

CARACTERIZACIÓN PROTEICA Y FUNCIONAL DE MICROROVESÍCULAS LIBERADAS POR ERITROCITOS TRATADOS CON ALFA HEMOLISINA DE *E. COLI*

Karen Strack¹, Sabina Maté¹ y Vanesa Herlax¹.

1- INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas. vherlax@med.unlp.edu.ar

Introducción

Alfa hemolisina (**HlyA**) pertenece a una familia de toxinas denominadas RTX (Repeat in toxins), y es uno de los factores de virulencia de las cepas uropatogénicas de *E. coli*. HlyA, al igual que muchas de las toxinas de esta familia, debe ser acilada en dos residuos internos de Lys en el interior de la bacteria antes de ser secretada al medio. Esta modificación postraduccional hace que la toxina pase de la forma inactiva (ProHlyA), sin acilar, a una proteína activa acilada (HlyA).

En los últimos años hemos estudiado los efectos que produce esta toxina a los eritrocitos a concentraciones sublétricas. Hemos encontrado que induce un aumento bifásico de calcio [1], que produce la activación de calpaínas que degradan proteínas del citoesqueleto; siendo responsables de los cambios morfológicos que sufren los eritrocitos previos a la lisis. Además, HlyA activa esfingomielinasas endógenas, produciendo un aumento de ceramida en la membrana, hecho que cambia las propiedades físicas de la membrana [2]. Por otro lado, estudios más detallados de los cambios morfológicos observados, demostraron que estos cambios son independientes del ingreso de calcio [3] y que HlyA sufre un proceso de transformación de discocito a esferocito [4]. Todos los eventos anteriormente descritos ocurren en aquellas células que secretan microvesículas al medio como un proceso de remodelación de la membrana [5, 6]. Por otro lado se ha visto que estas microvesículas participan en procesos de intercomunicación celular.

Objetivos

Por lo anteriormente mencionado es que recientemente hemos logrado purificar microvesículas secretadas por eritrocitos tratados con HlyA y es el objetivo del presente trabajo caracterizar la composición proteica de estas microvesículas y determinar si la liberación de microvesículas puede actuar como una forma de diseminación de la toxina.

Materiales y métodos

Se realizaron observaciones en microscopio electrónico de transmisión (MET) de eritrocitos tratados con HlyA y ProHlyA a concentraciones sublétricas y de microvesículas purificadas por ultracentrifugación. Se realizó una caracterización de las proteínas de las microvesículas por SDS-PAGE 10 % e inmunomarcación de las mismas.

Resultados

Tanto el western blot como la inmunomarcación mostraron la presencia de HlyA en las microvesículas de eritrocitos tratados con la toxina. Al realizar medidas de actividad hemolítica de las mismas no se observó lisis, pero sí un aumento de DO a 600 nm que podría indicar que las microvesículas inducen agregación de los eritrocitos.

Conclusiones

Eritrocitos tratados con concentraciones sublétricas de HlyA liberan microvesículas de 200 nm, que contienen a la toxina en sus membranas, sin embargo HlyA no presenta actividad hemolítica en estas estructuras. Por lo tanto, la liberación de microvesículas por parte de eritrocitos tratados con HlyA podría ser un mecanismo de defensa de los mismos para sacar la toxina de sus membranas.

Bibliografía

1. Sanchez, S., L. Bakás, E. Gratton, and V. Herlax, (2011). PLoS One. 6 (6): p. e21127.
2. Velasquez, F.C., S. Mate, L. Bakas, and V. Herlax, (2015). Biochim Biophys Acta. 1848(11 PtA): p. 2779-88.
3. Vazquez, R.F., S.M. Mate, L.S. Bakas, C. Munoz-Garay, and V.S. Herlax, (2016). Biochim Biophys Acta. 1858(8): p. 1944-1953.
4. Hagerstrand, H. and B. Isomaa, (1992). Biochim Biophys Acta. 1109(2): p. 117-26.
5. Freyssinet, J.M., (2001). J Thromb Haemost. 1(7): p. 1655-1662.
6. Boulanger, C.M., N. Amabile, and A. Tedgui, (2006). Hypertension. 48(2): p. 180-186.