con el fin de evaluar el efecto de la producción y liberación de benzoquinonas sobre la capacidad infectiva del hongo entomopatógeno, se analizará el proceso de infección fúngica en ejemplares de *T. castaneum* con genes específicos (esenciales para la producción de benzoquinonas) silenciados. De esta manera, al comparar la infección fúngica entre estos insectos (knockdown) y ejemplares sin silenciar (wild-type), se podrá determinar el efecto específico de las benzoquinonas liberadas por el insecto sobre la transcripción de genes en el hongo. Para generar los fenotipos quinone-less, el knockdown se llevará a cabo sobre tres posibles genes específicos.