



UNIVERSITAT DE BARCELONA

SOLEMNE INVESTIDURA DE
DOCTOR *HONORIS CAUSA*
al professor

Roland Benz



Discurs de presentació del professor
Miquel Viñas

Novembre de 2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA

SOLEMNE INVESTIDURA DE
DOCTOR *HONORIS CAUSA*
al professor

Roland Benz

Discurs de presentació del professor
Miquel Viñas

Novembre de 2007

Entitat editora
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Rector
Màrius Rubiralta i Alcañiz

President del Consell Social
Joaquim Coello

© Universitat de Barcelona
Producció: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona
Disseny de la col·lecció: Cesca Simón

Paper: Coberta: Rives Design
Interior: Estucat ecològic
Tipografia: Times
Motiu de la coberta: Universitat de Barcelona. Edifici Històric (Detall)

Direcció i administració de la publicació
Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona
Adolf Florensa, s/n
08028 Barcelona

Aquest document està subjecte a la llicència de Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada de Creative Commons, el text de la qual està disponible a: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.



ÍNDIX

Protocol de l'acte	5
Discurs de presentació del professor Miquel Viñas	11
Discurs del professor Roland Benz (<i>anglès</i>)	23
Discurs del professor Roland Benz (<i>català</i>)	33

PROTOCOL DE L'ACTE

*Investidura del professor Roland Benz
com a doctor honoris causa*

1. S'entra en processó mentre el Cor de la Universitat de Barcelona interpreta el cant d'entrada.
2. El rector, Dr. Màrius Rubiralta, explica l'objectiu de la sessió acadèmica.
3. El rector dóna la paraula al secretari general, Dr. Xavier Pons, el qual llegeix l'Acta del nomenament de doctor honoris causa a favor del professor Roland Benz.
4. El rector invita el degà de la Facultat d'Odontologia, Dr. Leonardo Berini, i el professor padrí, Dr. Miquel Viñas, a anar a cercar el doctorand i acompanyar-lo fins al Paranimf.
5. Intervenció del Cor de la Universitat de Barcelona.
6. El rector dóna la benvinguda al professor Roland Benz, el qual s'asseu al lloc que li ha estat reservat.
7. El professor padrí llegeix el discurs en què presenta els mèrits del seu patrocinat.

8. El rector demana al padrí i al degà que acompanyin el doctorand a la presidència.

9. El rector pronuncia les paraules d'investidura:

«Pel Consell de Govern de la Universitat de Barcelona, a proposta de la Facultat d'Odontologia, heu estat nomenat doctor honoris causa en testimoniatge i reconeixença dels vostres mèrits rellevants.»

«En virtut de l'autoritat que m'ha estat conferida, us faig lliurament d'aquest títol i —com a símbol— de la birreta llorejada, antiquíssim i venerat distintiu del magisteri. Porteu-la com a corona dels vostres mereixements i estudis.»

«Rebeu l'anell que l'antiguitat tenia el costum de lliurar, en aquesta venerada cerimònia, com a emblema del privilegi de signar i segellar els dictàmens, consultes i censurens escaients a la vostra ciència i professió.»

«Rebeu també aquests guants blancs, símbol de la puresa, que han de servir les vostres mans, signes, uns i altres, de la distinció de la vostra categoria.»

«Perquè us heu incorporat en aquesta Universitat, rebeu ara, en nom del seu Claustre, l'abraçada de fraternitat dels qui s'honoren i es congratulen de ser els vostres germans i companys.»

10. El nou doctor s'asseu entre els seus acompanyants en el lloc reservat al Claustre de Doctors.

11. El rector dóna la paraula al nou doctor Roland Benz, el qual és acompanyat a l'estrada pel professor padrí i el degà.

12. Intervenció del doctor Roland Benz.

13. Un cop acabada la intervenció, el professor padrí i el degà esperen el doctor Roland Benz al peu de l'estrada i l'acompanyen al seu lloc.
14. Discurs del rector.
15. Cant de l'himne *Gaudeamus Igitur* per tots els assistents a l'acte.

GAUDEAMUS IGITUR

*Gaudeamus igitur,
iuvenes dum sumus. (bis)
Post iucundam iuventutem,
post molestam senectutem,
nos habebit humus. (bis)*

*Vbi sunt qui ante nos
in mundo fuere? (bis)
Adeas ad inferos,
transeas ad superos,
hos si uis uidere. (bis)*

*Viuat Academia,
uiuunt professores. (bis)
Viuat membrum quodlibet,
uiuunt membra quaelibet,
semper sint in flore. (bis))*

16. El rector aixeca la sessió.

DISCURS DE PRESENTACIÓ
DEL PROFESSOR
MIQUEL VIÑAS

Rector Magnífic,
digníssimes autoritats,
professores i professors
alumnes,
senyores i senyors,

La primera vegada que vaig entrar en aquest Paranimf «legalment» fou amb motiu de la concessió del doctorat honoris causa a Joan Miró (el pintor), Frederic Mompou (el músic) i Pierre Vilar (l'historiador que ens havia fet comprendre tantes coses); jove aprenent de professor, de cap manera podia pensar que una trentena d'anys després hauria de fer una *laudatio* d'un mestre i amic en aquesta extraordinària sala. Però sóc ací per fer justament això.

Roland Benz va néixer a Singen/Hohentwiel l'any 1943, és a dir quan restava un any i mig perquè els fusells que van assolir Europa i també la família Benz, callessin. És fàcil d'imaginar una infantesa dura, presidida pel fred i les necessitats. Sovint, tot passejant pels boscos que envolten la casa on viuen els Benz, el Professor m'ha fet esment de records de quan els sotaboscors eren nets, perquè els alemanys plegaven restes vegetals i llenya més o menys seca per escalfar-se i superar els duríssims hiverns de la postguerra.

Roland Benz es va educar a l'escola pública entre els anys 1949 i 1963, quan inicià els estudis de Matemàtiques, Física i Química a la prestigiosa Universitat de Würzburg (universitat pública, com gairebé totes les d'Alemanya, i en la qual Roëntgen havia descobert els raigs X entre d'altres descobertes de gran rellevància). Els anys 1968 i 1969 es va formar com a professor d'ensenyament secundari a la Universitat de Friburg, on superà l'examen d'estat. Benz, però, va marxar d'allí a la Universitat de Konstanz, on començà la tesi sota la direcció del Prof. Dr. Peter Läger i on obtingué el doctorat per l'esmentada universitat. Des de 1972 fins a 1980 va treballar com a «investigador associat» (*Sonderforschungsbereich*) tot i que l'any 1977 va obtenir l'habilitació en Biofísica a la Universitat de Konstanz. Entre els anys 1981 i 1986 va treballar sota els auspicis del

Heisemberg-Stipendiat del *Deutschen Forschungsgemeinschaft*. Durant el curs 1981-1982 va ser *Visiting Professor* al Departament de Fisiologia i Biofísica de la *State University of New York*. L'any 1984 va ser professor visitant del Departament de Microbiologia de la *British Columbia University* a Vancouver (Canadà). L'any 1986 obté una plaça de catedràtic de Biotecnologia a la Universitat de Würzburg. L'any 2002 va ser honorat amb el premi Gay-Lussac/Humbolt concedit pels ministeris de Ciència de França i Alemanya. Els anys 2003 i 2005 va ser el responsable de l'Escola Europea de Graduats, centrat en els temes:

Regulació gènica en i per patògens microbians;

Transducció de senyal: on convergeixen el càncer i la infecció.

Aquesta és una semblança resumida de la vida acadèmica de Roland Benz. Però més enllà de les paraules tòpiques que defineixen la trajectòria d'un home de ciència, voldria en aquest curt parlament mostrar-ne algunes vessants que s'aparten una mica de les visions estereotipades.

La sòlida formació en física i química en el seu període de post-graduat va impulsar Benz a enfocar l'estudi de fenòmens relacionats amb les membranes aleshores enteses sobre la base de l'ara tan superat model de Danielli i Dawson. La valinomicina i el seu efecte en el transport de ions a través de la membrana el conduiria a comprendre el mecanisme d'acció d'aquest antibiòtic alhora que obria una via d'exploració dels principals mecanismes que operen en les membranes des d'un punt de vista bàsic. Roland Benz intueix en aquell moment que l'estudi de l'electrofisiologia de les membranes ultrapassa l'interès centrat en el sistema nerviós per abastar qualsevol membrana de qualsevol ésser viu. És en aquest moment que Benz comença a treballar amb membranes artificials, primer monocapes, després bicapes i crea en el seu laboratori mètodes que s'estendran per tots els laboratoris del món que treballen en l'especialitat. Novament aliat amb un antibiòtic (la gramicidina), el laboratori de Benz aclareix alguns aspectes fonamentals del pas de cations a través de les membranes.

Ja en aquell moment es comença a intuir la importància que tindran pocs anys després els fenòmens de membrana a l'hora d'explorar els mecanismes de l'**antibiosi**, la **penetració** dels antibiòtics dins del bacteri i anys després la seva **expulsió**. És més o menys a finals de la dècada dels 70 quan el descobriment de l'existència de les por-

nes en la membrana externa dels bacteris gramnegatius al laboratori de l'investigador japonès establert a Berkeley **Hiroshi Nikaido** per part d'un altre japonès, **Taiji Nakae**, permet a la investigació de Benz entrar de ple en dos camps diferents: d'una banda esdevé l'investigador europeu per excel·lència dedicat a l'estudi d'aquestes noves proteïnes que són l'única connexió real entre els bacteris i el medi ambient en què es troben i per tant pas obligat de **nutrients, metabòlits i antibiòtics**. És en aquest moment que els estudis de Benz comencen a tenir una influència directa sobre les pautes d'aplicació dels antibiòtics. D'altra banda els mètodes de Benz comencen a interessar als investigadors que treballen en el **sistema nerviós** humà i dels animals. Benz estableix una fructífera cooperació que du uns mètodes inicialment pensats per estudiar proteïnes bacterianes a ser emprats en neurociències; i, finalment, Benz no abandona l'estudi del mecanisme en si mateix, és a dir sota un prisma de recerca estrictament **bàsica**.

L'inici de la dècada dels 80 comença amb l'aplicació dels mètodes desenvolupats per a l'estudi de membranes en el laboratori de Benz en organismes **eucariotes** i, particularment, en els **mitocondris** de les cèl·lules eucariotes. En aquell moment la teoria endosimbiontica es trobava en ple centre del debat científic i la naturalesa bacteriana dels mitocondris era cada vegada més acceptada. En part aquesta acceptació deriva del fet d'haver-se trobat porines en les membranes externes (que en aquest cas contacten amb el citoplasma de les cèl·lules eucariotes) dels mitocondris.

En aquells moments Roland Benz ja és un reconegut especialista a nivell mundial en l'estructura, composició i funcionament de les membranes i, particularment, de les proteïnes formadores de canals, i coopera regularment amb científics de molts països, principalment EUA, Canadà, Anglaterra, Espanya, França i Itàlia. Benz segueix centrat en la recerca bàsica de l'estructura i funció de les membranes. En aquest terreny és particularment digne de menció ací que un dels treballs d'aquesta època se centrà en el paper dels **hopanoides**, molècules que tenen un paper en les membranes microbianes similar al colesterol en les membranes eucariotes. Els hopanoides havien estat estudiats a la Universitat de Houston pel català **Joan Oró**. Benz va descriure la interacció entre els hopanoides i les **fosfatidilcolines** que contenen àcids **oleics** i **omega-ciclohexildodecanoic** en les membranes lipídiques. Prossegueix l'exploració d'aspectes estructurals i funcionals de membranes de la cèl·lula eucariota. En aquest sentit

destaquen una sèrie de treballs sobre diversos tipus cel·lulars humans i animals.

A mitjan anys 80, les metodologies creades per R. Benz amb vista a esbrinar les característiques de les membranes externes dels bacteris gramnegatius, la creixent incidència d'infeccions produïdes per aquests bacteris gramnegatius, generalment en l'hàbitat hospitalari, i el fet que la resistència als antibiòtics es va configurant com un dels grans problemes de salut en el món occidental, duen a una extensió de l'aplicació dels mètodes d'anàlisi creats per Benz a moltes espècies bacterianes incloses en els grups suara esmentats. Així, s'inicia un estudi sistemàtic de les permeabilitats de les proteïnes formadores de canals en les membranes externes bacterianes com *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, i altres.

Els micobacteris, entre els quals hi ha bacteris tan importants des del punt de vista de la clínica humana com *Mycobacterium tuberculosis* (el bacil de Koch) que causa la **tuberculosi**, o *M. leprae* que causa la **lepra**, són microorganismes que no pertanyen al grup dels **gramnegatius** com tots els que hem esmentat fins ara sinó al dels **grampositius**. Els bacteris grampositius no contenen porines perquè la seva superfície externa és un pèptid glicà regularment prou hidrofílic perquè els nutrients el travessin sense dificultats. Amb tot, els **micobacteris** són extraordinàriament **hidrofòbics** en la seva superfície cel·lular, i això feia que fins i tot no hi hagués explicació de com podien prendre aquests bacteris els nutrients des de l'exterior quan és ben conegut que es troben en solució aquosa. Aquesta sospita anava lligada a l'observació que molts dels micobacteris creixen extraordinàriament a poc a poc en medis de laboratori (21 dies, aproximadament, perquè les colònies siguin visibles). Benz va pensar que aquests microorganismes haurien de contenir **proteïnes similars** a les dels gramnegatius. La recerca d'aquesta possibilitat la dugué a terme juntament amb el microbiòleg català **Joaquim Trias**, sorgit (com jo) del grup de **Gaspar Lorén** a la UB. Efectivament van poder demostrar per primera vegada que hi havia proteïnes molt similars a les porines en aquests grampositius. La revista *Science* va publicar el primer resultat l'any 1992 i després hi va haver un seguit de publicacions en el mateix sentit en què es descrivien l'estructura, la funció i la seva existència en altres bacteris grampositius de superfície hidrofòbica. Al final de la dècada, aquestes porines en els micobacteris serien objecte d'estudis geneticomoleculars al laboratori de Benz. L'existència de porines en alguns organismes com els que acabem de citar marca de

manera central la primera meitat dels anys noranta en el currículum de Benz, alhora que és un descobriment que canvia la manera de veure la biologia dels **micobacteris** així com la seva patogènia i la seva resistència als antimicrobians. No obstant això, durant aquest període continua la producció científica en els mateixos terrenys als quals hem fet esment abans. Així, prossegueixen els estudis en espècies bacterianes, de les quals ens n'interessa principalment la susceptibilitat als antibiòtics. Altrament, Benz i el seu grup demostraren porines en **plantes** com el ricí (*Ricinus communis*) i altres. Per tant ja s'havia vist que l'existència de porines, els fenòmens en què intervenen i el coneixement de les seves funcions excedeix el camp de la microbiologia i de les qüestions mèdiques relacionades i afecta qualsevol ésser viu animal, planta o procariota.

Algunes malalties de la musculatura (**miopaties**) severes posaren de manifest que eren degudes a la manca de les anomenades porines humanes. La porina humana 31HL (HVDAC1) és molt abundant en el teixit muscular. El mètode de la detecció de formació de canals en bicapes lipídiques negres ha estat proposat com un dels millors mètodes per a la detecció de **miopaties** degudes a aquests tipus d'alteracions a partir de la detecció de formació de canal en material procedent de **biòpsies**. Prossegueixen també els descobriments relatius als **mitocondris** de les porines, i també els estudis de porines en vegetals diferents dels estudiats inicialment. És a dir estudis de fonament bàsic. És un fet prou conegut que la característica fonamental de la recerca biomèdica és la conjunció de recerca bàsica i l'exploració de la seva aplicació. En aquest nou mil·lenni sembla que serà, almenys al principi, la irrupció de les noves tecnologies, principalment la **nanotecnologia**. Pocs grups estaven més ben situats en la hipotètica via cap a aquestes tècniques que el de Benz. De fet, en certa manera, les mesures electrofisiològiques ja eren tècniques **nanobiològiques** (*single molecule*). Benz i el seu grup continuen en la mateixa línia i incorporant-hi els mètodes més actuals. Això inclou el fet que els coneixements, els mètodes creats per Benz i els descobriments de la biologia i la fisicoquímica de les membranes estenen la seva aplicació fins i tot lluny del món clínic. Així, en els darrers anys s'han aplicat alguns dels conceptes i mètodes emprats a camps tan diversos com la producció **d'insecticides ecològics**; l'acció de les toxines, incloent la toxina de *Bacillus anthracis* de la qual el Prof. Benz ens parlarà a continuació. Òbviament continua la recerca en el terreny de les porines bacterianes i els canals de penetració dels antibiòtics.

Tota aquesta història personal i de grup del professor Roland Benz mostra algunes característiques que té sentit emfatitzar:

PRIMER: CONSTÀNCIA. L'evolució de la història científica de Roland Benz és una evolució natural, sense cap discontinuïtat, en la qual s'ha anat avançant en el coneixement de la fisiologia i l'estructura de les membranes primer bacterianes, posteriorment d'altres organismes i de l'home.

SEGON: CONSISTÈNCIA. Tota aquesta evolució ha originat una extensíssima producció científica publicada en les millors revistes de l'especialitat tant en microbiologia com en química fisiològica.

TERCER: HONESTEDAT EN LA RELACIÓ. La producció científica de Benz s'ha produït en el si d'un equip de recerca la majoria dels membres del qual, molts anys després, segueixen mantenint relació amb el grup i assistint majoritàriament a la seva reunió anual.

QUART: IMPACTE. Ultra els aspectes de quantificació de l'impacte de la producció científica, la recerca de Benz ha tingut un enorme impacte en camps científics diversos, principalment:

a) Microbiologia/malalties infeccioses

La determinació de la permeabilitat de les proteïnes formadores de canal en la membrana externa dels bacteris gramnegatius i una sèrie de grups grampositius, ha permès entendre la fisicoquímica de la penetració dels bacteris pels antibiòtics. D'aquesta comprensió n'han derivat dues grans línies de recerca: (i) cerca d'antibiòtics menys subjectes a les restriccions de pas; (ii) cerca d'estratègies de tractament que retardin o impedeixin l'emergència de bacteris resistents.

b) Ciència bàsica

El coneixement de les porines bacterianes dóna origen al coneixement de les porines dels mitocondris (Benz) i, posteriorment, al coneixement de porines o de *porin-like* proteïnes. El seu estudi ha contribuït a entendre mecanismes cel·lulars importants d'intercanvi de molècules/informació entre diferents components cel·lulars.

c) Medicina clínica

L'estudi de la formació de canals ha tingut efectes directes en la clínica en dos nivells: la definició de les polítiques antibiòtiques i la diagnosi de malalties relacionades amb el teixit muscular.

d) Ciències ambientals

En el moment actual, la presència massiva de molècules tòxiques en l'ambient justifica plenament la recerca d'estratègies dirigides a

minimitzar l'alliberació de majors quantitats d'aquestes molècules. Un dels insecticides «ecològics» més estudiats és el que es basa en la utilització de bacteris «antiinsecte»; entre aquests sobresurt *Bacillus thuringensis*, que té la capacitat de produir i secretar toxines letals per als insectes. El mecanisme d'acció precís de la toxina s'ha esbrinat a partir dels estudis de la formació de grans canals en les cèl·lules dels insectes per part de la toxina.

CINQUÈ: DOCÈNCIA. Benz és un docent de primera línia, no únicament en la formació de científics, de la qual cosa n'és bona mostra la formació en el seu grup de personalitats científiques, sinó també a nivell de pregraduat. Benz és coordinador del programa Erasmus-Socrates a la Facultat de Biologia de Würzburg. Activitats d'aquest tipus són força inusuals en professors dedicats a la recerca avançada i és per això que em plau de destacar-ho aquí.

SISÈ: COOPERACIÓ. Ja ho hem abans. Benz ha cooperat amb pràcticament tots els grups del món científic que treballen en la membrana externa dels gramnegatius, i amb molts grups que treballen en la formació de canals inespecífics transmembrana. Així, ha publicat articles amb els grups de Taiji Nakae (Japó), Bob Hanckok (EUA), Menestrina i de Vito de Pinto (que avui ens acompanya) (Itàlia), Mathias Winterhalter (Alemanya), el nostre laboratori a Barcelona i d'altres.

La vida de Roland Benz està, doncs, presidida per una característica notabilíssima, la seva **constància**. Sempre ha investigat el mateix. La membrana, als inicis de la seva recerca, era el sac que envoltava l'activitat biològica; avui l'entenem com la seu dels processos biològics més importants en la salut i en la malaltia. A aquest canvi tan dràstic en la concepció que tenim de la membrana hi han contribuït de manera fonamental les aportacions de Roland Benz.

Però ultra el mèrit científic, hi he d'afegir, faltaria a la veritat si no ho fes, la dimensió humana, l'hospitalitat, l'acolliment afectuós i rigorós dels nostres estudiants de doctorat i joves investigadors, la consciència que altres no estàvem tan bé com ells (*«don't worry, I will provide funds for your student»*).

També, i en aquest camp, l'hospitalitat domèstica... tots els qui hem estudiat membranes bacterianes en el món hem dormit a cal Benz: Hiroshi Nikaido, Taiji Nakae, Bob Hanckock i tants d'altres

hem pogut viure moments inoblidables de discussions científiques nocturnes amb l'excelsa hospitalitat de Hannelore i en companyia d'un *Silvaner Trocken*.

Ich danke Ihnen, lieber Herr Kollege, für Ihr wissenschaftliches und menschliches Geschick. Damit haben Sie uns allen die Mechanik der Membranproteinen, also sowohl deren Einbau als auch deren Arbeitsweise, mit großem Können dargelegt.

Ich danke Ihnen für die Gastfreundschaft, mit der Sie uns in Ihrem Hause, in Ihrem Labor aufgenommen haben.

Ich danke Ihnen für die große Hilfe, die Sie im Rahmen der europäischen Austauschprogramme den Studenten unserer Universität in so großem Umfang zur Verfügung gestellt haben

Vor allem allerdings möchte ich Ihnen für Ihre wissenschaftliche sowie für Ihre menschliche Größe danken, welche zu einem besseren Leben beigetragen hat und auch weiterhin beitragen wird.

Aus diesen Gründen sowie aus anderen, auf welche ich heute in meiner kurzen Laudatio nicht eingehen kann, verleiht Ihnen meine Universität die allerhöchste Auszeichnung.

Per això i moltes coses que en una *laudatio* curta com aquesta no puc esmentar avui, vaig demanar a la Junta de la meva Facultat d'Odontologia que et proposés com a Doctor *Honoris Causa* i, atès que aquesta proposta fou unànimement acceptada i així mateix acol·lida després pel Consell de Govern de la Universitat de Barcelona, avui la meva universitat et concedeix la distinció més alta.

Moltes gràcies.
Vielen Dank

DISCURS DEL PROFESSOR
ROLAND BENZ

Bacterial Protein Toxins and Humans, Status and Perspectives

Rector Magnífic de la Universitat de Barcelona,
digníssimes autoritats,
professors i professores,
alumnes,
senyores i senyors,

La meua ignorància de la vostra llengua m'impedeix fer el meu parlament en català; tampoc no puc fer-lo en castellà i, per tant, m'ha semblat oportú triar l'anglès, que és una llengua més universalment coneguda que l'alemany.

Bacterial protein toxins represent virulence factors of bacteria. They are delivered to mammals, including humans, during the process of bacterial infection in the eukaryotic host. Bacterial toxins are the cause of many different diseases. Prominent examples are plague, typhoid fever, cholera and others, which over history have caused epidemics that have killed thousands of humans. These diseases should not be confused with viral infections such as smallpox or measles, which have also caused epidemics over the centuries, killing thousands of human beings. In the 17th century, bacterial epidemics killed more humans than the Thirty Years' War, which involved not only Germany, France and Sweden but also Spain and other European countries. This war laid waste to areas throughout Europe but particularly in Germany. But this was not the only century with thousands of people killed by plague or Black Death, caused by *Yersinia pestis*. The first plague pandemic probably began in Central Asia and spread to Europe by the middle of the 14th century. The infection was transmitted by rodents and fleas but also by direct contact between humans. The total number of deaths in Europe alone from the first pandemic is estimated at 20 million people. This means that the Black Death is estimated to have killed between a third and two-thirds of Europe's population. It is noteworthy that the first pandemic resulted in widespread persecution of minorities, in particular of the Jews, and pogroms were frequent. Throughout history we have knowledge of more than 100 plague epidemics sweeping across Europe until the 1700s. The strains that caused the different epidemics have been iden-

tified. After the 1700s the infections became rarer although even nowadays certain cases have been recorded, caused by close contact between humans and rodents. Virulence factors of *Yersinia* strains are the Yops, a class of bacterial protein toxins that are delivered from bacterial cells to eukaryotic cells during close contact by a special type of export system. This type III secretion/translocation system mediates secretion and injection of anti-host factors into eukaryotic cells via a contact dependent mechanism.

A bacterial infection of more modern times is Typhoid fever, also known as enteric fever. This is a disease caused by the bacterium *Salmonella enterica serovar typhi*. The infection is transmitted by the fecal-oral route, by food or water contaminated with feces from infected people. The bacteria reside first in the blood stream and then in the digestive tract, causing violent diarrhea that can lead to death. Although typhoid fever became more frequent after the accumulation of humans in big cities, combined with the lack of hygiene, it probably had a great impact in historical times as well. The Golden Age of Pericles and Athens ended around 430–426 B.C. because of an epidemic, a devastating plague, probably typhoid fever. This epidemic killed one third of the population of Athens, including their leader Pericles. Sparta became the master of Greece and Athens' dominance of the ancient world ended. The ancient historian Thucydides also suffered from the disease, but he survived to write about it. His writings describe this outbreak, which, according to medical scientists, was probably epidemic typhus. This supposition is supported by the poor public health conditions of the time, because the whole population of Attica was besieged inside the Long Walls. In the 19th century typhoid fever was, as already mentioned, very frequent because of the accumulation of humans in the big cities and the poor hygiene. There was a high mortality rate in big cities: for example in 1891 the typhoid death rate was 174 per 100,000 persons in Chicago. Other cities in Spain and Germany reported similar rates.

Another modern infectious disease is cholera, caused by the Gram-negative bacteria *Vibrio cholerae*. The virulence factor is cholera toxin, a bacterial protein, whose action on the small intestine is responsible for the characteristic massive diarrhea caused by the disease. In its most severe forms, cholera is one of the most rapidly fatal illnesses known: healthy persons may become hypotensive within an hour of the onset of symptoms and may die within 2-3 hours if no treatment is provided. Rehydration treatment is essential; other-

wise, the disease progresses from the first liquid stool to shock in 4-12 hours, with death following within days, sometimes within 18 hours. The origin of cholera is believed to be the Indian subcontinent, where rivers such as the Ganges as a contamination reservoir. In the 19th century it spread by trade routes (both land and sea) to Russia, then to Western Europe, and from Europe to North America. As many as 5 cholera pandemics occurred in the 19th century and routinely killed thousands of people in Europe, Russia and North America. The pandemic in the early 20th century had little effect in Europe and North America because of advances in public health, but Russia was badly affected again. Cholera is now no longer considered an issue in Europe and North America, due to the filtering and chlorination of the water supply.

Bacillus anthracis is a Gram-positive, facultatively anaerobic, rod-shaped bacterium of the genus *Bacillus*. This natural soil-dwelling organism is able to form endospores. Under conditions of environmental stress, *B. anthracis* bacteria naturally produce endospores which remain in the soil and can survive for decades in this state. When ingested by cattle, sheep, or other herbivores, the bacteria begin to reproduce inside the animal and eventually kill it, and then continue to reproduce in its carcass. Once the nutrients are exhausted, new endospores are produced and the cycle repeats itself. This means that *B. anthracis* was originally an animal disease. *B. anthracis* was the first bacterium conclusively demonstrated to cause disease, by Robert Koch in 1877. The species name *anthracis* is from the Greek *anthrakis*, meaning *coal* and referring to the most common form of the disease, cutaneous Anthrax, in which large black skin lesions are formed. Anthrax can be highly lethal for animals and human beings when they come into contact with endospores. The main virulence factor of *Bacillus anthracis* is the Anthrax toxin complex. The plasmid-encoded tripartite Anthrax toxin comprises a receptor-binding moiety termed protective antigen (PA), because antibodies against PA inhibit intoxication by Anthrax and two enzymatically active components, edema factor (EF) and lethal factor (LF). EF and LF act on intracellular targets. EF is a calcium and calmodulin-dependent adenylate-cyclase (89 kDa) which causes a dramatic increase in the intracellular cAMP level, altering water homeostasis and intracellular signaling. In addition, EF is believed to be responsible for the edema found in cutaneous Anthrax. LF is a highly specific zinc metalloprotease (90 kDa) which removes the N-terminal tail of mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs).

This cleavage initiates still poorly understood mechanisms leading to subsequent cell death of some types of macrophages and to the inhibition of the release from macrophages of pro-inflammatory mediators like nitric oxide, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . More recently, dendritic cells and T-cells have also been found to be inhibited by LF, and EF has been found to be a very effective inhibitor of T cell activation and proliferation. The monomeric Anthrax protective antigen (PA) is a cysteine-free 83 kDa protein which binds to a ubiquitously expressed integral membrane receptor (ATR). PA₈₃ bound to ATR is processed by a furin-like protease to a 63 kDa protein PA₆₃. The resulting 20 kDa fragment PA₂₀ dissociates from the receptor bound carboxy-terminal 63 kDa fragment and is released into the extracellular milieu. PA₆₃ then spontaneously oligomerizes on the cell surface into a heptamer and can bind up to three molecules of EF and/or LF with high affinity ($K_d \sim 1$ nM). The membrane bound complex of PA₆₃ is via clathrin-mediated endocytosis localized inside the endosomes together with bound LF and/or EF. Under the mildly acidic pH of the early endosomes, the heptameric PA₆₃ forms an ion-permeable membrane channel that plays an important but not yet fully understood role for the translocation of EF and LF into the cytoplasm at the stage of the late endosomes.

There exist many known strains of *B. anthracis*, ranging from highly virulent strains with possible applications in biological warfare and bioterrorism, to benign strains used for inoculations. The strains differ in the presence and activity of various genes, determining their virulence and production of antigens and toxins.

The use of bacteria and viruses in bioterrorism has been widely discussed. Possible candidates are smallpox, Anthrax and the intracellular active Gram-negative bacteria *Francisella tularensis*. Out of the possible candidates Anthrax has already been used, shortly after the cruel terrorist attack on the World Trade Center of September 11, 2001, which killed almost 4,000 people. The form associated with the 2001 Anthrax attacks in the United States produced both toxin (consisting of three proteins: the protective antigen, the edema factor and the lethal factor) and a capsule (consisting of a polymer of glutamic acid). Infection with Anthrax requires the presence of all three of these exotoxins. Investigation of this strain suggested that this attack, which killed some people who came in contact with the letters, was probably unrelated to Islamic terrorism because the strain was definitely from laboratories in the United States. The possible use of bio-

logical organisms for bioterrorism by Saddam Hussein was one of the reasons for the declaration of the war on Iraq in 2003. However, very careful investigation of the whole country after the war demonstrated that Saddam Hussein had neither atomic nor biological weapons.

Clostridium is a large genus of Gram-positive bacteria, belonging to the Firmicutes. These are obligate anaerobes capable of producing endospores. Individual cells are rod-shaped, which gives them their name, from the Greek *kloster* or spindle. These characteristics traditionally defined the genus, but they are not phylogenetically significant; many species originally classified as *Clostridium* have been reclassified in other genera. The genus *Clostridium* includes common free-living bacteria as well as important pathogens. There are four main species responsible for disease in humans, which all produce at least one bacterial protein toxin (and in many cases several) with high toxicity for animals and humans:

C. botulinum, an organism producing a toxin in food that causes botulism.

C. difficile, which can overgrow other bacteria in the gut during antibiotic therapy, causing pseudomembranous colitis.

C. perfringens causes a wide range of symptoms, from food poisoning to gas gangrene. Also responsible for enterotoxemia (also known as “overeating disease” or “pulpy kidney disease”) in sheep and goats.

C. tetani, the causative organism of tetanus (lockjaw).

The bacterial toxin proteins are exported out of the prokaryotic cells by different types of export systems. For their biological activity on the surface or inside the target cells they need receptors on the cell surface. Receptor recognition is always the first step in intoxication, followed by other processes such as insertion in the cytoplasmic membrane and transport into the cells. Some of the toxins such as the hemolysins of pathogenic enteric bacteria, alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus*, epsilon-toxin of *C. perfringens* and other bacterial toxin proteins act on the plasma membrane, increase its permeability and destroy ion gradients across the membrane. Others, such as clostridial toxins, Anthrax toxins and others exhibit their enzymatic activity, which leads to cell death inside the target cells. For this the toxins or part of them have to be transported through the membrane of the target cells. This process appears to be much simpler than protein transport across membranes such as the *sec*-dependent protein transport or TOM- or TIM-dependent transport processes of proteins

into mitochondria. The binding components are responsible for toxin transport across cytoplasmic membranes. These are either part of the long toxin molecules composed of transport and enzymatic units as in the case of adenylate cyclase toxin (ACT) of *Bordetella pertussis* causing whooping cough or of the large clostridial cytotoxins from *Clostridium difficile*, toxin A and toxin B. These are major virulence factors known to cause antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. Both toxins mono-glucosylate and thereby inactivate small GTPases of the Rho family.

Other bacterial toxin proteins consist of two separate components: an enzymatic A-moiety, and a B-moiety that is somehow involved in delivering the former to the target cell's cytosol, where it acts. The toxin binds through its B-component to a cell membrane receptor and is endocytosed; ultimately, its A-component is then transported across the membrane of an intracellular vesicle into the cytosol. In some cases (e.g., Anthrax toxin (*B. anthracis*), C2-toxin (*C. botulinum*), Iota toxin (*C. perfringens*), Vip toxin (*Bacillus thuringiensis*), diphtheria toxin (DTX) and botulinum toxin (BTX)), the B-component is directly involved in the process. This means that the translocation machinery for transport of the enzyme component is built into their B-portion, so that the A-portion can be translocated across membranes without the aid of any cellular components. A part of the B-portion of these self-translocating toxins forms channels in target cell membranes and planar lipid bilayer membranes at low pHs mimicking the conditions of acidic cellular vesicles such as the endosomes. Whether the channel is a conduit for the A-portion or is a "discarded wrapper" is not clear. Nor do we know a great deal about the structure of these channels.

Since the early 1990's we have been studying interaction of channel-forming toxins with artificial lipid bilayers and biological membranes. We were able to identify the channel-forming parts of a variety of bacterial toxin proteins such as ACT of *B. pertussis*, of alpha-hemolysin of *E. coli*, epsilon toxin of *C. perfringens* and Toxin A and B of *C. difficile*. Other toxins are under investigation. The major interest is the characterization of the channels with respect to the biological activity of the toxins. Similarly, we studied channel formation by B-moieties of AB-type of toxins and their interaction with the enzymatic components. The results of the investigation were that the B-portions first bind to a cell receptor. Proteases then cleave fragments from the N-terminal end of the B-components, which then oligomerize and thereby generate binding sites for the A-components.

The next step is given by endocytosis of the complexes. Upon acidification of the endosomes the A-components are able to leave them and exhibit their enzymatic activity in the cytosol, which finally leads to cell death. There exists the suspicion that in many cases one enzymatic component is sufficient to kill a eukaryotic cell, which means that many toxins have a high toxicity, making them interesting targets for bioterrorism attacks.

In a manner analogous to the B-portions of DTX and BTX, the B-moieties of other AB-toxins form channels in planar bilayers and biological membranes under mildly acidic conditions. The channels are formed by heptamers of the binding components. The structure shows a 14-stranded beta-barrel with a limiting diameter of around 1.2 nm and a length of about 1 nm. The channel has a big vestibule domain on one side of the membrane whereas the beta-barrel cylinder just ends at the opposite side. There are good reasons to believe that its structure resembles in many ways that of the channel formed by staphylococcal alpha hemolysin that has been crystallized, whereas the channel formed by the B-components is not known in its 3D-structure. However, many amino acid mutations introduced into the B-component of Anthrax toxin suggest that the working model of the protective antigen channel is basically correct. Binding studies with A-components (the enzymes) demonstrated that the channels are blocked with high affinity by the enzymatic components with half saturation constants in the nanomolar range. This block presumably represents the first step of translocation of the enzymatic components across the endosomal membrane, suggesting that the enzymes (A-components) with the N-terminal end in advance are transported through the channel formed by the B-components. The driving force for the transport could be the pH-gradient across the endosomes or the potential across the endosomal membrane caused by the acidification. Other mechanisms are also possible but the acidification of the endosomes is an essential step. Another essential step is the formation of channels by the B-components. Their inhibition by drugs completely blocks intoxication of target cells.

Studies of bacteria, which produce toxins and investigations of toxins themselves, are of great interest and present an interesting challenge in modern research. There exist many different fields of applications. One very important application is in biodefence against bioterrorism. As pointed out above, biological weapon attacks could cause catastrophic harm. They could inflict widespread injury and

result in massive casualties and economic disruption. These attacks could mimic naturally-occurring disease, potentially delaying recognition of an attack and creating uncertainty about whether one has even occurred. Possible biological weapons could be viruses such as Ebola, Lassa, Marburg and smallpox that could in part cause hemorrhagic fever. Of interest here are biological weapons based on bacterial infections. Examples are Anthrax, botulism, plague, *Francisella* and others. Biodefence involves medical measures to protect people against biological agents. This means medicines and vaccinations, and also means medical research and preparations to defend against bioterrorist attacks. The understanding of the mode of action of toxins and the study of intoxication of target cells is of great importance for this task. For instance, in recent years, we have been able to demonstrate that anti-malaria drugs like chloroquine and 4-aminoquinolones are able to block channels formed by the binding components of Anthrax (*B. anthracis*) and C2 toxin (*C. botulinum*). The same compounds are also able to block intoxication of cultured cells and mice. Based on these investigations it may be possible to find similar compounds that block intoxication by Anthrax and C2-toxin even more effectively. Similar considerations apply to type III export blockers. These molecules could completely prevent transfer of the virulence factors (Yops) from the cause of plague, *Y. pestis*, to the target cells. Another preventative mechanism of plague infection may be via inhibiting adhesion of the bacteria to the respiratory tract, which could also block delivery of the Yops.

The characterization of toxins may also offer new insights in effective vaccination. Adenylate cyclase toxin (ACT) from *B. pertussis* is a bi-functional molecule. The N-terminal part of the toxin contains the enzymatic AC domain which is transmitted directly across the cytoplasmic membrane of target cells, without the need for receptor-mediated endocytosis as in the case of many other toxins. The insertion of foreign epitopes in the AC domain of ACT leads to detoxified ACT constructs. Interestingly, these foreign epitopes are transported together with the AC domain across the membranes of target cells, which means that the foreign epitopes can be used for antigen delivery and major histocompatibility complex (MHC) class I presentation *in vitro* and *in vivo*. This leads to a short cut within the immune system, which may allow a novel and efficient type of vaccination using antigen-presenting cells with the recombinant ACT. Another possibility for the development of vaccines is based on virulence-attenuated bacteria. One of the strategies could be the creation of live

vaccines that deliver protective heterologous antigens directly into the antigen-presenting cells (APCs). This could be done by the use of type I export systems of enteric bacteria such as *Escherichia coli*. The export system is composed of several different proteins from inner (IM) and outer (OM) bacterial membranes. They form a 'tunnel' that links the IM and OM and allows the direct secretion of the exported proteins, such as hemolysin into the extracellular medium without the formation of periplasmic intermediates. The signal recognized by the type I secretion systems is localized at the carboxyl terminus of the secreted proteins. Interestingly, this system can be used to express and secrete heterologous proteins. The heterologous proteins can range in size from 20 amino acids to more than 1000 amino acids and can be derived from prokaryotes as well as eukaryotes. The secretion of heterologous proteins via the Type I secretion system can be applied to immunological and vaccine research similar to the situation described above for the use of ACT, which is also secreted by a type I secretion system. This means that the application of the type I secretion system allows the presentation of heterologous antigens in attenuated Gram-negative bacterial live vaccines.

Some of the bacterial protein toxins also allow other interesting medical applications. Botulinum toxin (BTX) produced by the bacterium *Clostridium botulinum* is one of the most poisonous naturally occurring substances in the world. It is a highly toxic neurotoxin that blocks neuromuscular transmission. It can be used in minute doses both to treat painful muscle spasms, and as a cosmetic treatment. The German physician and poet Justinus Kerner called botulinum toxin "sausage poison", or "Canadian bacon pathogen" as this bacterium often causes poisoning by growing in poorly handled or prepared meat products. He first conceived a possible therapeutic use of the botulinum toxin. In 1870, Müller (another German physician) coined the name botulism, from Latin *botulus* = "sausage". In 1895, Emile Van Ermengem first isolated the bacterium *Clostridium botulinum*. Botulinum toxin type A (BTX-A) is used to temporarily improve the appearance of moderate-to-severe frown lines between the eyebrows (glabellar lines). BTX-A has also been approved for the treatment of excessive underarm sweating. The acceptance of BTX-A use for the treatment of spasticity and muscle pain disorders is growing, with approvals pending in many European countries and studies on headaches (including migraine), prostatic symptoms, asthma, obesity and many other possible indications are ongoing. In general BTX-A is able to decrease muscle activity by blocking the release of acetyl-

choline at the neuromuscular junction, thereby rendering the muscle unable to contract for a period of 4 to 6 months. Applications are the used of small amounts of the toxin to treat crossed eyes and uncontrollable blinking. Other applications are migraine headaches and cervical dystonia (a neuromuscular disorder involving the head and neck), blepharospasm (involuntary contraction of the eye muscles). The use of BTX for cosmetic purpose showed also a strong increase in recent years. The injection of BTX-A represents nowadays the most common cosmetic operation in the United States.

Bacterial protein toxins might also be directed against cancer cells. In such cases, chimera proteins between the enzymatic moiety of the toxin and a receptor for surface structures on the surface of the cancer cells should be designed. Such a chimera toxin would be directed mainly at the cancer cells and would kill them. There exist several reports in the literature that this approach could be successful. This and other examples demonstrate the importance for future applications (both in medicine and in other fields) of basic research into the structure and function of bacterial protein toxins.

Voldria poder-me expressar amb eloquència, però la ciència forma homes llargs de feina i curts de paraules, de manera que només els diré moltes gràcies Rector Magnífic i moltes gràcies Claustre de la Universitat de Barcelona i Claustre de la Facultat d'Odontologia per aquest gran honor que em dispenseu.

I a tots vosaltres, gràcies per la vostra atenció.

Les toxines bacterianes proteiques i l'home: estatus i perspectives

Rector Magnífic de la Universitat de Barcelona,
digníssimes autoritats,
professors i professores,
alumnes,
senyores i senyors,

La meua ignorància de la vostra llengua m'impedeix fer el meu parlament en català; tampoc no puc fer-lo en castellà i, per tant, m'ha semblat oportú triar l'anglès, que és una llengua més universalment coneguda que l'alemany.

Les toxines bacterianes proteiques són factors de virulència dels bacteris. Són alliberades en els mamífers, inclòs l'home, en el decurs dels processos infecciosos causats pels bacteris en els hostes eucariotes. Les toxines bacterianes són la causa de diverses malalties. Alguns exemples ben coneguts són la pesta, les febres tifoides i el còlera, entre d'altres, que han causat al llarg de la història epidèmies que han provocat la mort de milers de persones. No s'han de confondre amb les infeccions víriques com la verola o d'altres que també han causat epidèmies amb el resultat de milers de morts. Les epidèmies bacterianes van matar en el segle XVII més persones que la Guerra dels Trenta Anys, en la qual hi foren implicats no solament Alemanya, França i Suècia, sinó també Espanya i altres països europeus. Aquesta guerra devastà extenses àrees a Europa i, particularment, a Alemanya. Però aquest segle no va ser pas l'únic en què milers de persones moriren a causa de la pesta bubònica o pesta negra causada per *Yersinia pestis*. La primera pandèmia de pesta probablement va començar a l'Àsia central i es va estendre per Europa a mitjan segle XIV. La infecció es transmetia a través dels rosegadors per les puces i també entre els humans. El nombre total de morts a Europa deguts exclusivament a aquesta primera pandèmia s'estima que fou d'uns 20 milions. Això vol dir que la pesta negra va eliminar entre una i dues terceres parts de la població europea. Cal destacar que aquesta primera pandèmia va comportar la persecució de minories, en particular dels jueus, i originà diversos pogroms. Al llarg de la història tenim coneixement de més de

100 epidèmies de pesta a Europa fins a l'any 1700. Fins i tot s'han identificat les soques bacterianes que causaren les successives epidèmies. Després de l'any 1700 les epidèmies foren menys freqüents, tot i que fins als nostres dies es descriuen casos esporàdics causats per contactes estrets entre humans i rosegadors. Els factors de virulència de *Yersinia pestis* són les YOP, una classe de proteïnes que són alliberades per les cèl·lules bacterianes i captades per les cèl·lules eucariotes quan ambdues es troben en contacte íntim a través d'un mecanisme especial d'exportació. Aquest sistema de secreció/translocació anomenat de tipus III permet la secreció i injecció de factors antihoste a les cèl·lules eucariotes per un mecanisme que depèn estrictament del contacte.

Una infecció bacteriana característica dels temps moderns és la febre tifoide, també coneguda com a febre entèrica. Aquesta és una malaltia causada pel bacteri *Salmonella enterica* serovar *typhi*. La infecció es transmet per la ruta fecal-oral, a través d'aliments o d'aigua contaminada amb matèria fecal procedent de persones infectades. El bacteri passa a la sang, on prolifera i torna a l'aparell digestiu, on causa una forta diarrea que pot dur a la mort. Tot i que la febre tifoide és més freqüent des que els homes viuen en aglomeracions i, particularment, en nivells higiènics baixos, possiblement va tenir gran impacte en la història. L'època daurada de Pèricles i Atenes fou probablement víctima d'una epidèmia devastadora (aproximadament entre 430 i 426 aC) que possiblement fou la febre tifoide. A causa d'aquesta epidèmia moriren una tercera part dels habitants d'Atenes, entre ells el seu dirigent, Pèricles. Esparta va començar a ser dominant a Grècia i la preponderància d'Atenes es perdé, la qual cosa va posar fi al món antic. El vell historiador Tucídides també patí la malaltia, però va sobreviure i pogué escriure sobre la plaga. Els seus escrits descriuen aquest episodi que, d'acord amb els científics especialistes, probablement va ser febre tifoide. L'escassa higiene pública d'una Àtica limitada per les seves grans muralles reforça aquesta idea. Com hem dit abans, les febres tifoides van ser molt freqüents en el segle XIX per l'acumulació d'humans en les grans ciutats i les poques condicions higièniques. Hi havia una elevada mortalitat a les ciutats grans, per exemple l'any 1891 la taxa de mortalitat per tifus a la ciutat de Chicago va ser de 174/100.000. Altres ciutats, incloses les grans ciutats d'Espanya i d'Alemanya, tingueren taxes similars.

Una altra malaltia moderna és el còlera, provocada pel bacteri gramnegatiu *Vibrio cholerae*. El factor de virulència és la toxina colè-

rica, una proteïna bacteriana que actua sobre l'intestí prim, on provoca una diarrea característica aguda. En les seves formes més greus el còlera és una de les malalties més ràpidament fatals d'entre les que es coneixen. Persones saludables poden patir hipotensió només una hora després de començar els símptomes i morir en dues o tres hores si no s'instauen tractaments. És essencial la rehidratació, en cas contrari la malaltia progressa, al principi amb femta líquida i posteriorment en forma de xoc (entre 4 i 12 hores), de manera que els malalts moren en un període d'entre 18 hores i alguns dies. L'origen del còlera possiblement és el subcontinent de l'Índia, que en rius com el Ganges hi tenen reservoris. En el segle XIX es va estendre com a conseqüència dels viatges per mar i terra cap a Rússia, i d'allà, a la resta d'Europa i a Amèrica del Nord. En el segle XIX coneixem fins a cinc pandèmies de còlera que sistemàticament foren la causa de mort de milers d'europeus, russos i nord-americans. La pandèmia del segle XX tingué pocs efectes a Europa gràcies a la millora de la salut pública, però Rússia en resultà molt perjudicada. El còlera ja no es considera un problema a Europa i Amèrica del Nord, gràcies a la filtració i cloració de les aigües.

Bacillus anthracis és un grampositiu, anaeròbic facultatiu, de forma bacil·lar del gènere *Bacillus*. Aquest habitant normal dels sòls pot produir endòspores. En condicions d'estrès ambiental el bacteri produeix normalment espores que queden en els sòls i poden sobreviure dècades. Quan són ingerides per vaques, ovelles o altres herbívors, els bacteris poden reproduir-se en l'animal i, fins i tot, produir-li la mort i continuar la seva reproducció en el cadàver. Una vegada s'esgoten els nutrients, el bacteri torna a produir espores i el cicle es repeteix. Això mostra com *B. anthracis* era originalment l'agent d'una malaltia animal. De fet, *B. anthracis* va ser el primer bacteri del qual es va demostrar d'una manera concloent que causava malaltia. Ho va demostrar Robert Koch l'any 1877. L'epítet específic *anthracis* ve del grec ἀνθράκισ, que vol dir 'carbó', referit a la forma més comuna de la malaltia, l'àntrax cutani (en català també carboncle), en la qual es formen grans lesions de color negre a la pell. L'àntrax pot ser letal per als animals i per a l'home quan aquests estan en contacte directe amb les espores. El principal factor de virulència de *Bacillus anthracis* és el complex anomenat toxina de l'àntrax. Els tres components de la toxina de l'àntrax, codificat en un plasmidi, inclouen una meitat lligada al receptor anomenada antigen de protecció (PA), ja que els anticossos anti-PA inhibeixen la intoxicació per àntrax, i dos components enzimàtics: el factor edematós (EF) i el factor letal (LF).

L'EF i l'LF actuen sobre dianes endocel·lulars. L'EF és una adenilcicla dependent de calci i de calmodulina de 89 kD de pes molecular, que provoca un dràstic increment dels nivells d'AMPc, cosa que altera l'homeòstasi i la transducció de senyals intracel·lulars. A més, es creu que l'EF és el responsable de l'edema que s'observa en l'àntrax cutani. L'LF és una metal·loproteasa de 90 kD altament específica que elimina l'extrem N-terminal de les proteïna-cinases activades per mitògens (MAPKK). L'acció d'aquest enzim inicia una sèrie de mecanismes, encara poc coneguts, que condueixen a la mort cel·lular d'alguns tipus de macròfags i a la inhibició de l'alliberament per part dels macròfags dels mediadors proinflamatoris com l'òxid nítric, el factor alfa de neurosi tumoral i la interleucina-1. Més recentment, s'ha trobat que l'LF també inhibeix cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T de manera molt efectiva, mentre que l'EF s'ha mostrat com un inhibidor molt efectiu d'activació i proliferació de cèl·lules T. L'antigen protector (PA) és una proteïna (de 83 kD) que no conté cisteïna i que s'uneix a un receptor de membrana ubic com és ATR. La unió entre PA₈₃ i ATR és tallada per una proteïna similar a la furina que genera una proteïna de 63 kD (PA₆₃). El fragment de 20 kD resultant (PA₂₀) se separa del receptor i s'allibera al medi extern. La PA₆₃ aleshores espontàniament s'oligomeritza en la superfície cel·lular i forma heptàmers i pot unir-se a fins a tres molècules d'EFR i/o d'LF amb gran afinitat (Kd ~1 nM). El complex lligat a membranes (unit a LF o EF) es localitza dintre dels endosomes, on arriba per processos d'endocitosi mediada per la via de la clatrina. Els heptàmers de PA₆₃ formen, en les condicions d'acidesa moderada que hi ha en els endosomes joves, un canal transmembranós permeable als ions que té un paper fonamental, que encara no comprenem del tot, per a la translocació d'EF i d'LF al citoplasma des dels endosomes madurs.

Es coneixen moltes soques de *B. anthracis* que van des de soques extremadament virulentes amb aplicacions com a armes biològiques o finalitats terroristes fins a soques benignes emprades en inoculacions. Les soques difereixen en la presència i activitat de diversos gens que determinen la seva virulència i en la producció d'antígens i toxines.

S'ha discutit molt sobre bacteris i virus i el seu possible ús pel bioterrorisme. Els possibles candidats, entre d'altres, són la verola, l'àntrax i el bacteri intracel·lular *Francisella tularensis*. Entre els possibles candidats, l'àntrax es va emprar breument després de l'atac cruel contra el World Trade Center l'11 de setembre de 2001, que va

matar unes 4.000 persones. La forma associada a aquest àntrax del 2001 era capaç de produir tant la toxina (consistent en les tres proteïnes: l'antigen de protecció, el factor edematós i el factor letal) com la càpsula (un polímer d'àcid glutàmic). La infecció per àntrax requereix la presència de les tres exotoxines. La recerca d'aquesta soca suggereix que l'atac que presumiblement va matar unes quantes persones que havien estat en estret contacte amb les cartes, no tenia cap connexió amb un atac per part de l'Islam, ja que la soca procedia sense cap mena de dubte de laboratoris dels Estats Units. El possible ús d'armes biològiques per dur a terme bioterrorisme per part de Saddam Hussein va ser una de les raons de la guerra contra l'Iraq l'any 2003. Però després, una recerca molt acurada a tot el país després de la guerra demostrà que Saddam Hussein no tenia ni armes biològiques ni tampoc atòmiques.

Clostridium és un ampli gènere de bacteris grampositius. Són anaerobis obligats i també capaços de produir endòspores. Les cèl·lules individuals són bacil·lars, d'on prenen el nom del grec κλωστερ o 'agulla'. Aquestes característiques tradicionalment han definit el gènere però no són pas significatives filogenèticament, de fet moltes espècies originalment classificades com a *Clostridium* han estat reclassificades en altres gèneres. El gènere *Clostridium* inclou bacteris de vida lliure molt comuns, així com patògens molt importants. Hi ha quatre espècies principals responsables de malalties en humans, totes produeixen almenys una proteïna tòxica i en molts casos diverses:

- *C. botulinum*, un organisme que produeix una toxina en els aliments que causa el botulisme.
- *C. difficile*, que pot créixer sobre altres bacteris intestinals a causa de la teràpia amb antibiòtics i causar la colitis pseudomembranosa.
- *C. perfringens*, bacteri que provoca un ampli ventall de símptomes, des d'enverinament d'aliments fins a la gangrena gasosa. També és responsable de l'enterotoxèmia en animals.
- *C. tetani*, que és l'agent causal del tètan.

Les toxines bacterianes proteiques són exportades fora de la cèl·lula procariota per diferents tipus de sistemes d'exportació. Per a la seva activitat biològica en la superfície o dintre de les cèl·lules diana necessiten un receptor en la superfície cel·lular. El reconeixement del receptor sempre és la primera etapa de la intoxicació, seguida per altres processos, com són la inserció en la membrana del

citoplasma i el transport dintre de la cèl·lula. Algunes toxines, com les hemolisines dels enterobacteris patògens, l'hemolisina alfa de *Staphylococcus aureus*, la toxina èpsilon de *C. perfringens* i d'altres, actuen en la membrana plasmàtica, incrementen la seva permeabilitat i destrueixen els gradients iònics que hi ha entre les cares de les membranes. Altres, com les toxines clostridials, la toxina de l'àntrax i altres mostren la seva capacitat enzimàtica que condueix a la mort cel·lular des de l'interior de les cèl·lules. Perquè això passi, les toxines, o almenys una part, s'han de transportar a l'interior a través de la membrana. Aquest procés sembla molt senzill en comparació dels mecanismes coneguts de transport de proteïnes a través de les membranes com els dependents de *sec*, TOM o TIM. Els responsables del transport de toxines a través de la membrana citoplasmàtica són els components d'unió. O bé són part de molècules de toxina llargues compostes d'unitats de transport i enzimàtiques com en el cas de l'adenilat ciclase de *Bordetella pertussis*, que causa la tos ferina, o bé de les grans citotoxines (A i B) de *Clostridium difficile*, que són factors de virulència de més importància que sabem que causen diarrea associada als antibiòtics i colitis pseudomembranosa. Ambdues toxines monoglicosilèniques, de vegades inactives, les petites GTPases de la família Rho.

Altres proteïnes tòxiques bacterianes consisteixen en dos components: una meitat enzimàtica A i una altra meitat d'alguna forma implicada en el lliurament de A en el citosol de la cèl·lula diana en la qual ha d'actuar. La toxina s'uneix a través del seu component B al receptor en la membrana de la cèl·lula susceptible i entra per endocitosi; posteriorment, el seu component A és transportat a través de la membrana d'una vesícula intracel·lular cap al citosol. En alguns casos, per exemple en la toxina de l'àntrax (*B. anthracis*), la toxina C2 (*C. botulinum*), la toxina iota (*C. perfringens*), la toxina VIP (*B. thuringensis*), la toxina diftèrica (*C. diphtheriae*) i la toxina botulínica, el component B està implicat directament en el procés. Això vol dir que la maquinària de translocació per al transport del component enzimàtic es localitza a la porció B, de manera que la porció A pot ser translocada a través de la membrana sense l'ajut de components cel·lulars. Una part de la porció B d'aquestes toxines «autotranslocables» formen canals en les membranes de les cèl·lules diana i en bicapes lipídiques negres artificials a baixos pH que imiten les condicions àcides de vesícules com els endosomes. Encara no està clar si el canal és un conducte perquè la porció A o la seva part «descartada» passin. Tampoc no és gens coneguda l'estructura d'aquests canals.

Des del principi dels noranta estem estudiant les toxines que formen canals a la membrana mitjançant bicapes lipídiques i membranes biològiques. Hem pogut identificar les parts que formen canals d'un ventall de toxines com la toxina ACT de *B. pertussis*, l'hemolisina alfa d'*E. coli*, la toxina èpsilon de *C. perfringens* i les toxines A i B de *C. difficile*. En l'actualitat s'estan investigant altres toxines. El principal interès resideix en la caracterització dels canals i la seva relació amb l'activitat biològica de les toxines. De manera similar estudiem la formació de canals per les meitats B de les toxines de tipus AB que és seguida de la interacció amb els components enzimàtics. Els resultats d'aquesta recerca mostren que les meitats B s'uneixen primer a un receptor cel·lular. Les proteases aleshores tallen fragments de l'extrem N-terminal dels components B que formen oligòmers i d'aquesta manera originen punts d'unió per als components A. L'etapa següent és l'endocitosi dels complexos. En les condicions àcides dels endosomes els components A poden abandonar-los i desenvolupar la seva acció enzimàtica al citosol, que finalment conduirà a la mort cel·lular. Tenim la sospita que en molts casos una única molècula és suficient per matar una cèl·lula, cosa que fa que aquestes toxines siguin molt «interessants» en atacs bioterroristes.

De manera anàloga, les porcions B de DTX i BTX, les meitats B d'altres toxines AB formen canals en bicapes lipídiques negres i en membranes biològiques quan hi ha condicions dèbilment àcides. Els canals els formen heptàmers dels components d'unió. En realitat representen configuracions en barril de 14 làmines β que limiten el diàmetre d'aproximadament 1,2 nm i una longitud d'1 nm. Els canals tenen un domini «vestíbul» en una cara de la membrana mentre que el β -barril s'obre just en l'extrem oposat. Hi ha bones raons per creure que la seva estructura s'assembla a la dels canals formats per l'hemolisina alfa de l'estafilococ que ja ha estat cristal·litzada. Per contra, no sabem res de l'estructura tridimensional del canal format pels components B. Però moltes mutacions que s'han introduït en el component B de la toxina de l'àntrax suggereixen que el model de canal de l'agent protector és bàsicament correcte. Estudis de les unions amb els components A (els enzims) demostren que els canals estan bloquejats i tenen una alta afinitat pel component enzimàtic amb constants de semisaturació en el rang nanomolar. Aquest bloqueig constitueix molt possiblement la primera etapa de la translocació dels enzims a través de la membrana de l'endosoma, que suggereix que els enzims (components A) amb l'extrem N-terminal per davant són transportats

a través del canal format pels components B. La força per dur a terme el transport pot ser el gradient de pH o el potencial de membrana dels endosomes causat per la diferència de pH (acidificació). Encara que no es poden descartar altres mecanismes, l'acidificació és una condició necessària. També és essencial la formació de canals pels components B. La seva inhibició per drogues bloqueja completament la intoxicació de les cèl·lules diana.

Els estudis fets amb bacteris que produeixen toxines i investigacions sobre les mateixes toxines tenen gran interès i presenten un desafiament en la recerca moderna, a més tenen diversos camps d'aplicació. Una aplicació important és la biodefensa davant del bioterrorisme. Com hem dit abans, atacs amb armes biològiques podrien causar danys catastròfics. Podrien originar perjudicis molt extensos i en conseqüència afectar enormes grups de víctimes amb les subsegüents conseqüències econòmiques. Aquests atacs podrien assemblar-se molt a una epidèmia natural, potencialment podríem no saber que es tracta d'un atac i, per tant, hi podria haver incertesa sobre el que està passant. Els virus d'Ebola, de Lassa, de Marburg i de la verola són possibles candidats per a armes biològiques, però avui tractem de les armes biològiques basades en infeccions bacterianes. Els exemples són l'àntrax, el botulisme, la pesta, *Francisella* i altres. La biodefensa fa necessàries mesures mèdiques per protegir la població davant d'aquests agents biològics. Això vol dir medecines i vacunes. I també vol dir recerca mèdica i preparació per defensar-se davant dels atacs bioterroristes si arribessin. El coneixement del mode d'acció de les toxines i l'estudi de la intoxicació de les cèl·lules diana és molt important en aquesta tasca. D'antuvi hem pogut demostrar en els darrers anys que els fàrmacs contra la malària com la cloroquina i les 4-aminoquinolones poden bloquejar canals formats pels components de la toxina de l'àntrax (*B. anthracis*) i la toxina C2 (*C. botulinum*). Els mateixos compostos també bloquegen la intoxicació de cèl·lules en cultiu i de ratolins. D'acord amb aquestes investigacions, pot fer-se possible trobar compostos similars que puguin bloquejar fins i tot més efectivament la intoxicació per àntrax o per C2. De manera similar es poden explorar bloquejadors de l'exportació de tipus III. Aquestes molècules podrien prevenir completament la transferència dels factors de virulència (YOP) que causen la pesta a les cèl·lules diana. Un altre mecanisme preventiu de la pesta podria ser mitjançant la inhibició de l'adhesió dels bacteris al tracte respiratori, la qual cosa inhibiria també l'alliberació dels YOP.

La caracterització de les toxines també pot aportar nous elements en la vacunació efectiva. L'adenilciclase (ACT) de *Bordetella pertussis* és una molècula bifuncional. La part N-terminal de la toxina conté el domini enzimàtic AC que es transmet directament a través de la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules diana, sense necessitat de l'endocitosi mediada per un receptor, a diferència del que passa amb les altres toxines. La inserció d'epítops forasters en el domini AC o ACT provoca ACT atòxics. Curiosament els antígens estranys són transportats juntament amb l'AC a través de les membranes de les cèl·lules diana, la qual cosa significa que els epítops poden ser emprats per introduir antígens o el complex d'histocompatibilitat (MHC), per exemple. Això permet un curtcircuit en el sistema immunitari que pot permetre un nou i eficient tipus de vacuna utilitzant cèl·lules per presentar els antígens amb els ACT recombinants. Una altra possibilitat per al desenvolupament de vacunes es basa en els bacteris atenuats. Una de les estratègies pot ser la creació de vacunes vives que incorporin els antígens protectors heteròlegs directament a les cèl·lules presentadores (APC). Això es pot fer emprant sistemes d'exportació de tipus I de bacteris entèrics com *E. coli*. El sistema d'exportació està format per diverses proteïnes de la membrana interna (IM) i també de la membrana externa (OM). Formen un túnel que uneix la IM i l'OM i permet la secreció directa de les proteïnes exportades, com ara l'hemoïisina, al medi extern sense necessitat que es formin intermediaris plasmàtics. El senyal reconegut pel tipus I de secreció es localitza en l'extrem carboxiterminal de les proteïnes secretades. És interessant que aquest sistema es pot emprar per expressar i secretar proteïnes heteròlogues. Aquestes proteïnes poden estar formades per una quantitat molt variable d'aminoàcids, des de 20 fins a més de 1.000, i poden tenir tant origen procariota com eucariota. La secreció de proteïnes heteròlogues via el tipus I pot aplicar-se a recerca immunològica i sobre vacunes de manera similar a la que hem descrit en el cas de les ACT, que de fet també és secretat per un tipus I. Això significa que l'aplicació del sistema de secreció de tipus I permet la presentació d'antígens heteròlegs en vacunes vives formades per bacteris atenuats gramnegatius.

Algunes proteïnes bacterianes tòxiques són base d'altres aplicacions mèdiques. La toxina botulínica (BTX) produïda pel bacteri *C. botulinum* és una de les substàncies naturals més verinoses. És una neurotoxina que bloqueja la transmissió neuromuscular. Pot ser emprada en dosis diminutes per tractar dolors espasmòdics i com a tractament cosmètic. El metge alemany i poeta Justinus Kerner va

anomenar la toxina botulínica «el verí de les salsitxes» o «el patògen de la cansalada canadenc», ja que aquest bacteri freqüentment causa enverinament quan creix en productes carnis manipulats en males condicions. Va ser el primer que va concebre una possible aplicació terapèutica de la toxina botulínica. L'any 1870 Muller (un altre metge alemany) va encunyar el terme *botulisme* (del llatí *botulus*, 'salsitxa'). L'any 1895 Emile van Ermengem va aïllar per primera vegada el bacteri *Clostridium botulinum*. La toxina botulínica de tipus A (BTX-A) s'empra per millorar temporalment l'aspecte de les arrugues a la cara i també ha estat acceptada per al tractament de la sudoració excessiva. La BTX-A també s'utilitza cada vegada més per al tractament d'espasmes i desordres musculars i, malgrat que en moltes vegades encara estan pendents d'aprovació, en molts països d'Europa s'estudia el seu ús en el tractament de migranyes, símptomes prostàtics, asma, obesitat i altres aplicacions possibles. En general, la BTX-A disminueix el to muscular bloquejant l'acció de l'acetilcolina en les unions neuromusculars i, per tant, impeding que el múscul es contragui durant 4-6 mesos. S'apliquen per combatre l'estrabisme i en altres alteracions com distonia cervical (una afecció neuromuscular que afecta el coll i la regió nasal) i blefarospasme (contracció involuntària dels músculs de l'ull). L'ús de BTX amb finalitats cosmètiques també augmenta. Avui en dia la injecció de BTX és l'operació cosmètica més freqüent als Estats Units.

Altres possibles aplicacions mèdiques de les proteïnes bacterianes tòxiques pot ser la de dirigir-les contra cèl·lules canceroses. En aquest cas, s'ha de dissenyar una proteïna quimera entre la meitat enzimàtica de la toxina i un receptor de les estructures de superfície de les cèl·lules de càncer. Aquesta toxina es dirigiria preferentment a les cèl·lules canceroses i les eliminaria. Hi ha diverses publicacions a la literatura que assenyalen aquesta possibilitat com a molt real. Aquest i altres exemples demostren fins a quin punt és important per a futures aplicacions, mèdiques o no, la recerca bàsica sobre l'estructura i la funció de les proteïnes bacterianes amb activitat tòxica.

Voldria poder-me expressar amb eloqüència, però la ciència forma homes llargs de feina i curts de paraules, de manera que només els diré moltes gràcies Rector Magnífic i moltes gràcies Claustre de la Universitat de Barcelona i Claustre de la Facultat d'Odontologia per aquest gran honor que em dispenseu.

I a tots vosaltres, gràcies per la vostra atenció.