POST. MIKROBIOL.,
2007, 46, 4, 343–353
http://www.pm.microbiology.pl

HEMOLIZYNY *ESCHERICHIA COLI*

Beata Magdalena Sobieszczańska

Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Mikrobiologii
ul. Chałubińskiego 4; 50-368 Wrocław, e-mail: mapasobie@provider.pl, tel. 071/784 12 78

Wpłynęło w lipcu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Hemolizyny *E. coli* aktywnie wydzielane do środowiska – pozakomórkowe. 2.1. Hemolizyna HlyA. 2.2. Hemolizyna ClyA. 3. Hemolizyny *E. coli* związane z komórką bakteryjną. 3.1. Hemolizyna β. 3.2. Enterohemolizyna (Ehx) enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC). 3.3. Enterohemolizyny Ehly1 i Ehly2. 3.4. Hemolizyny kontaktowe *E. coli*. 3.5. Hemolizyna τ. 3.6. Aktywność hemolityczna enteropatogennych *E. coli* (EPEC). 4. Podsumowanie

***Escherichia coli* hemolysins**

Abstract: The best known hemolysin α of *Escherichia coli* (HlyA) is the prototype for a family of cytotoxins that are produced by a wide variety of gram-negative pathogens. Hemolysin-producing *E. coli* strains are isolated from patients with extraintestinal infections such as urinary tract infections or septicemia. The role of HlyA as a virulence factor of diarrheagenic *E. coli* was less obvious until the cell-detaching *E. coli* (CDEC) group, which is HlyA-producing and is responsible for diarrhea among infants, has been described. Apart from of extracellular hemolysins, *E. coli* may produce many cell-associated hemolysins e.g. enterohemolysins, hemolysin β, hemolysin of enterohemorrhagic *E. coli* strains. The ability of *E. coli* bacilli to produce cell-bound hemolysins may indicate an important role of contact of bacteria with host cells during infection. However, the exact role of these cell-bound hemolysins in pathogenicity of *E. coli* remains to be determined.

1. Introduction. 2. *E. coli* hemolysins actively secreted into the environment – Extracellular. 2.1. HlyA hemolysin. 2.2. ClyA hemolysin. 3. Hemolysins of *E. coli* associated with bacterial cell. 3.1. Hemolysin β. 3.2. Enterohemolysin (Ehx) of enterohemorrhagic *E. coli* strains (EHEC). 3.3. Enterohemolysins Ehly1 and Ehly2. 3.4. Contact hemolysins of *E. coli*. 3.5. Hemolysin τ. 3.6. Hemolytic activity of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). 4. Summary

Słowa kluczowe: enterohemolizyny, *Escherichia coli*, hemolizyny
Key words: enterohemolysins, *Escherichia coli,* hemolysins

1. Wstęp

Gatunek *Escherichia coli* zajmuje szczególne miejsce wśród fermentujących pałeczek jelitowych należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, gdyż obejmuje zarówno szczepy komensalne, wchodzące w skład flory fizjologicznej jelita zdrowego człowieka, jak i szczepy chorobotwórcze odpowiedzialne za zróżnicowane zakażenia układowe: przewodu pokarmowego, dróg moczowych, żółciowych, oddechowych oraz infekcje uogólnione: bakteriemie, posocznice, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych.

Niektóre szczepy *E. coli* w procesie ewolucji nabyły geny kodujące różnorodne czynniki wirulencji, dzięki którym zyskały potencjał chorobotwórczy. Geny te mogą być zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych (w obrębie chromosomalnych wysp patogenności, na plazmidach, transpozonach lub bakteriofagach) co zapewnia możliwość ich transferu na niechorobotwórcze szczepy *E. coli* lub pałeczki należące do innych gatunków.

Obecnie wyróżnia się 6 grup chorobotwórczych szczepów *E. coli*, zwanych patotypami, są one odpowiedzialne za zakażenia w obrębie przewodu pokarmowego, dysponują zróżnicowanym arsenałem czynników wirulencji, co wiąże się z różnymi patomechanizmami wywoływanych przez nie zakażeń. Patotypy *E. coli* związane z zakażeniami przewodu pokarmowego to: enteropatogenne *E. coli* (EPEC), enterotoksynogenne *E. coli* (ETEC), enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC), enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC), enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC) oraz odrywające komórki *E. coli* (CDEC). Ponadto, jako odrębne patotypy traktowane są szczepy *E. coli* odpowiedzialne za zakażenia pozajelitowe, tj. szczepy związane z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych noworodków oraz szczepy izolowane z zakażeń dróg moczowych, tzw. uropatogenne szczepy *E. coli* [51].

Jednym z ważnych czynników wirulencji chorobotwórczych szczepów *E. coli* są hemolizyny. U *E. coli* opisano szereg hemolizyn, które generalnie podzielić można na hemolizyny aktywnie wydzielane przez komórki bakteryjne do środowiska zewnętrznego (hemolizyna α, cytotoksyna ClyA) oraz hemolizyny związane z komórką bakteryjną (enterohemolizyny, hemolizyna β, hemolizyny kontaktowe, hemolizyna τ, hemolizyna szczepów enterokrwotocznych).

2. Hemolizyny *E. coli* aktywnie wydzielane do środowiska – pozakomórkowe

2.1. Hemolizyna HlyA

Najlepiej poznaną bakteryjną hemolizyną jest hemolizyna α (HlyA) *E. coli* reprezentująca rodzinę cytotoksyn RTX syntetyzowanych przez chorobotwórcze bakterie Gram-ujemne. Wszystkie toksyny RTX wykazują 30–70% homologii sekwencji aminokwasów w porównaniu z HlyA, podlegają potranslacyjnej modyfikacji (unikalnej dla każdej toksyny RTX) oraz podobnie do HlyA posiadają COO-terminalną domenę wiążącą wapń, bogatą w glicynowe powtarzające się sekwencje nonapeptydowe, od których wywodzi się nazwa tej rodziny toksyn (**R**epeats in **T**o**X**ins). Ponadto, wszystkie toksyny RTX wydzielane są z komórki bakteryjnej do środowiska zewnętrznego za pośrednictwem specyficznego systemu sekrecji [65].

Tabela I

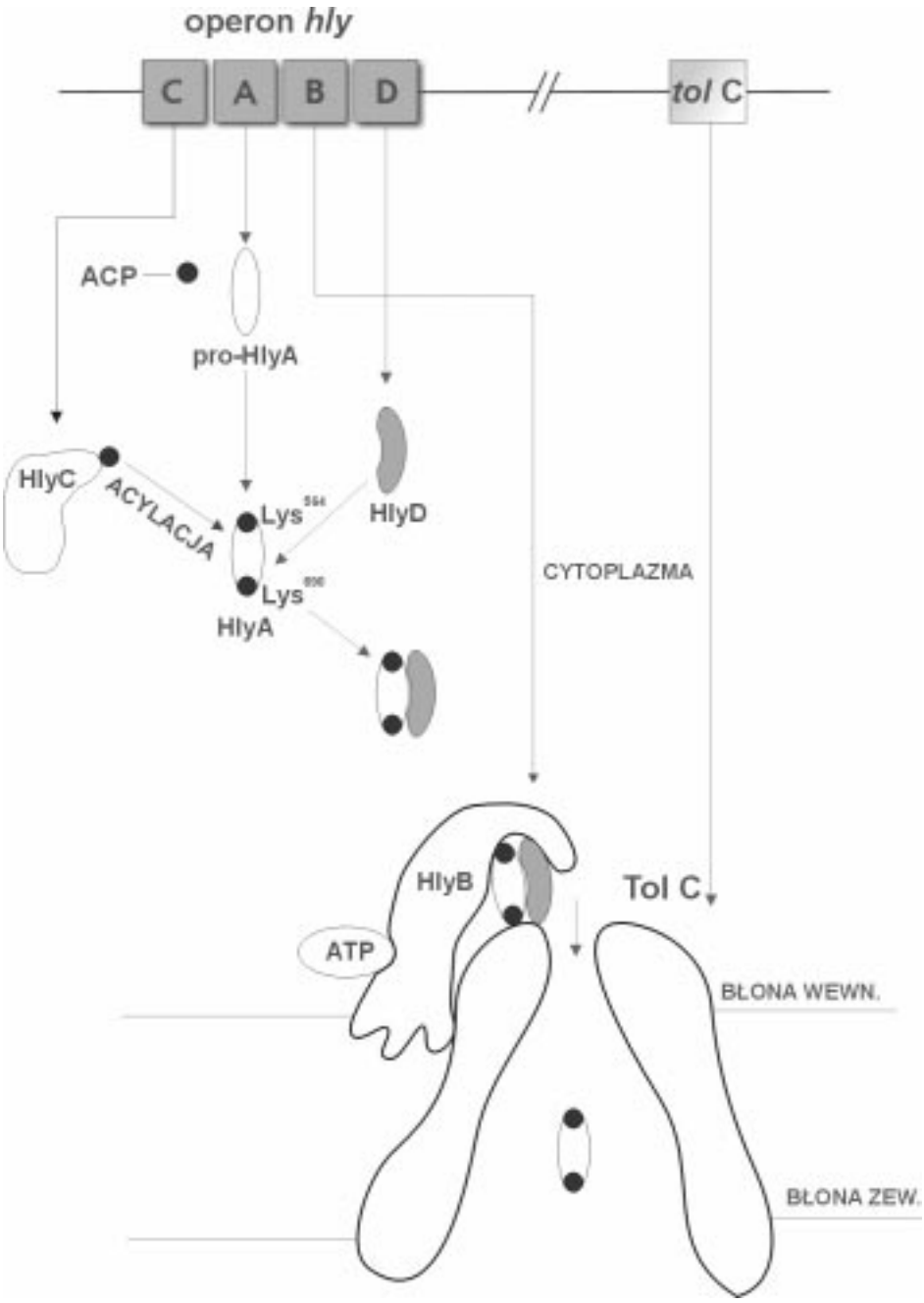
Toksyny należące do rodziny RTX toksyn [65]

Gatunek bakterii	akronim toksyny
1. *E. coli*	HlyA EhxA EaggA
2. *Proteus vulgaris*	PvxA
3. *Morganella morgani*	MmxA
4. *Actinobacillus pleuropneumoniae*	ApxIA ApxIIA ApxIIIA
5. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*	AaltA
6. *Actinobacillus suis*	AshA
7. *Pasteurella haemolytica*	LktA
8. *Pasteurella haemolytica*-like	PllktA
9. *Bordetella pertussis*	CyaA
10. *Moraxella bovis*	MbxA

Genetyczna organizacja syntezy HlyA. Za syntezę, aktywację i sekrecję hemolizyny HlyA odpowiada zespół 4 strukturalnych genów (*hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) zorganizowanych w operon *hly*, który może być zlokalizowany na chromosomie lub na plazmidzie koniugacyjnym [46]. Gen *hlyA* koduje białko strukturalne o masie cząsteczkowej 107–110 kDa, będące nieaktywnym prekursorem HlyA tzw. pro-HlyA. Potranslacyjna aktywacja pro-HlyA polegająca na acylacji dwóch wewnętrznych reszt lizynowych Lys^{564} i Lys^{690} w łańcuchu polipeptydowym hemolizyny ma miejsce w cytoplazmie i wymaga obecności białka HlyC, kodowanego przez gen *hlyC*. Białko HlyC jest homodimeryczną acylotransferazą o masie cząsteczkowej 20 kDa, która przenosi kwasy tłuszczowe: mirystynowy lub palmitynowy z donorowego białka ACP (**A**cyl-**C**arier **P**rotein) na cząsteczkę HlyA. Do aktywacji HlyA jest konieczna acylacja obu reszt lizynowych. Gen *hlyB* koduje ATPazę HlyB, posiadającą trzy pary helikalnych regionów przezbłonowych łączących cząsteczkę HlyB z błoną wewnętrzną oraz NH_2- i COO-terminalne pętle cytoplazmatyczne umożliwiające wiązanie z HlyA [30, 46, 65]. Ponadto, białko to posiada integralną domenę wiążącą ATP. Za ekspresję pomocniczego białka HlyD odpowiada gen *hlyD*. Oba białka: HlyB i HlyD tworzą kompleks translokacyjny tzw. translokator, umożliwiający transport HlyA przez błonę wewnętrzną [54, 60, 65]. Translokator wraz z białkiem błony zewnętrznej TolC (kodowane u *E. coli* przez gen *tolC* znajdujący się poza operonem *hly*) tworzą swoisty system sekrecji pozwalający na wydzielanie aktywnej cząsteczki HlyA do środowiska zewnętrznego. TolC tworzy porynowopodobną strukturę o długości 14 nm z COO-końcową domeną transmembranową, która wygląda jak długa α helikalna beczułka. Wewnętrzna średnica cylindra TolC wynosi 3,5 nm i tworzy wypełniony wodą kanał otwarty na zewnątrz komórki. W kierunku peryplazmy wewnętrzna średnica kanału zmniejsza się [1, 4, 65]. TolC jest rekrutowane przez translokazę błony wewnętrznej w odpowiedzi na przyłączenie substratu białkowego. Powstający w czasie sekrecji energetycznie naładowany kompleks translokatora jest trwały przez krótki, określony czas, i gdy tylko HlyA opuści komórkę bakteryjną przez otwarty w tym czasie kanał TolC, składniki systemu transportu powracają do stanu wyjściowego. Poza sekrecją HlyA, TolC uczestniczy również w procesie wyrzucania z wnętrza komórki bakteryjnej (efflux) szkodliwych substancji np. leków [1, 67, 72].

Poza genami zaangażowanymi w syntezę i sekrecję HlyA, jej ekspresja oraz aktywność zależy także od licznych genów biorących udział w biosyntezie LPS α-hemolizujących szczepów *E. coli*. Sugeruje się, że pomiędzy LPS a HlyA zachodzi fizyczna interakcja, w której LPS z nietkniętym rdzeniem wewnętrznym uczestniczy w formowaniu i utrzymywaniu aktywnej konformacyjnie cząsteczki hemolizyny oraz chroni ją przed agregacją i degradacją. Ponadto, w oczyszczonych, aktywnych hemolitycznie preparatach HlyA wykazano obecność kwasów KDO: 3-hydroksytetradekanowego oraz 2-keto-3-deoksyoktulonowego. Eksperymentalnie udowodniono natomiast, że mutacje w obrębie genów uczestniczących w biosyntezie LPS szczepu *E. coli* K12, któremu wprowadzono gen warunkujący ekspresję HlyA, zaburzały jej sekrecję lub znacznie obniżały aktywność. Nawet łagodna redukcja syntezy LPS drastycznie redukowała aktywność hemolityczną badanego szczepu [6, 42, 43, 72].

Budowa HlyA. HlyA *E. coli* stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej



Rys. 1. Schemat syntezy i sekrecji HlyA (objaśnienia w tekście)

107 kDa i kompleksowej molekularnej organizacji. COO-terminalny peptyd sygnałowy HlyA (domena polarna), rozpoznający translokator HlyD/HlyB składa się z 60 aminokwasów, które tworzą amfipatyczną helisę [54, 63]. Ponadto, w COO-terminalnej części łańcucha polipeptydowego tj. regionie centralnym, znajduje się wysoce konserwatywny region wiążący jony wapnia i zawierający tandemowo powtarzające się sekwencje 9 aminokwasów: L-X-G-G-X-G-N-D-X (G – glicyna, L – leucyna, N – asparagina, D – kwas asparaginowy, X – aminokwas charakterystyczny dla danej toksyny). Związanie jonów wapnia (1 jon Ca^{+2} na jedno powtórzenie) prowadzi do utworzenia przez sekwencje nonapeptydowe β-łańcuchów, które następnie organizują się w niezwykłe struktury tzw. β-beczułki (lub β-helisy), stąd wiązanie jonów wapnia, absolutnie niezbędne do aktywności cytolitycznej HlyA, zachodzi poza komórką bakteryjną, już po sekrecji HlyA do środowiska zewnętrznego. Poza tym, poziom wolnego wapnia wewnątrz komórki bakteryjnej jest ściśle regulowany i utrzymuje się na niskim poziomie (ok. 0,2 μM), zbyt niskim do wywołania aktywności hemolitycznej HlyA [20, 65]. Wydzielona do środowiska zewnętrznego toksyna HlyA stopniowo ulega inaktywacji tworząc duże polidyspersyjne agregaty. Zagregowane monomery HlyA nie wiążą jonów wapnia [3, 19].

Aktywność biologiczna HlyA. W temperaturze 37°C aktywna HlyA gwałtownie (w ciągu 12 sek.) wiąże się z błonami erytrocytów. Jest to proces nieodwracalny i nieograniczony, zależny od dawki HlyA. Ilość wiązanej HlyA rośnie jako funkcja liniowa i w najwyższych stężeniach hemolizyny na jedną krwinkę czerwoną przypada średnio 50000 cząsteczek HlyA. Zdolność wiązania się HlyA ze sztucznymi błonami lipidowymi świadczy o braku swoistych dla niej receptorów [21]. Wiązanie HlyA z erytrocytami jest procesem niezależnym od obecności jonów wapnia i zachodzi nawet w temperaturach 0–4°C, natomiast proces lizy zależy od obu tych czynników [5]. W procesie lizy N-terminalny, hydrofobowy region cząsteczki HlyA wbudowuje się w apolarny rdzeń błony plazmatycznej komórek eukariotycznych a wbudowana w błonę hemolizyna zachowuje się jak integralne białko [58, 65].

HlyA posiada szerokie spektrum aktywności cytolitycznej w stosunku do: erytrocytów, granulocytów, monocytów, komórek śródbłonka, komórek nabłonka kanalików nerkowych myszy i naczelnych oraz przeżuwaczy [13]. Aktywność cytolityczną HlyA hamuje dekstran 4 o średnicy cząstek 3–3,5 nm, w przeciwieństwie do osmotycznych protektorów, których cząsteczki mają mniejsze średnice np.: rafinozy (Ø=1,2–1,3 nm) lub sacharozy (Ø=0,9 nm) [12, 50]. Poza tym, na aktywność cytolityczną HlyA duży wpływ ma odczyn środowiska. HlyA osiąga maksymalną aktywność, gdy pH środowiska spada do ok. 5,4 [15].

Znaczącą funkcją biologiczną HlyA jest jej wpływ na syntezę cytokin. Niskie stężenia HlyA stanowią bodziec do syntezy trójfosforanu inozytolu i diacylglicerydu w granulocytach i komórkach śródbłonka, co stymuluje „wybuch tlenowy" i uwalnianie zawartości ziarnistości granulocytów [28]. Indukowana hemolizyną oscylacja wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórkach nabłonka kanalików nerkowych stanowi sygnał do uwolnienia cytokin prozapalnych: IL-6 i IL-8 [40]. Ponadto, HlyA stymuluje uwalnianie IL-1β, TNFα z ludzkich monocytów, produktów lipooksygenacji leukotrienu LTB4 i kwasu 5-hydroksyeikozatetraeiko-nowego oraz tlenku azotu z komórek śródbłonka, hamuje syntezę i uwalnianie IL-1β, IL-6, TNFα z leukocytów oraz powoduje apoptozę limfocytów [33, 48, 65]. „Wybuch tlenowy" oraz zaburzenie przepuszczalności błon plazmatycznych limfocytów indukują tylko niskie, sublityczne (0,02–0,1 HU/ml) stężenia HlyA, natomiast wyższe jej stężenia (0,2–0,3 HU/ml) powodują tak nagły wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych, że liza komórek uprzedza „wybuch tlenowy" [13].

Hemolizyna α uważana jest za główny czynnik wirulencji szczepów *E. coli* izolowanych z zakażeń układu moczowego oraz zakażeń ogólnoustrojowych: posocznicy, zapalenia otrzewnej, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [21, 49]. Filtraty płynnych hodowli α-hemolizujących szczepów *E. coli* są letalne dla myszy po podaniu dożylnym lub donosowym. Oczyszczona HlyA wywołuje u królików wyciek naczyniowy do płuc, przyczyniając się do zaburzenia czynności oddechowej. Dodatkowo HlyA interferuje z procesem fagocytozy działając toksycznie na komórki żerne, co może przyczyniać się do zaburzania podstawowego mechanizmu obronnego organizmu gospodarza [7].

Rola hemolizujących szczepów *E. coli* w etiopatogenezie zakażeń przewodu pokarmowego człowieka jest wciąż niejasna, chociaż Gunzburg i wsp. [29] izolowali od dzieci z biegunką szczepy *E. coli* zdolne do odrywania od podłoża komórek hodowanych *in vitro* tzw. CDEC (**C**ell-**D**etaching **E***scherichia* **C***oli*). Większość szczepów CDEC cechuje aktywność hemolityczna oraz hybrydyzacja z sondą genetyczną dla HlyA [26, 47, 53]. Poza HlyA, szczepy CDEC nie posiadają czynników wirulencji charakteryzujących enteropatogenne *E. coli* np.: enterotoksyn, toksyn shiga, zdolności inwazji lub reorganizacji cytoszkieletu enterocytów, z wyjątkiem cytotoksycznego czynnika nekrotyzującego CNF1 (**C**ytotoxic **N**ecrotizing **F**actor 1). Jednak Elliott i wsp. [22] oraz Island i wsp. [36] w swych badaniach nie potwierdzili udziału CNF1 w aktywności odrywania komórek przez szczepy CDEC. Ponadto, wykazali na modelu zwierzęcym, że syntetyzujące HlyA szczepy CDEC powodowały znacznie poważniejszy stan zapalny jelita cienkiego i grubego w porównaniu ze szczepami pozbawionymi zdolności syntezy HlyA. HlyA była również związana z większą częstością i ciężkością biegunki u zwierząt oraz znacznymi zmianami histopatologicznymi błony śluzowej jelita, obejmującymi: obrzęk, zapalenie, nekrozę i infiltrację leukocytami wielojądrzastymi.

2.2. Hemolizyna ClyA

Hemolizyna ClyA (oznaczana również jako: SheA, HlyE) jest cytolizyną wykrytą po raz pierwszy u laboratoryjnego szczepu *E. coli* K-12. Poza *E. coli*, obecność sekwencji kodujących ClyA opisano także u innych enterobakterii chorobotwórczych dla człowieka: *Salmonella* Typhi i Paratyphi *A* oraz pałeczek *Shigella flexneri* [2, 68]. Ekspresja ClyA zachodzi w warunkach beztlenowych a jej sekrecja do środowiska zewnętrznego jest najwyższa w późnej logarytmicznej fazie wzrostu, po czym opada na fazy początku stacjonarnej [16, 45]. Syntetyzowana ClyA gromadzi się w przestrzeni periplazmatycznej komórki bakteryjnej, choć wykrywa się ją również w frakcjach białek cytoplazmatycznych oraz białek związanych z błonami komórkowymi – zewnętrznymi i wewnętrznymi [68]. Nie jest znany dokładny mechanizm sekrecji ClyA,

choć wiadomo, że jej N-terminalny odcinek peptydowy nie podlega przetwarzaniu a sama toksyna wydzielana jest w obrębie pęcherzyków, które uwidoczniono w mikroskopie elektronowym w supernatantach hodowli bulionowych *E. coli* [16]. Sekrecji ClyA towarzyszy wyciekanie bakteryjnych białek periplazmatycznych [45].

Badania krystalograficzne wykazały, że ClyA posiada niezwykłą postać strukturalną i pod tym względem różni się od poznanych dotychczas cytolizyn bakteryjnych [70]. Monomer ClyA jest białkiem o masie cząsteczkowej 34 kDa w kształcie pałeczki składającej się z 4 długich (8–9 nm) helis, które są zwinięte w sposób: góra-dół – góra-dół. Na obu biegunach monomeru ClyA znajdują się złożone struktury: region NH_2-terminalny z domeną „ogon" oraz region COOH-terminalny z domenami „głowa" i „β-język." Region NH_2-terminalny zawiera dodatkową, piątą, krótką helisę (3 nm) – tzw. helisę α_G, która wciska się między pozostałe 4 długie helisy i sięga 1/3 ich wysokości, tworząc domenę „ogon." Region α_G prawdopodobnie jest zaangażowany w wiązanie ClyA z błoną plazmatyczną komórki docelowej i tworzenie w niej por. Delecja aminokwasów w obrębie domeny α_G prowadzi do powstania nierozpuszczalnego i nieaktywnego białka. Ponadto, helisa α_G posiada dwie cysteiny w pozycjach C285 i C87 tworzące wiązanie dwusiarczkowe, które charakteryzuje formę ClyA obecną w przestrzeni periplazmatycznej. Uważa się, że obecność wiązania S=S w trzeciorzędowej strukturze białkowej ClyA zapobiega przedwczesnej oligomeryzacji cytolizyny a w konsekwencji jej inaktywacji. Reaktywność grup tiolowych obu reszt cysteinowych C285 i C87, które w periplazmatycznej postaci ClyA są ukryte w trzeciorzędowej strukturze białka, sugeruje, że w roztworach domena α_G może oddysocjowywać od głównej struktury czterech helis eksponując obie reszty cysteinowe i hydrofobowy region „β-języka." W środowisku beztlenowym, w którym redukcji ulega wiązanie dwusiarczkowe, łączące domenę α_G z resztą cząsteczki, uzewnętrznia się aktywność cytolityczna ClyA [2].

ClyA nie ulega ekspresji na poziomie wykrywalnym u *E. coli* K-12 oraz u większości dzikich szczepów *E. coli*, co jest powodem braku hemolitycznego fenotypu w laboratoryjnych warunkach hodowlanych. U *E. coli* K-12 gen strukturalny kodujący ClyA jest genem kryptycznym, którego ekspresja ma miejsce w ściśle określonych warunkach np.: mutacji w obrębie genu *hns* lub nadprodukcji białka regulatorowego SlyA [27, 55, 70]. Locus *clyA* utrzymywany jest w stanie nieaktywnym przez nukleoproteinowy kompleks represyjny H-NS, czyniący promotor *clyA* niedostępnym dla polimerazy RNA i białka regulatorowego CRP [70]. Deficyt białka H-NS (np.: w wyniku mutacji genu *hns*), daje w efekcie fenotyp hemolityczny. Pozytywną regulację genu *clyA* indukuje u pałeczek *E. coli* szereg białek regulatorowych np.: białka FNR lub CRP, które bezpośrednio reagują z promotorem operonu *clyA* [45, 64, 69, 70].

Podobnie do innych cytolizyn, ClyA powoduje powstawanie w błonach plazmatycznych komórek eukariotycznych kationowo-selektywnych por, które mają kształt lejka o średnicy wewnętrznej: od góry 5–5,5 nm a od dołu 10–10,5 nm. Pory utworzone przez ClyA złożone są z ośmiu niekowalentnie związanych cząsteczek cytolizyny [2]. Oczyszczona ClyA jest cytotoksyczna *in vitro* dla ludzkich i mysich makrofagów, ludzkich monocytów oraz hodowlanych komórek nabłonka linii HeLa [2, 41, 68, 70]. Ponadto, ClyA powoduje lizę erytrocytów różnych gatunków zwierząt (kozich, końskich, owcy, kurzych) oraz ludzkich [2, 68]. Poza lizą komórek eukariotycznych, ClyA wywołuje w nich apoptozę. Pory tworzone w błonach plazmatycznych komórek eukariotycznych przez ClyA przypuszczalnie prowadzą do zmian stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia, co może pobudzać kaskadę apoptozy [41].

Oczyszczona ClyA wykazuje aktywność hemolityczną ok. 50 razy słabszą od aktywności HlyA: do lizy jednego erytrocytu wymagane jest od 1000 do 2000 cząsteczek ClyA, natomiast w przypadku HlyA wystarcza 5–20 cząsteczek hemolizyny [55, 68]. W przeciwieństwie do HlyA, aktywność hemolityczna ClyA nie wymaga obecności jonów wapnia i jest hamowana przez cholesterol, co jest cechą charakteryzującą liczne cytolizyny bakterii Gram-dodatnich [45]. Proteazy – trypsyna lub pepsyna nie hamują aktywności cytotolitycznej ClyA, podobnie nie zaburza jej także temperatura 25°C i pH 3–9 [16]. Rola ClyA w chorobotwórczości syntetyzujących ją szczepów *E. coli* nie została jeszcze wyjaśniona.

3. Hemolizyny *E. coli* związane z komórką bakteryjną

3.1. Hemolizyna β

Hemolizyna – β jest pierwszą, opisaną przez Smith w roku 1963 hemolizyną *E. coli* związaną z komórką bakteryjną. Pod wieloma względami przypomina ona hemolizynę HlyA *E. coli*: obie wymagają do aktywności jonów wapnia i wytwarzane są w logarytmicznej fazie wzrostu, wykazują aktywność hemolityczną w stosunku do erytrocytów różnych gatunków zwierząt, natomiast strefy lizy wokół kolonii bakteryjnych obserwowane na podłożach agarowych z krwią są jasne, przejrzyste i dobrze widoczne. Na podstawie fenotypowych podobieństw do HlyA, hemolizyna β uważana jest za odmianę HlyA i wiele szczepów

E. coli wykazuje zdolność syntezy obu hemolizyn równocześnie [7, 17]. Pomimo podobieństw, obie hemolizyny różnią się zasadniczo tym, że hemolizyna HlyA jest aktywnie wydzielana przez szczepy *E. coli* do podłoża hodowlanego, w którym można ją wykryć, natomiast hemolizyna β jest związana z komórką bakteryjną i próby uzyskania jej w stanie oczyszczonym nie powiodły się. Ponadto, przeciwciała neutralizujące HlyA nie wykazują takiego wpływu na hemolizynę β a sonda genetyczna swoista dla HlyA nie hybrydyzuje ze szczepami syntetyzującymi hemolizynę β, co wskazuje, że obie hemolizyny są różne genetycznie. Hemolizyna β, w przeciwieństwie do HlyA wydaje się nieimmunogenna, gdyż przeciwciała uzyskane dla szczepów β-hemolizujących nie neutralizują ich aktywności hemolitycznej [7, 17].

Według badań Short i Kurtz [61] syntezę hemolizyny β hamują czynniki wpływające na kwas nukleinowy, syntezę białek oraz tlenowy metabolizm pałeczek *E. coli*. Snyder i Koch [62], którzy badali szczepy *E. coli* wytwarzające obie hemolizyny: HlyA i β, wykazali, że poziom oznaczanej hemolizyny β osiągał maksymalne stężenie w późnej logarytmicznej fazie hodowli (tj. ok. 7 godz. inkubacji), czemu towarzyszyły również maksymalne stężenia hemolizyny wolnej – HlyA. Aktywność hemolityczna szczepów utrzymywała się także w stacjonarnej fazie wzrostu. Jednak, gdy hodowle hemolizujących szczepów *E. coli* prowadzono na ubogim podłożu zdefiniowanym chemicznie (zawierającym w swoim składzie jedynie związki nieorganiczne), w obecności niektórych cukrów (galaktozy, mannozy, maltozy) następowało zahamowanie syntezy hemolizyny HlyA bez wpływu na aktywność hemolizyny β. Obecność innych węglowodanów (glukozy) nie zaburzała wydzielania HlyA ani aktywności hemolizyny związanej z komórką. Aktywność hemolizyny HlyA w dużym stopniu zależy od pH hodowli – gdy pH hodowli na skutek fermentacji glukozy spada do ok. 5,4 HlyA osiąga najwyższą aktywność, natomiast hemolizyna β jest aktywna w szerokim zakresie pH: 5,5–8,0. Podobne różnice pomiędzy hemolizyną β a HlyA zaobserwowano pod wpływem działania formaliny, która inaktywowała HlyA, ale nie hemolizynę β. Obie hemolizyny wykazywały jednakową wrażliwość na ogrzewanie przez 1 godz. w 56°C.

Gadberg i wsp. [24, 25] porównywali cytotoksyczne działanie supernatantów uzyskanych z bulionowych hodowli hemolizujących szczepów *E. coli* zawierających HlyA oraz płukanych komórek bakteryjnych tego samego szczepu na monocyty, limfocyty i granulocyty ludzkie. Komórki bakteryjne (wytwarzające hemolizynę β) były cytotoksyczne dla monocytów i granulocytów, natomiast limfocyty okazały się stosunkowo oporne na działanie hemolizyny związanej z komórką bakteryjną, w przeciwieństwie do HlyA, która była aktywna w stosunku do wszystkich badanych leukocytów. Ogrzewanie szczepu lub uzyskanego z jego hodowli supernatantu znosiło efekt cytotoksyczny obu hemolizyn na leukocyty. Efekt cytotoksyczny zależał od dawki hemolizyny i temperatury. Hodowla szczepów w temperaturach wyższych lub niższych od 37°C oraz w warunkach beztlenowych obniżała potencjał cytotoksyczny szczepu, który ponadto był niezależny od antygenów O, H i K *E. coli*. Autologiczna plazma, z której izolowano leukocyty znosiła cytotoksyczny wpływ HlyA, ale nie aktywnych hemolitycznie płukanych komórek bakteryjnych. König i wsp. [39] wykazali, że zarówno hemolizyna związana z komórką, jak i hemolizyna uwalniana do podłoża indukują komórki tuczne i granulocyty do wydzielania histaminy i leukotrienów, co może przyczyniać się do wirulencji hemolizujących szczepów *E. coli*. Poza tym, nie badano związku β-hemolizujących *E. coli* z chorobotwórczością dla ludzi, choć wykazano udział tych szczepów w zakażeniach u zwierząt np.: chorobie obrzękowej świń [7].

Biorąc pod uwagę fakt, że hemolizyna β pomimo podobieństw fenotypowych z HlyA, różni się pod względem immunologicznym i genetycznym od opisanych hemolizyn *E. coli*, wydaje się, że stanowi ona odrębny typ hemolizyny związany z żywą komórką bakteryjną [7, 17].

3.2. Enterohemolizyna (Ehx) enterokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC)

Enterohemolizyna Ehx jest toksyną należącą do rodziny RTX toksyn i choć pod wieloma względami przypomina HlyA, jest od niej różna. Gen strukturalny kodujący Ehx-*ehxA* wykazuje ok. 60% homologii z genem strukturalnym *hlyA*. Ehx podobnie jak HlyA kodowana jest przez zespół genów (*ehxA*, *ehxC*, *ehxD*, *ehxB*) zorganizowanych w operon znajdujący się na dużym plazmidzie 90 kpz – pO157 [5, 14, 44, 51, 66]. Enterohemolizyna Ehx jest charakterystycznie syntetyzowana przez większość enterokrwotocznych pałeczek *E. coli* (EHEC) należących do serotypu O157:H7 oraz tzw. nie-O157 szczepy *E. coli* wytwarzające toksynę shiga (STEC). Na tej podstawie uznana została za dobry marker diagnostyczny pozwalający na izolację potencjalnych szczepów STEC lub EHEC z materiału od chorych [9, 11, 18]. Podobnie jak HlyA, Ehx wymaga do swojej aktywności jonów wapnia wiązanych przez tandem nonapeptydowych powtórzeń charakterystyczny dla całej rodziny RTX. W przeciwieństwie do HlyA, Ehx jest głównie związana z komórką bakteryjną i tylko niewielkie jej ilości uwalniane są do podłoża, co prawdopodobnie jest skutkiem defektu genów odpowiedzialnych za jej sekrecję. Fenotypowo

Ehx różni się od HlyA, tym, że jest wykrywana tylko na podłożach zawierających krwinki płukane a obserwowana strefa lizy jest podwójna – mała, mętna wokół kolonii bakteryjnych i jasna, przejrzysta pod spodem [71]. Ehx wykazuje także nieco większą masę cząsteczkową od HlyA – 110–116 kDa, co może być spowodowane obecnością dodatkowego, przypuszczalnego miejsca acylacji – Lys.[695] Poza zdolnością lizy erytrocytów ludzkich i różnych gatunków zwierząt, Ehx lizuje także leukocyty, ale tylko bydlęce, stąd zaliczana jest do leukotoksyn [5, 51].

3.3. Enterohemolizyny Ehly1 i Ehly2

Enterohemolizyny (Ehly1 i Ehly2) opisane zostały po raz pierwszy przez Beutina i wsp. [10]. Z uwagi na związek tych hemolizyn ze szczepami *E. coli* odpowiedzialnymi za zakażenia przewodu pokarmowego, zostały one nazwane enterohemolizynami. Synteza enterohemolizyn ograniczona jest do nielicznych serotypów *E. coli*, głównie O26:H-, które nierzadko posiadają zdolność wytwarzania toksyn shiga, co jest powodem mylenia ich z enterohemolizyną Ehx.

Enterohemolizyny, podobnie jak hemolizyna β są związane z komórką bakteryjną, ale w przeciwieństwie do niej wykrywane tylko na agarze zawierającym krwinki płukane, w nieobecności surowicy. Ponadto, enterohemolizyny do swej aktywności hemolitycznej nie wymagają obecności jonów wapnia. Strefy lizy wywoływane przez enterohemolizyny na podłożu agarowym z krwią są mętne, małe i słabo widoczne, obserwowane dopiero po 24 godz. inkubacji, gdyż maksymalna ich synteza ma miejsce w późnej logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Aktywność hemolityczna Ehly1 i Ehly2 jest ograniczona do krwinek ludzkich, końskich i świnki morskiej, a zachodzi w zakresie temperatur 4–37°C przy optymalnym pH 9.0 [8, 37]. Enterohemolizyny wrażliwe są na ogrzewanie w 60°C i 100°C przez 5 min oraz działanie trypsyny, natomiast ich aktywności hemolitycznej nie hamują: EDTA, sacharoza i rafinoza. Lizę erytrocytów przez Ehly hamuje dekstran 4, co wskazuje, że podobnie jak inne, bakteryjne hemolizyny uszkadzają one błony plazmatyczne komórek. Cholesterol również hamuje aktywność hemolityczną Ehly, choć nie zaburzają jej czynniki blokujące grupy sulfhydrylowe oraz nadtlenek wodoru, jak to ma miejsce w przypadku hemolizyn tzw. aktywowanych tiolem, wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie [23]. Surowica zawierająca przeciwciała dla enterohemolizyn choć nie hamuje ich aktywności hemolitycznej, silnie reaguje z białkami błony zewnętrznej o masach cząsteczkowych: 33 KDa (Ehly1) i 60 kDa (Ehly2), których ekspresję wykazano tylko u szczepów *E. coli* enterohemolizujących. Pomimo, że nie przedstawiono dowodów na to, że białka te posiadają aktywność hemolityczną, były one uważane za enterohemolizyny [56].

Determinanty genetyczne odpowiedzialne za ekspresję enterohemolizyn kodowane są przez fagi łagodne (ΦC3888 oraz ΦC3208), różne od fagów związanych z toksynami shiga [8]. Fenotyp hemolityczny Ehly syntetyzujących ją szczepów *E. coli* można wykazać w sonikatach bakteryjnych lub po zadziałaniu na komórki *E. coli* czynników uszkadzających DNA bakteryjne i wywołujących tzw. odpowiedź SOS (np.: mitomycyna C), a które indukują lityczny cykl fagów determinujących ekspresję Ehly. Pomimo, że synteza Ehly związana jest z fagami łagodnymi nie wykazano, aby geny strukturalne enterohemolizyn były pochodzenia fagowego. Przypuszczalnie fagi kodujące Ehly1 i Ehly2 posiadają sekwencje regulacyjne kontrolujące ekspresję strukturalnej, chromosomalnej determinanty enterohemolizyn. Ponadto, Beutin i wsp. [8] zaobserwowali, że transformacja laboratoryjnego szczepu *E. coli* K12 plazmidami pEO19 lub pEO39 (zawierającym sekwencje fagowe dla Ehly1 lub Ehly2) połączona jest z ograniczoną żywotnością oraz lizą komórek szczepu biorcy plazmidu. Zjawisko to nie dotyczyło szczepów rodzicielskich *E. coli*, z których izolowano fagi. Dopiero w roku 2002 Oscarsson i wsp. [56] wykazali, że transformacja niehemolizującego szczepu *E. coli* K12 plazmidem zawierającym fagi łagodne ΦC3888 lub ΦC3208 jest związana z indukcją litycznego cyklu tych fagów, co prowadzi do lizy komórek biorcy i uwolnienia hemolizyny ClyA. Badacze ci udowodnili również, że tylko szczepy *E. coli* posiadające nietknięty gen *clyA* prezentują hemolityczny fenotyp po transformacji plazmidami zawierającymi sekwencje fagowe. Co więcej, wprowadzenie do *E. coli* K12 plazmidów noszących geny dla HlyA lub Ehx także powodowało powstanie fenotypu hemolitycznego szczepu biorcy, za zmianę tą faktycznie odpowiadała cytolizyna ClyA. Nie wyjaśniono roli białek błony zewnętrznej 33 kDa i 60 kDa w aktywności hemolitycznej enterohemolizujących *E. coli*, ani kwestii, czy fenotyp hemolityczny badanych szczepów związany jest tylko i wyłącznie z syntezą i uwalnianiem ClyA, czy również innymi białkami bakteryjnymi. Ponadto, wykazano, że enterohemolizyny nie są konstytutywnie syntetyzowane przez dzikie szczepy *E. coli*, w przeciwieństwie do szczepu *E. coli* K12, któremu wprowadzono rekombinowany plazmid zawierający sekwencje DNA (sklonowane z faga łagodnego), odpowiadające za syntezę enterohemolizyn. Konstytutywna synteza enterohemolizyn drastycznie zaburza wzrost i żywotność szczepów biorców, czyniąc enterohemolizyny pierwszym przykładem toksyn bakteryjnych aktywnych wobec komórek eukariotycznych i prokariotycznych.

Enterohemolizyny są toksyczne dla hodowlanych *in vitro* komórek linii Vero, HeLa i HEp-2, CHO, Caco-2. Po 24 godzinach działania enterohemolizyn komórki ulegają zaokrągleniu i odrywają się od podłoża. Ponadto, nie stwierdzono ich toksycznego działania, gdy podawano je dożylnie lub dootrzewnowo myszom [23]. Związek aktywności enterohemolitycznej szczepów *E. coli* z cytolizyną ClyA jest nadal badany.

3.4. Hemolizyny kontaktowe *E. coli*

Wśród pałeczek *E. coli* opisano dwie hemolizyny nazwane kontaktowymi z uwagi na to, że do wykazania ich aktywności hemolitycznej konieczny jest ścisły kontakt komórki bakteryjnej z erytrocytami, który uzyskuje się przez zwirowanie krwinek i bakterii.

Hemolizyna kontaktowa (CH_{EAEC}) enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* (EAEC) opisana została przez Haque i wsp. [32]. Według badaczy najwyższą aktywność tej hemolizyny można stwierdzić, gdy szczepy EAEC hodowane są w bulionie CAYE (**C**asamino **A**cids-**Y**east **E**xtract) wzbogaconym 1 mM $CaCl_2$. Szczepy EAEC wyrastające w bulionie tryptozowo-sojowym cechuje bardzo słaba aktywność hemolityczna, natomiast brak jej, gdy szczepy są hodowane na innych podłożach. Poza tym, opisana przez Haque i wsp. [32] hemolizyna wymaga do swej aktywności odpowiedniego pH środowiska, temperatury 37°C oraz hodowli z napowietrzaniem. Nie badano związku CH_{EAEC} z wirulencją syntetyzujących ją szczepów *E. coli*.

Dobrze udokumentowanym przez Sansonetti i wsp. [57], a następnie Heider i wsp. [31] typem hemolizyny kontaktowej jest hemolizyna (CH_{EIEC}) enteroinwazyjnych szczepów *E. coli* (EIEC), syntetyzowana również przez pałeczki z rodzaju *Shigella* spp., która odpowiada za zdolność tych drobnoustrojów do wewnątrzkomórkowego namnażania się. Geny kodujące CH_{EIEC} zlokalizowane są u pałeczek *E. coli* oraz *Shigella* spp. na dużym plazmidzie wirulencji. Według badań Heider i wsp. [31] CH_{EIEC} wykazuje aktywność hemolityczną tylko w temperaturze ciała ludzkiego, w lekko zasadowym środowisku a homologiczna surowica znosi jej aktywność. Hemolizyna CH_{EIEC} wydaje się bardzo labilna oraz cechuje tylko i wyłącznie żywe komórki bakteryjne. Nie wykazano aktywności hemolitycznej badanych składników ścian komórek EIEC np.: LPS, białek błony zewnętrznej.

3.5. Hemolizyna τ

Hemolizyna τ opisana została wśród zmutowanych szczepów *E. coli* opornych na kwas nalidyksowy, którego obecność w środowisku stymuluje aktywność hemolityczną tej cytotoksyny. Hemolizyna τ jest słabo scharakteryzowana. Posiada aktywność hemolityczną ograniczoną do erytrocytów niektórych gatunków zwierząt, nie jest aktywna wobec krwinek ludzkich i owczych. Strefy lizy wywołane przez hemolizynę τ na agarze z krwią są małe i mętne, znacznie mniejsze w porównaniu ze strefami wywoływanymi przez hemolizyny α lub β. Nie podjęto prób uzyskania oczyszczonej hemolizyny τ, ale wykazano, że jest ona aktywna nawet po zabiciu komórek *E. coli* chloroformem [7, 17].

3.6. Aktywność hemolityczna enteropatogennych *E. coli* (EPEC)

Aktywność hemolityczna enteropatogennych szczepów *E. coli* (EPEC) jest słabo zbadana. Zdolność lizy erytrocytów przez EPEC jest związana z komórką bakteryjną i zależy od systemu sekrecji typu III. EPEC, podobnie jak grupa szczepów *E. coli* tzw. DAEC (**D**iffusely **A**dhering **E**. **C***oli*) – przylegających do komórek nabłonka w sposób rozsiany, posiada wyspecjalizowany aparat sekrecji typu III, za pośrednictwem którego drobnoustroje te „wstrzykują" sekrecyjne białka efektorowe wprost do cytozolu komórki gospodarza m.in. krwinek czerwonych. Z uwagi na to, że aparat sekrecji typu III przypomina igłę strzykawki (tworzy kanał łączący bakterię z erytrocytem), do lizy nie jest wymagany ścisły kontakt bakterii z krwinką a hemoliza koreluje z translokacją białek sekrecyjnych *E. coli* – EspB, EspD, EspF, Tir. Wyniki badań wskazują, że za aktywność hemolityczną EPEC może odpowiadać sekrecyjne białko EspD lub białka EspD i EspB, gdyż tylko mutacje w obrębie genów kodujących te białka redukowały zdolność hemolizy krwinek przez badane szczepy *E. coli*. Ponadto, w błonach erytrocytów zhemolizowanych pod wpływem bakterii, za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazano obecność białka HlyD [34, 35, 60]. Aktywność hemolityczną EPEC hamuje α_1– antytrypsyna oraz laktoferyna [38, 52].

4. Podsumowanie

Pałeczki *E. coli* należą do jednych z najlepiej poznanych bakterii, pomimo to wciąż niewiele wiadomo na temat licznych, syntetyzowanych przez nie czynników wirulencji m.in. hemolizyn.

Opisano szereg hemolizyn syntetyzowanych przez *E. coli*, wśród których najlepiej poznaną jest hemolizyna HlyA uważana za czynnik wirulencji szczepów *E. coli* izolowanych z zakażeń ogólnoustrojowych oraz zakażeń układu moczowego. Niewiele natomiast wiadomo na temat roli tej hemolizyny w zakażeniach układu pokarmowego. Hemolizujące szczepy *E. coli* izolowane są z próbek kału zarówno osób chorych jak

i zdrowych, stąd powszechnie uważane są za niechorobotwórcze lub potencjalnie uropatogenne. Opisana grupa szczepów *E. coli* zdolnych do odrywania komórek hodowlanych (CDEC), z których większość wytwarza hemolizynę α, zdaje się potwierdzać rolę HlyA jako czynnika wirulencji także w zakażeniach przewodu pokarmowego.

Wiele hemolizyn *E. coli* związanych jest z komórką bakteryjną, wskazując na ważną w patomechanizmie zakażeń rolę kontaktu bakterii z komórkami eukariotycznymi, jednak czy hemolizyny, które wykazują aktywność cytotoksyczną *in vitro* są tak samo aktywne *in vivo*? Czy poprzez indukcję sekrecji cytokin prozapalnych hemolizyny *E. coli* mogą przyczyniać się do rozchwiania równowagi pomiędzy układem immunologicznym jelita a florą fizjologiczną, co staje się przyczyną rozwoju choroby? Te i inne pytania wciąż pozostają bez odpowiedzi.

Piśmiennictwo

1. Andersen C.H., Hughes C., Koronakis V.: Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Reports*, **1**, 313–318 (2000)
2. Atkins A., Wyborn N.R., Wallace A.J., Stillman T.J., Black L.K., Fielding A.B., Hisakado M., Artymiuk P.J., Green J.: Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. *J. Biol. Chem*. **275**, 41150–41155 (2000)
3. Bakas L., Veiga M.P., Soloaga A., Ostolaza H., Goni F.M.: Calcium-dependent conformation of *E. coli* α-hemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochem. Biophys. Acta*, **1368**, 225–234 (1998)
4. Balakrishnan L., Hughes C., Koronakis V.: Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. **313**, 501–510 (2001)
5. Bauer M.E., Welch R.A.: Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun*. **64**, 167–175 (1996)
6. Bauer M.E., Welch R.A.: Pleiotropic effect of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun*. **65**, 2218–2224 (1997)
7. Beutin L.: The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol*. **180**, 167–182 (1991)
8. Beutin L., Bode L., Özel M., Stephan R.: Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. *J. Bacteriol*. **172**, 6469–6475 (1990)
9. Beutin L., Montenegro M.A., Ørskov I., Ørskov F., Prada J., Zimmermann S., Stephan R.: Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. **27**, 2559–2564 (1989)
10. Beutin L., Prada J., Zimmermann S., Stephan R., Ørskov I., Ørskov F.: Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl. Bakteriol. Hyg. A*, **267**, 576–588 (1988)
11. Beutin L., Zimmermann S., Gleier K.: Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol*. **34**, 2812–2814 (1996)
12. Bhakdi S., Mackman N., Niakud J.M., Holland I.B.: *Escherichia coli* hemolysin damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun*. **52**, 63–69 (1986)
13. Bhakdi S., Martin E.: Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun*. **59**, 2955–2962 (1991)
14. Boerlin P., Chen S., Colbourne J.K., Johnson R., De Grandis S., Gyles C.: Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect. Immun*. **66**, 2553–2561 (1998)
15. Bohach G.A., Snyder I.S.: Chemical and immunological analysis of the complex structure of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *J. Bacteriol*. **164**, 1071–1080 (1985)
16. Castillo F.J., Moreno F., del Castillo I.: Secretion of the *Escherichia coli K-12* SheA hemolysin is independent of its cytolytic activity. *FEMS Microbiol. Lett*. **204**, 281–285 (2001)
17. Cavalieri S.J., Bohach G.A., Snyder I.S.: *Escherichia coli* α-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev*. **48**, 326–343 (1984)
18. Chart H., Jenkins C., Smith H.R., Hedges D., Rowe B.: Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol*ogy, **144**, 103–107 (1998)
19. Cortajarena A.L., Goni F.M., Ostolaza H. His-859 is an essential residue for the activity and pH dependence of *Escherichia coli* RTX toxin α-hemolysin. *J. Biol. Chem*. **277**, 23223–23229 (2002)
20. Döbereiner A., Smidt A., Ludwig A., Goebel W., Benz R.: The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by *Escherichia coli* α-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. *Eur. J. Biochem*. **240**, 454–460 (1996)
21. Eberspächer B., Hugo F., Bhakdi S.: Quantative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun*. **57**, 983–988 (1989)
22. Elliott S.J., Srinivas S., Albert M.J., Alam K., Robins-Browne R.M., Gunzburg S.T., Mee B., Chang B.J.: Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect. Immun*. **66**, 2040–2051 (1998)
23. Figueiredo P.M., Catani C.F., Yano T.: Thiol-independent activity of a cholesterol-binding enterohemolysin by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **36**, 1495–1499 (2003)
24. Gadberg O.V., Ørskov I.: *In vitro* cytotoxic effect of α-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect. Immun*. **45**, 255–260 (1984)
25. Gadberg O.V., Ørskov I., Rhodes J.M.: Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strains on human blood monocytes and granulocytes *in vitro*. *Infect. Immun*. **41**, 358–364 (1983)
26. Gomes T.A., Abe C.M., Marques L.R.: Detection of HeLa cell-detaching activity and alpha-hemolysin production in enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from feces of Brazilian children. *J. Clin. Microbiol*. **33**, 3364 (1995)
27. Green J., Baldwin M.I.: The molecular basis for the differential regulation of the *hlyE* – encoded haemolysin of *Escherichia coli* by FNR and HlyX lies in the improved activating region 1 contact of HlyX. *Microbiology*, **143**, 3785–3793 (1997)

28. Grimminger F., Sibelius U., Bhakdi S., Suttorp N., Seeger W.: *Escherichia coli* hemolysin is a potent inductor of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J. Clin. Invest*. **88**, 1531–1539 (1991)
29. Gunzburg S.T., Chang B.J., Elliott S.J., Burke V., Gracey M.: Diffuse and enteroaggregative patterns of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. *J. Infect. Dis*. **167**, 755–758 (1993)
30. Guzman-Veri C., Chaves-Olarte E., Garcia F., Arvidson S., Moreno E.: *In vivo* proteolytic degradation of the *Escherichia coli* acyltransferase HlyC. *J. Biol. Chem*. **276**, 16660–16666 (2001)
31. Haider K., Albert M.J., Hossain A., Nahar S.: Contact-haemolysin production by enteroinvasive *Escherichia coli* and shigellae. *J. Med. Microbiol*. **35**, 330–333 (1991)
32. Haque M.A., Ohki K., Kikuchi M., Kohashi O.: Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. **32**, 1109–1111 (1994)
33. Hyland C., Vuillard L., Hughes C., Koronakis V.: Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J. Bacteriol*. **183**, 5364–5370 (2001)
34. Ide T., Laarman S., Greune L., Schillers H., Oberleithner H., Schmidt M.A.: Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III – secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol*. **3**, 669–679 (2001)
35. Ide T., Michgehl S., Knappstein S., Heusipp G., Schmidt M.A.: Differential modulation by Ca^{2+} of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. **71**, 1725–1732 (2003)
36. Island M.D., Ciu X., Foxman B., Marrs C.F., Stamm W.E., Stapleton A.E., Warren J.W.: Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1 – positive and – negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. *Infect. Immun*. **66**, 3384–3389 (1998)
37. Jürgens D., Özel M., Takaisi-Kikuni N.B.: Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Biol. Int*. **26**, 175–186 (2002)
38. Knappstein S., Ide T., Schmidt M.A., Heusipp G.: α_1-antytripsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun*. **72**, 4344–4350 (2004)
39. König B., König W., Schefter J., Hacker J., Goebel W.: Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. *Infect. Immun*. **54**, 886–892 (1986)
40. Laestadius A., Richter-Dahlfors A., Aperia A.: Dual effects of *Escherichia coli* α-hemolysin on rat renal proximal tubule cells. *Kindey Interantional*, **62**, 2035–2042 (2002)
41. Lai X-H., Arencibia I., Johanson A., Wai S.N., Oscarsson J., Kalfas S., Sundqvist K-G., Mizunoe Y., Sjőstedt A., Uhlin B.E.: Cytocidal and apoptotic effects of the ClyA protein from *Escherichia coli* on primary and cultured monocytes and macrophages. *Infect. Immun*. **68**, 4363–4367 (2000)
42. Leeds J.A., Welch R.A.: Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMP Start DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *J. Bacteriol*. **179**, 3519–3527 (1997)
43. Leeds J.A., Welch R.A.: RfaH enhances elongation of *Escherichia coli hlyCABD* mRNA. *J. Bacteriol*. **178**, 1850–1857 (1996)
44. Lehmacher A., Meier H., Aleksic S., Bockemühl J.: Detection of hemolysin variants of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**, 2449–2453 (1998)
45. Ludwig A., Bauer S., Benz R., Bargamn B., Goebel W.: Analysis of the SlyA – controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol*. **31**, 557–567 (1999)
46. Ludwig A., Garcia F., Bauer S., Jarchau T., Benz R., Hoppe J., Goebel N.: Analysis of the *in vivo* activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **178**, 5422–5430 (1996)
47. Marques L.R., Abe C.M., Griffin P.M., Gomes T.A.: Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. **33**, 2707–2709 (1995)
48. May A.K., Sawyer R.G., Gleason T., Whitworth A., Pruett T.L.: *In vivo* cytokine response to *Escherichia coli* alpha-hemolysin determined with genetically engineered hemolytic and nonhemolytic *E. coli* variants. *Infect. Immun*. **64**, 2167–2171 (1996)
49. Menestrina G., Pederzolli C., Dalla Serra M., Bregante M., Gambale F.: Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J. Membrane Biol*. **149**, 113–121 (1996)
50. Moayeri M., Welch R.A.: Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun*. **65**, 2233–2239 (1997)
51. Nataro J.P., Kaper J.B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*. **11**, 142–201 (1998)
52. Ochoa T.J., Noguera-Obenza M., Ebel F., Guzman C.A., Gomez H.F., Cleary T.G.: Lactoferin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. **71**, 5149–5155 (2003)
53. Okeke I.N., Steinrück H., Kanack K.J., Elliott S.J., Sundström L., Kaper J.B., Lamikanara A.: Antibiotic-resistant cell-detaching *Escherichia coli* strains from Nigerian children. *J. Clin. Microbiol*. **40**, 301–305 (2002)
54. Oropeza-Wekerle R.L., Speth W., Imhof B., Gentscher I., Goebel W.: Translocation and compartmelization of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA). *J. Bacteriol*. **172**, 3711–3717 (1990)
55. Oscarsson J., Mizunoe Y., Li L., Lai X-H., Wieslander A., Uhlin B.E.: Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **32**, 1226–1238 (1999)
56. Oscarsson J., Westmark M., Beutin L., Uhlin B.E.: The bacteriophage-associated Ehly1 and Ehly2 determinants from *Escherichia coli* O26:H- strains do not encode enterohemolysin per se but cause release of the ClyA cytolysin. *Int. J. Med. Microbiol*. **291**, 625–631 (2002)
57. Sansonetti P.J., Ryter A., Clerc P., Maurelli A.T., Mounier J.: Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysin. *Infect. Immun*. **51**, 461–469 (1986)
58. Schindel C., Zitzer A., Schulte B., Gerhards A., Stanley P., Hughes C., Koronakis V., Bhakdi S., Palmer M.: Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. *Eur. J. Biochem*. **268**, 800–808 (2001)
59. Shaw R.K., Daniell S., Ebel F., Frankel G., Knutton S.: EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell. Microbiol*. **3**, 213–222 (2001)

60. Sheps J.A., Cheung I., Ling V.: Hemolysin transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. **270**, 14829–14834 (1995)
61. Short E.C., Kurtz H.J.: Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. **3**, 678–687 (1971)
62. Snyder I.S., Koch N.A.: Production and characteristics of hemolysins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **91**, 763–767 (1966)
63. Soloaga A., Ostolaza H., Goni F., De La Cruz F.: Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and comparison with the properties of mature α-haemolysin. *Eur. J. Biochem*. **238**, 418–422 (1996)
64. Spory A., Bosserhoff A., von Rhein C., Goebel W., Ludwig A.: Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by the transcriptional regulator SlyA. *J. Bacteriol*. **184**, 3549–3559 (2002)
65. Stanley P., Koronakis V., Hughes C.: Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **62**, 309–333 (1998)
66. Taineke I., Zhang H.M., Wakisaka-Saito N., Yamamoto T.: Enterohemolysin operon of shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett*. **524**, 219–224 (2002)
67. Thanabalu T., Koronakis E., Hughes C., Koronakis V.: Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J*. **17**, 6487–6496 (1998)
68. Wai S.N., Westermark M., Oscarsson J., Jass I., Maier G., Benz R., Uhlin B.E.: Characterization of dominantly negative mutant ClyA cytotoxin proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **18**, 5491–5499 (2003)
69. Watson P.R., Pallin S.M., Bland A.P., Libby S.J., Jones P.W., Wallis T.S.: Differential regulation of enteric and systemic salmonellosis by SlyA. *Infect. Immun*. **67**, 4950–4954 (1999)
70. Westermark M., Oscarsson J., Mizunoe Y., Viciene J.U., Uhlin B.E.: Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **182**, 6347–6357 (2000)
71. Wieler H.L., Tigges M., Ebel F., Schäferkordt S., Djafari S., Schlapp T., Baljer G., Chakraborty T.: The enterohemolysin phenotype of bovine shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) is encoded by the EHEC-hemolysin gene. *Vet. Microbiol*. **52**, 153–164 (1996)
72. Vakharia H., German G.J., Misra R.: Isolation and characterization of *Escherichia coli tolC* mutants defective in secreting enzymatically active alpha hemolysin. *J. Bacteriol*. **183**, 6908–6916 (2001)