

## APLICACIONES TERAPEUTICAS DE TOXINAS LITICAS FORMADORAS DE POROS: POTENCIALIDADES DE $\alpha$ -HEMOLISINA DE *ESCHERICHIA COLI*

VANESA HERLAX<sup>1</sup>, LAURA S. BAKAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas; <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

**Resumen** Muchas bacterias infecciosas secretan proteínas solubles, las cuales pueden dañar la membrana plasmática de células eucarióticas. La actividad de estas proteínas está dirigida contra los leucocitos. Sin embargo, en algunos casos, estas toxinas son también hemolíticas. Se ha propuesto que tanto la actividad hemolítica como leucotóxica puede provenir de la formación de poros en la membrana de las células blanco. El estudio de estas moléculas es importante no sólo desde el punto de vista básico para conocer el mecanismo por el cual actúan, sino por sus potenciales aplicaciones en biotecnología y en medicina, ya que por su incorporación a células, éstas pueden incrementar su susceptibilidad a quimioterápicos o causar la destrucción específica de células cancerosas. Por otro lado, estas toxinas se pueden incorporar en liposomas de forma que actúen como sistemas de liberación controlada de drogas. Si bien este campo no ha sido desarrollado en el caso de la  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli*, la presencia de diferentes dominios estructurales y funcionales podría ser aprovechado con estos fines.

**Palabras clave:** toxinas líticas,  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli*, liposomas, inmunotoxinas

**Abstract** *Therapeutic applications of pore-forming lytic toxins: potential use of Escherichia coli  $\alpha$ -hemolysin.* Many infectious bacteria export soluble proteins which can damage the plasma membrane of eukaryotic cells. Most often they are directed against leukocytes for the purpose of reducing the immune response of the host. In some cases, these toxins are also hemolytic. It has been proposed that both leukotoxic and hemolytic activities could derive from the pore formation in the membranes of the attacked cells. The study of these molecules is not only important from the point of view of basic studies to determine the mechanism of action, but also for potential application in biotechnology and medicine. These molecules increase the cell susceptibility to chemotherapy and also can be employed to destroy specifically cancer cells. On the other hand, it is possible to incorporate toxin molecules in liposomes, transforming them in to biosensors or as controlled drug delivery systems. This aspect has not been extensively explored in *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin, in which the presence of different functional and structural domains in this molecule could be taken advantage of.

**Key words:** lytic toxins, *Escherichia coli*,  $\alpha$ -hemolysin, liposomes, immunotoxins, drug delivery

Los agentes citotóxicos se agrupan en al menos dos amplias clases: aquellos que afectan el metabolismo intracelular de las células susceptibles y tienen que atravesar la membrana plasmática para ejercer su efecto, y los que afectan directamente la membrana plasmática de las células, induciendo generalmente un incremento en la permeabilidad a través de la formación de poros en la membrana. Las toxinas bacterianas como las del cólera<sup>1</sup>, difteria<sup>2</sup>, tétano<sup>3</sup> y la toxina botulínica<sup>4</sup> caen dentro

de la primera categoría, mientras que la  $\alpha$ -toxina producida por *Staphylococcus aureus*<sup>5</sup>,  $\theta$ -toxina de *Clostridium perfringens*<sup>6</sup> y  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli* (HlyA)<sup>7</sup> pertenecen a la segunda .

Las toxinas formadoras de poros representan una de las armas más potentes con las que los microbios invaden al organismo y que les permiten atravesar las defensas celulares. Estas toxinas son moléculas proteicas liberadas por el patógeno, que forman "agujeros" en la membrana celular, permitiendo así que material extraño ingrese a la célula y al mismo tiempo que el contenido celular se pierda. Curiosamente, los organismos se defienden frente a esto de modo similar: el sistema inmune produce sus propias moléculas formadoras de poros para destruir células foráneas.

Recibido: 22-VI-2001

Aceptado: 26-IX-2001

**Dirección postal:** Dra Laura Bakás, INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas. calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina  
Fax (54-221) 4258988 e-mail: lbakas@nahuel.biol.unlp.edu.ar.

La lista de toxinas conocidas es enorme<sup>8</sup>. Actualmente se piensa que la mayoría de los patógenos clínicamente relevantes las producen. Estas toxinas se agruparon bajo la denominación de hemolisinas debido a su acción lítica sobre los glóbulos rojos. Sin embargo su significado biológico deriva de su acción sobre células nucleadas y plaquetas, destruyendo principalmente las células involucradas en la primera línea de defensa inmune. Además provocan un amplio espectro de reacciones secundarias sobre las células blanco, que producen efectos de corto y largo alcance en el organismo, contribuyendo así a la patogénesis de las infecciones bacterianas.

Las propiedades bioquímicas de estas proteínas extracelulares y su modo de acción se estudiaron extensamente en los últimos tiempos. La introducción de técnicas genéticas en este campo, por otro lado, permitió incrementar el conocimiento aportando evidencias sobre el rol de las hemolisinas en la patogénesis de las infecciones.

El mecanismo molecular del daño causado en la membrana de las células blanco por este grupo de toxinas no está aún resuelto. Dado que no existen datos de la estructura tridimensional de muchas de estas proteínas, no es posible predecir si existe una organización estructural común entre ellas. Un mayor conocimiento de la relación estructura-función nos permitiría entender importantes aspectos involucrados en el mecanismo de patogénesis, así como en la profilaxis de enfermedades producidas por las bacterias que producen esas toxinas.

### ¿Para que sirve conocer la relación estructura-función de las toxinas líticas formadoras de poros?

El estudio de estas moléculas es interesante no sólo desde el punto de vista básico para conocer el mecanismo por el cual actúan, sino por sus potenciales aplicaciones en biotecnología y en medicina. Se pueden modificar estas moléculas de modo que destruyan específicamente células cancerosas, o bien que por la incorporación de poros, las células aumenten su susceptibilidad a los quimioterápicos. Por otro lado, se pueden incorporar moléculas de la toxina en membranas artificiales (liposomas) de forma que actúen como biosensores o sistemas de liberación controlada de drogas. A continuación se describen algunas de las aplicaciones que se han desarrollado en este campo empleando diversas toxinas.

### Aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas de la $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus*

La  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* es una pequeña proteína formada por 293 residuos de aminoácidos, lo

que facilita su manipulación por tecnología de ADN recombinante. La proteína existe en forma de un complejo multimérico con forma de hongo formado por 7 subunidades<sup>5</sup>. El grupo de H. Bayley<sup>9</sup> trabajó con tres propiedades, que pueden regularse a través de técnicas de ingeniería de proteínas: el tamaño del poro, la selectividad del canal para el pasaje de diferentes moléculas y la capacidad del poro de abrirse y cerrarse. Insertando "disparadores" moleculares e "interruptores" en la proteína, se puede controlar la apertura o el cierre del canal. En principio éstos pueden ser bioquímicos (activados por enzimas), químicos (activados por la unión de pequeñas moléculas) o físicos ( calor o luz). Estas tres aproximaciones fueron empleadas con la alfa-toxina.

Como "disparador" bioquímico se introdujo en la alfa-toxina un pequeño péptido que bloquea la apertura del poro, de modo que el tratamiento posterior con una proteasa elimina esta pieza extra, permitiendo la apertura del poro<sup>10</sup>. Cuando estas moléculas híbridas alcanzan la célula cancerosa, la formación de poros se activa por proteasas liberadas por las mismas<sup>11</sup>. Se emplearon otros "disparadores" bioquímicos con la finalidad de que la toxina sólo penetre en células determinadas, por ejemplo células cancerosas, mediante la unión por ingeniería genética de un anticuerpo que las reconocía de modo específico, incrementando su permeabilidad y por lo tanto su sensibilidad a las drogas citotóxicas<sup>12</sup>. También se diseñaron "interruptores" químicos que respondían a la presencia de iones metálicos. Al reemplazar 5 residuos aminoacídicos en la proteína por histidinas se creó un sitio de unión para iones  $Zn^{+2}$ , de modo que por su unión bloquearon la formación del poro, el cual sólo se formó al eliminar el catión<sup>9</sup>. Esta propiedad se empleó en el diseño de sensores de metales, puesto que la corriente generada por el pasaje del ión depende de la naturaleza del catión y de su concentración.

Se pueden realizar miles de modificaciones diferentes en estas proteínas formadoras de poros, dando como resultado la generación de muy diversos biosensores.

Otra aplicación interesante se encontró en el área de liberación de drogas. Por ejemplo, la droga se transportó en el interior de liposomas y con la ayuda de alguno de los "disparadores" mencionados, la droga se liberó a través de los poros incorporados en el liposoma. También se encapsularon enzimas o células<sup>13</sup>. Las enzimas encapsuladas se pueden usar para destruir sustancias tóxicas, como la acumulación de fenilalanina en pacientes con desórdenes genéticos como fenilcetonuria. En el caso de células encapsuladas, éstas pueden emplearse para liberar hormonas en pacientes diabéticos insulino-dependientes. De este modo, es posible controlar dónde y cuándo la droga, enzima o célula se libera.

## Otras toxinas

También se han investigado las aplicaciones biotecnológicas de otras toxinas como la toxina diftérica y la exotoxina A de *Pseudomonas*.

La toxina diftérica consta de tres dominios: el dominio catalítico N-terminal, uno transmembrana y un dominio de unión al receptor. La internalización del dominio catalítico a través de las vesículas endocíticas hacia el citosol, donde cataliza la ADP-ribosilación del factor 2 de elongación, produce la inhibición de la síntesis proteica y por consiguiente la muerte celular. Aprovechando los dominios catalíticos de estas toxinas se construyeron proteínas híbridas por fusión con dominios de unión específicos para receptores superficiales de células cuya destrucción sea de interés clínico<sup>5</sup>. Así estas proteínas híbridas se usaron en el tratamiento de enfermedades como linfoma cutáneo T<sup>14</sup> y psoriasis<sup>15</sup>. La particularidad que tienen estas proteínas es que por mutaciones se puede aumentar su afinidad por el receptor, su potencia citotóxica y disminuir efectos colaterales que se producen en el tratamiento de la misma enfermedad con ciertas drogas.

Por otro lado, también se han publicado resultados muy alentadores sobre la aplicación de toxinas encapsuladas en liposomas para el desarrollo de vacunas en inmunidad mediada por células. Lee et al<sup>16</sup> mostraron que la presentación de antígenos en la superficie de macrófagos se encuentra incrementada cuando estos son administrados en liposomas que contienen toxinas líticas, con respecto a la administración del antígeno en liposomas que no contenían toxinas. La ventaja en el primer caso reside en el aumento de la liberación en el citoplasma del antígeno encapsulado, lo cual es difícil de lograr cuando se emplean liposomas que carecen de toxinas como vectores.

## HlyA: prototipo de la familia de toxinas RTX

HlyA pertenece a una familia de toxinas denominadas RTX (*Repeat in toxin*). A esta familia pertenecen también la hemolisina de *E. coli* O 157 enterohemorrágica<sup>17</sup>, la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*<sup>18</sup>, la hemolisina y leucotoxina de *Actinobacillus*<sup>19</sup>, la bifuncional adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella pertussis*<sup>20</sup> y las hemolisinas de *Proteus vulgaris*<sup>21</sup>, *Morganella morganii*<sup>22</sup> y *Moraxella bovis*<sup>23</sup>. Estas proteínas comparten un 30-50% de identidad en su secuencia y comparten una serie de características genéticas y estructurales.

## Efectos biológicos de HlyA

HlyA es considerada un factor primario en la virulencia de *E. coli*. El fenotipo hemolítico está asociado con cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales,

especialmente infecciones del tracto urinario, peritonitis, meningitis y septicemia<sup>24</sup>. Las evidencias sobre la participación de HlyA en la patogénesis de las infecciones extraintestinales de esta bacteria provienen de estudios realizados infectando ratones con cepas de *E. coli* que portaban genes clonados de la toxina<sup>25, 26</sup>. Estos estudios demostraron también que la hemolisina cromosómica o clonada en plásmidos contribuía a la virulencia en diferente extensión. Las diferencias son debidas al nivel de expresión de los genes *hly* y de sutiles diferencias en la composición de aminoácidos<sup>27</sup>.

HlyA presenta un amplio espectro en cuanto a su actividad biocida, atacando eritrocitos, granulocitos, monocitos, células endoteliales y células epiteliales de ratones, rumiantes y primates, a diferencia de las leucotoxinas que presentan especificidad en cuanto al tipo y especie celular<sup>28</sup>. La base física de esta especificidad no está aún resuelta. Varios autores proponen que las actividades hemolítica y leucotóxica derivan de la actividad formadora de poros en la membrana de la célula blanco. Sin embargo, los efectos producidos por esta toxina son complejos y dependen de su concentración: a concentraciones muy bajas o sublíticas, como las que se encuentran lejos del sitio de infección, la toxina sólo ejerce su acción sobre células sensibles, las que presentan receptores de alta afinidad<sup>29</sup>. Estos efectos incluyen a) la inhibición de la movilidad y quimiotaxis de neutrófilos b) la inhibición de mitogénesis en linfocitos, c) la apoptosis de linfocitos T, d) la estimulación de la liberación de mediadores inflamatorios de granulocitos y e) la liberación de citoquinas (interleuquinas y factor de necrosis tumoral) de monocitos y macrófagos<sup>30-32</sup>. Estos efectos pueden o no depender de la formación de poros, dado que la unión de la toxina al receptor puede ser suficiente para inducirla. A mayores concentraciones, como las alcanzadas muy cerca de la bacteria productora, el fuerte efecto permeabilizante producido puede inhibir o suprimir la fagocitosis por parte de los macrófagos o células polimorfonucleadas. Bajo estas condiciones, los glóbulos rojos experimentan una lisis osmótica liberando su hemoglobina, la que es utilizada como fuente de hierro para el crecimiento bacteriano. A tales dosis, la toxina emplea los lípidos de membrana como receptores de baja afinidad, haciendo que el efecto sea, de este modo, independiente del tipo celular. Esta es la razón por la cual es posible emplear membranas modelo (liposomas) compuestas exclusivamente por fosfolípidos para estudiar su mecanismo de acción.

## Síntesis, maduración y secreción de HlyA

La síntesis, maduración y secreción de HlyA está determinada por el operón *hlyCABD*<sup>33-34</sup>. El polipéptido está codificado por el gen *hlyA*, pero su producto representa

una forma inactiva de la toxina denominada prohemolisina (ProHlyA), la que madura en el citosol por un mecanismo de acilación dirigido por la HlyC cosintetizada. HlyC es una aciltransferasa que actúa junto con una proteína transportadora de acilos como donador de ácidos grasos<sup>35-37</sup>. Luego la proteína se secreta a través de ambas membranas por un mecanismo de exportación tipo I empleando el reconocimiento por su porción C-terminal<sup>30-31</sup>. El aparato secretorio está formado por HlyB y HlyD (ambas son proteínas de membrana interna, la primera con actividad ATPasa) y TolC (una proteína de membrana externa). La toxina se secreta formando un complejo con el lipopolisacárido bacteriano (LPS), cuya función es incrementar la estabilidad de la proteína en circulación. (Herlax V, Bakás L, Welch R, resultados no publicados)

### Organización molecular

La actividad hemolítica está asociada a una proteína extracelular de 107 kDa<sup>40</sup>. La proteína consta de una cadena polipeptídica única de 1024 residuos aminoácidos. A partir de diferentes estudios de mutagénesis y predicción de estructuras se han asignado diferentes regiones o dominios sobre la proteína (Figura 1) : a) una región N-terminal de naturaleza anfipática con afinidad por la membrana<sup>41</sup>, b) el dominio de interacción con la membrana: estudios recientes de predicción de estructuras están a favor de la existencia de 9 hélices anfipáticas en esta región<sup>42</sup>. La sustitución de residuos polares por no polares en esta región producen una disminución en la actividad<sup>43</sup> c) dos regiones alrededor de los residuos de lisina 564 y 690 que permiten el reconocimiento por HlyC en el proceso de activación<sup>44</sup>; d) el dominio de unión a Ca<sup>+2</sup> (residuos 723-872) que consiste de 15 repeticiones de un nonapéptido cuya secuencia consenso es GGXGDXUX, donde U es un residuo hidrofóbico voluminoso y X cualquier aminoácido<sup>45</sup> y e) la señal de secreción formada por una secuencia de 60 residuos en el extremo C-terminal<sup>46</sup>.

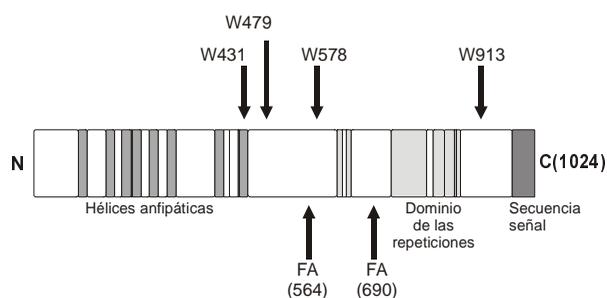


Fig. 1.- Estructura primaria de  $\alpha$ -hemolisina de *Escherichia coli* (HlyA). Las posiciones de los ácidos grasos (FA) y de los 4 residuos triptofano (W) están indicadas en la figura.

### Mecanismo de acción

Algunos autores sugieren que la región comprendida entre los residuos aminoácidos 130 y 450 se inserta en la membrana citoplasmática para formar un poro que permite el influjo de Ca<sup>+2</sup> extracelular y el eflujo de K<sup>+</sup>. El diámetro del "canal" formado por la hemolisina se determinó por varios métodos. Por análisis empleando microscopía electrónica y extracción con detergentes se demostró que la toxina no forma estructuras estables similares a las formadas por la alfa toxina de *S. aureus*<sup>47</sup>. Los experimentos de protección osmótica de eritrocitos demostraron que el tamaño de la lesión formada en la membrana es variable y que depende de la concentración de toxina, la temperatura y el tiempo<sup>41</sup>, por lo que debe existir un mecanismo diferente de daño de la membrana, sin la formación de poros discretos. Existen resultados que demuestran que la exposición de membranas a altas concentraciones de toxina durante períodos prolongados produce lesiones similares a las causadas por efecto de detergentes<sup>49-50</sup>

Un paso crítico en el ataque a las células por toxinas de la familia RTX es su asociación con la célula blanco. Welch<sup>48-51</sup> demostró que la unión de la toxina a los eritrocitos es independiente de varios componentes estructurales de la toxina activa, incluyendo la porción N-terminal, la región de las repeticiones o la acilación. Al mismo tiempo, encontró que la asociación a membranas es también independiente de la temperatura o concentración de Ca<sup>+2</sup>, mientras que el efecto lítico propiamente dicho depende de todos estos factores.

### Activación extracelular: unión de calcio

La unión de la toxina a la membrana no es suficiente para inducir la lisis, sino que es esencial la unión previa de calcio al dominio de las repeticiones para que la toxina pueda ejercer su efecto lítico<sup>52</sup>. Ostolaza y col<sup>53</sup> demostraron que el Ca<sup>+2</sup> y en mayor concentración el Ba<sup>+2</sup> y el Sr<sup>+2</sup>, promueven la actividad de la toxina, pero otros cationes divalentes como el Mg<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> o Zn<sup>+2</sup> son inactivos para esta función. La unión de calcio a la proteína expone nuevos residuos hidrofóbicos en su superficie induciendo un estado de "glóbulo fundido", necesario para la transformación en un estado que permita el proceso de inserción de la toxina en la membrana<sup>54</sup>. Estudios de modificación química de la proteína permitieron identificar la existencia de un residuo de histidina crítico involucrado en la unión de cationes divalentes, y por lo tanto, en la actividad lítica de la toxina<sup>55</sup>.

### Interacción HlyA-membrana

A diferencia de otras toxinas activas de membrana, el daño causado por HlyA es el resultado de la actividad

del polipéptido (independientemente de que algunas células contengan receptores para esta toxina)<sup>56</sup>. Por esta razón, las membranas modelo (liposomas) fueron empleadas en estudios del mecanismo de acción de HlyA. La importancia del estado físico de la bicapa lipídica en el proceso de inserción ha sido descrito en detalle<sup>57</sup>, sin embargo las fuerzas hidrofóbicas no son las únicas involucradas en la interacción de la toxina con la membrana, ya que tanto fuerzas polares como electrostáticas juegan un rol importante en este proceso<sup>58</sup>. Mediante técnicas como fluorescencia intrínseca, calorimetría diferencial y microscopía electrónica se demostró que HlyA se une e inserta en la membrana transformándose en una proteína de tipo integral, pero no transmembrana<sup>43-59</sup>. La proteína carece de largos segmentos hidrofóbicos, sin embargo la presencia de 9 hélices anfipáticas en el dominio de unión a la membrana serían suficientes para inducir la desestabilización de la bicapa, provocando la pérdida del contenido celular a través de un mecanismo similar al de las apolipoproteínas plasmáticas (Verza G., Goñi F. y Bakás L., datos no publicados). Una vez alcanzada la concentración crítica de HlyA, la inserción de una o más moléculas a la monocapa externa de la membrana produciría un incremento en la presión lateral, causando rupturas transitorias y un drástico cambio en la permeabilidad con la consiguiente pérdida del contenido celular.

Resumiendo, los resultados obtenidos hasta el momento permiten describir el mecanismo de acción de HlyA a través de una serie de pasos: 1) la adopción en solución de un estado competente por la unión de calcio, 2) la unión a la membrana, 3) una serie de pasos desconocidos pero que probablemente incluyan oligomerización y 4) la lisis.

El fenómeno que tiene lugar entre la unión de la toxina a la membrana y la lisis no está actualmente dilucidado en el caso de HlyA. Sin embargo, se supone que al igual que en otras toxinas estudiadas, se produce un proceso de oligomerización para que la lisis ocurra.

### Perspectivas en las aplicaciones terapéuticas de HlyA

Las aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas podrían ser la solución para enfermedades que hoy en día tienen tratamientos muy largos o no los tienen. Para esto es fundamental dilucidar la relación estructura-función de esta toxina, la identificación de cada uno de sus dominios y la presencia de residuos críticos en su actividad, para luego, con la ayuda de la ingeniería genética diseñar moléculas con alta potencia lítica, la que debe ser regulable o inducible por determinados efectores, con baja inmunogenicidad y alta especificidad para ciertos tipos celulares. En este sentido, nuestro grupo trabaja

actualmente con HlyA en el desarrollo de formas mutantes no activas por mutagénesis dirigida, en particular, mutantes por reemplazo de cada uno de los residuos triptófano presentes en la secuencia primaria por residuos leucina. Hemos encontrado que los 4 mutantes obtenidos conservan su actividad lítica y sólo uno de ellos pierde su actividad citotóxica. Al mismo tiempo, se está caracterizando el comportamiento de la prohemolisina, forma inactiva de la toxina, a concentraciones sublétricas relacionadas con el desarrollo de la respuesta inmune por parte del huésped. Estos resultados podrán ser de utilidad en el desarrollo de vacunas contra cepas hemolíticas de *Escherichia coli*, dado que esta toxina es uno de los elementos más importantes que contribuyen a la patogenicidad en las infecciones hospitalarias causadas por la bacteria.

Finalmente, nuestro grupo está desarrollando actualmente un método para purificar la proteína, eliminando por completo el lipopolisacárido asociado durante el proceso de secreción. De este modo se podría reducir la respuesta inmune exuberante y perjudicial para el huésped, producida por la endotoxina, lo que es de importancia para las aplicaciones clínicas.

**Agradecimientos:** Este proyecto es subsidiado por el Ministerio de Salud de la Nación-Beca Ramón Carrillo y por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC-PBA)

### Referencias

1. Zitzer A, Palmer U, Weller U et al. Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytotoxin (hemolysin). *Eur J Biochem* 1997; 247: 209-16.
2. Beise J, Hahnen J, Andersen-Beckh B, Dreyer F. Pore formation by tetanus toxin, its chain and fragments in neuronal membranes and evaluation of the underlying motifs in the structure of the toxin molecule. *Arch Pharmacol* 1994; 349: 66-73.
3. London E. Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1113: 25-51.
4. Singh BR. Intimate details of the most poisonous poison. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 617-19.
5. Song L, Hobaugh M, Shustak C, Cheley S, Bayley H and Gouaux J. Structure of *Staphylococcus aureus* haemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274:1859-66.
6. Shepard L, Heuck A, Brian D et al. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* Perfringolysin O: an helical to beta sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 1998; 37:14563-74.
7. Bhadki S, Bayley H, Valeva A. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin prototypes of pore-forming bacterial cytotoxins. *Arch Microbiol* 1996; 165:73-79.
8. Saier M. Families of proteins forming transmembrane channels. *J Membr Biol* 2000; 175:165-80.
9. Bayley H. Triggers and switches in a self-assembling pore-forming protein. *J Cell Biochem* 1994;56: 177-84.

10. Walker B, and Bayley H. A pore forming protein with a protease-activated trigger. *Protein Eng* 1994; 7: 91-7.
11. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson W. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-33.
12. Russo M, Bayley H, and Toner M. Reversible permeabilization of plasma membrane with an engineered switchable pore. *Nature Biotechnology* 1997; 15: 278-82.
13. Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1990; 249: 1527-33.
14. Murphy JR, Van Der Spek, JC. Targeting of diphtheria toxin to growth factor receptors. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 259-67.
15. Gottlieb SL, Gilleaudean P, Johnson R, Estis L, Woodworth T, Gottlieb AB, Krueger JG. Response of psoriasis to a lymphocyte selective toxin (DAB389 IL-2) suggest a primary immune but not keratinocytes pathogenic basis. *Nat Med* 1995; 1: 442-7.
16. Lee KD, Oh YK, Portnoy DA and Swason J. Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Lysteria monocytogenes*. *J Biol Chem* 1996; 271: 7249-52.
17. Schmidt H, Kernbach C and Karch H. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: h7. *Microbiology* 1996; 142, 907-14.
18. Strathdee C and Lo RY. Extensive homology between the leucotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 and the alpha-haemolysin of *Escherichia coli*. *Infect Immunol* 1987; 55: 3233-36.
19. Burrows LL and Lo RY. Molecular characterization of an RTX toxin determinant from *Actinobacillus suis*. *Infect Immunol* 1992; 60: 2166-73.
20. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullman A and Danchin A. Secretion of cytolysin, the calmoduline sensitive adenylate cyclase-hemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertusis*. *EMBO J* 1988; 7: 3997-4004.
21. Welch RA. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect Immunol* 1987; 55: 2183-90.
22. Eberspacher B, Hugo F, Pohl M and Bhakdi SJ. Functional similarity between the haemolysins of *Escherichia coli* and *Morganella morganii*. *Med Microbiol* 1990; 33: 165-70.
23. Gray JTP, Fedorkacray P and Rogers D. Partial characterisation of a *Moraxella bovis* cytolysin. *Vet Microbiol* 1995; 43: 183-96.
24. May A, Gleason T, Sawyer R and Pruettt T. Contribution of *Escherichia coli* alpha-haemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis *Infect Immunol* 2000; 68: 176-83.
25. Welch RA, Dellinger EP, Minshew B and Falkow S. Hemolysin contributes to virulence of extraintestinal *Escherichia coli* infections. *Nature* 1981; 294:665-67.
26. Welch RA and Falkow S. Characterisation of *Escherichia coli* hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infect Immunol* 1984; 43: 156-60.
27. Hacker J, Hughes C, Hof, H and Goebel W. Cloned hemolysin genes from *E.coli* that cause urinary tract infections determine different levels of toxicity in mice. *Infect Immunol* 1983; 42: 57-63.
28. Lally E, Hill B, Kieba I and Korostoff J. The interaction between RTX toxins and targets cells. *Trends in Microbiol* 1999; 7: 356-60.
29. Lally R, and Kieba Satto A, et al. RTX toxin recognize a beta 2 integrin receptor on the surface of human target cells *J Biol Chem* 1997; 272: 31289-95.
30. May A, Sawyer R, Gleason T, Whitworth A and Pruettt T. In vivo cytokine response to *Escherichia coli* alpha-haemolysin determined with genetically engineered hemolytic and non-hemolytic *E.coli* variants. *Infec Immun* 1996; 64:2167-71.
31. Walevl, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S and Rose-John S. Pore-forming toxins triggers sheddings of receptors for interleukin 6 and lipopolisaccharide. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 7882-7.
32. Koning B, Ludwig A, Goebel W and Koning W. Pore formation by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin: role for mediator release from human inflammatory cells. *Infect Immun* 1994; 62:4611-7.
33. Koronakis, V. and Hughes, C. Synthesis, maturation and export of the *Escherichia coli* haemolysins. *Mol. Microbiol Immunol* 1996; 185: 65-71.
34. Nieto JM, Bailey MJ, Hughes C and Koronakis V. Suppression of transcription polarity in *Escherichia coli* hemolysin operon by a short upstream shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol Microbiol* 1996;19: 705-13.
35. Standley P, Koronakis K, Hardie P and Hughes C. Independent interaction of acyltransferase HlyC with two maturation domains of the *Escherichia coli* toxin HlyA. *Mol Microbiol* 1996; 20, 813-22.
36. Standley P, Koronakis K and Hughes C. Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: A unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol and Mol Biol Rev* 1998; 62: 309-33.
37. Lim K, Bazemore Walker C, Guo L et al. *Escherichia coli* alpha hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated *in vivo* with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *J Biol Chem* 2000; 275: 36698-702.
38. Stanley P, Koronakis V and Hughes C. Mutational analyses supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* hemolysin. *Mol Microbiol* 1991; 5: 2391-403.
39. Lee T, Pellet S, Lee E and Welch RA. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of signal peptide. *J Bacteriol* 1985; 163: 88-93.
40. Gonzalez-Carrero M, Zabala J, de la Cruz F and Ortiz J. Purification of alpha-haemolysin from an overproducing *E. coli* strain. *Mol Gen Genet*. 1985; 199: 106-10.
41. Erb K, Vogel M, Wagner W and Goebel W. Alkaline phosphatase which lacks its own signal sequence becomes enzymatically active when fused to N-terminal sequences of *Escherichia coli* alpha-hemolysin (HlyA). *Mol Gen Genet* 1987; 208: 88-93.
42. Soloaga A, Veiga P, García Segura L, Ostolaza H, Brasseur R and Goñi F. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment F. *Molecular Microbiology* 1999; 31: 1013-24.
43. Ludwig A, Schmid A, Benz R, and Goebel W. Mutations affecting pore formation by hemolysin by hemolysin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1991; 266: 198-208.
44. Standley P, Koronakis V, Hardie K and Hughes C. Mutational analysis supports a role for a multiple structural features in the C-terminal signal of *Escherichia coli* hemolysin. *Mol Microbiol* 1996; 20: 813-22.
45. Bohem D, Welch RA and Snyder I Domains of *Escherichia coli* (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infec Immun* 1990; 58: 1959-64.
46. Chevaux, C and Holland I. Random and directed mutagenesis to elucidate the functional importance of helix II and F-989 in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *J of Bacteriology* 1996; 178: 1232-36.
47. Bahdki S and Trantum Jensen J. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev*

- Physiol Biochem Pharmacol* 1987; 107: 147-223.
48. Bauer M and Welch R Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin *Infect. Infect Immunol* 1996; 64: 4665-72.
  49. Moayeri M and Welch RA. Effects of temperature, time and toxin concentration on lesions formation by the *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immunol* 1994; 62: 4124-34.
  50. Ostolaza H, Bartolome B, Ortiz de Zarate I, de la Cruz F and Goñi F. Release of the lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochim Biophys Acta* 1991; 141: 81-8.
  51. Bauer M and Welch R. Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infect Immun* 1996; 64:4665-72.
  52. Ostolaza H and Goñi F. Interaction of the bacterial protein toxin haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. *FEBS letters* 1995; 371: 303-6.
  53. Ostolaza H, Soloaga A and Goñi F. The binding of divalent cations to *Escherichia coli* haemolysin. *Eur J Biochem* 1995; 228: 39-44.
  54. Bakas L, Veiga M, Soloaga A, Ostolaza H and Goñi F. Calcium-dependent conformation of *E. coli* hemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368: 225-34.
  55. Bakás, L. Occurrence of an essential amino acid residues in the lytic effect of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Prot and Pep Lett* 2000; 7: 91-8.
  56. Cortajarena A, Goñi F and Ostolaza H. Glycophorin as a receptor for *E.coli* alpha -haemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* 2001 in press.
  57. Bakás L, Ostolaza H, Vaz WLC and Goñi FM. Reversible adsorption and non-reversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophysical J* 1996; 71: 1869-76.
  58. Ostolaza H, Bakas L and Goñi F. Balance of Electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha Haemolysin. *J Membr Biol* 1997; 157: 137-45.
  59. Verza G and Bakas L. Location of tryptophan residues in free and membrane bound *Escherichia coli*-hemolysin and their role on the lytic membrane properties *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1464: 27-34.

-----

*The definition of tobacco smoking as a major health hazard in the western world ranks with the discovery of the last century of the dangers of contaminated water supplies. It is also a demonstration of the wide hiatus between knowledge and wisdom, specially when profits tilt the balance, and of the small place science occupies in our political-economical ecology.*

La conclusión que el fumar es uno de los mayores peligros para la salud en el mundo occidental es comparable al descubrimiento, en el siglo pasado, del peligro de contaminación del agua. Es también una demostración del amplio hiato que existe entre el conocimiento y la sabiduría, -especialmente cuando el beneficio económico altera el equilibrio-, y del pequeño papel que desempeña la ciencia en nuestra ecología político-económica.

Michael B. Shimkin (1912-1989)

*Cancer Research* 1974; 34: 1525