Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Anna Lepesheva

Mechanismus interakce bakteriálních toxinů zvyšujících vnitrobuněčné cAMP s hostitelskou buňkou

Mechanism of action of bacterial toxins elevating the cAMP in host cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Mašín, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 25.05.2020 ……

Anna Lepesheva

Poděkování:

Nejprve bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce RNDr. Jiřímu Mašínovi Ph.D. za čas, který mi věnoval a také za jeho trpělivost a užitečné připomínky. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Peteru Šebovi za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR.

Abstrakt

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) je univerzálním druhým poslem, který reguluje velké množství molekulárních mechanismů uvnitř buňky. Hladina syntetizovaného cAMP je přísně regulována vnitrobuněčnou adenylátcyklázou (AC), a proto tento enzym často představuje cíl pro různé bakteriální toxiny. Pro manipulaci s hladinou vnitrobuněčného cAMP v cílové buňce vyvinuly bakterie pro své toxiny dvě odlišné strategie. Adenylátcyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*, edemogenní faktor (EF) bakterie *Bacillus anthracis* a ExotoxinY bakterie *Pseudomonas aeruginosa* mají ve své struktuře enzymatickou AC doménu, která má po aktivaci intracelulárním kofaktorem několikrát vyšší aktivitu než vlastní eukaryotní adenylátcykláza, nacházející se uvnitř hostitelské buňky. Jiné toxiny, jako pertusový toxin (PT) bakterie *Bordetella pertussis*, cholerový toxin (CT) bakterie *Vibrio cholerae* a tepelně labilní toxin bakterie *Escherichia coli* využívají ADP-ribosylaci heterotrimerních G proteinů spřažených s vnitrobuněčnou AC pro zvýšení její aktivity a následnou nekontrolovanou produkci cAMP. Tato práce představuje literární rešerši uvedených toxinů s důrazem na jejich molekulární mechanizmy interakce s hostitelskou buňkou.

Klíčová slova: pathogenní bakterie, faktory virulence, vnitrobuněčná hladina cAMP, bakteriální toxiny, adenylátcykláza, *Bordetella pertussis, Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*

Abstract

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is an universal second messenger that regulates a large number of molecular mechanisms inside the eukaryotic cell. The level of synthesized cAMP is tightly regulated by endogenous adenylatecyclase (AC), and therefore this enzyme is often a target for various bacterial toxins. To manipulate intracellular cAMP levels in a target cell, bacteria have developed two different strategies for their toxins. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin (CyaA*), Bacillus anthracis* edema factor (EF) and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxinY have in their structure an enzymatic AC domain which is activated by an intracellular cofactor and has several times higher activity than the eukaryotic AC enzyme itself. Other toxins, such as *Bordetella pertussis* pertussis toxin (PT), *Vibrio cholerae* cholera toxin (CT), and *Escherichia coli* heat labile toxin use ADP-ribosylation reaction of AC-coupled heterotrimeric G proteins to increase its activity and uncontrolled cAMP production. This work presents a literature search with accent on the molecular mechanism of interaction of these toxins with the target cell.

Keywords: bacterial pathogens, virulence factors, intracellular cAMP elevation, bacterial toxins, adenylatecyclase (adenylylcyclase), *Bordetella pertussis, Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*

Seznam použitých zkratek

ABC	ATP-vazebná kazeta	ATP-binding cassette
AC	Adenylátcykláza	Adenylatecyclase
ADF	Faktor způsobující depolymerizaci aktinu	Actin depolymerizing factor
ADP	Adenosindifosfát ribóza	Adenosine diphosphate ribose
ANTXR1	Receptor anthraxového toxinu 1	Anthrax toxin receptor 1
ANTXR2	Receptor anthraxového toxinu 2	Anthrax toxin receptor 2
AP-1	Aktivační protein 1	Activator protein 1
ARF	ADP-ribosylační faktor	ADP ribosylation factor
ATP	Adenosintrifosfát	Adenosine triphosphate
CaM	Kalmodulin	Calcium-modulated protein
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát	Cyclic adenosine monophosphate
CD11b/CD18	Integrin, receptor CyaA toxinu známý také jako $\alpha_M\beta_2$,**Mac-1** nebo CR3	Integrin **αMβ2** or Macrophage-1-integrin or **Mac-1** or CR3
CFTR	Transmembránový regulátor cystické fibrózy	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMG2	Protein kapilární morfogeneze-2	Capillary morphogenesis protein 2
CR3	Komplementový receptor 3	Complement receptor 3
CT	Choleratoxin	Cholera toxin
CyaA,AC-Hly,ACT	Adenylátcyklázový toxin	Adenylate cyclase toxin
CyaC	Acyltransferáza aktivující **CyaA**	Acyltransferase of **CyaA**
CyaBDE	Proteiny tvořící sekreční aparát typu I	**T1SS** proteins of **CyaA**
Da	Dalton	Dalton
Gαi	α podjednotka Gi/Go proteinu	alpha subunit of Gi /Go protein
Gi/Go	Inhibiční heterotrimérní G-protein	Inhibitional heterotrimeric G protein
GM1	Monosialogangliozid	Monosialotetrahexosylganglioside
GPCR	Receptor spřažený s G proteiny	G protein-coupled receptor
EF	Edemogenní faktor anthraxu	Anthrax edema factor
ER	Endoplazmatické retikulum	Endoplasmic reticulum

ERAD	Degradace spojená s endoplazmatickým retikulem	Endoplasmic reticulum associated degradation
ETEC	Enterotoxigenní *Escherichia coli*	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
HD	Doména tvořená helixy	Helical domain
HLTs	Tepelně labilní toxiny	Heat-Labile enteroToxins
Hsp90	Protein tepelného šoku 90	Heat shock protein 90
ILV	Vnitrobuněčný váček	Intraluminal vesicle
KDEL	Sekvence aminokyselin lysin (K), kyselina asparagová (D), kyselina glutamová (E), leucin (L)	Sequence of amino acids Lysine (K), Aspartic acid (D), Glutamic acid (E), Leucine (L)
LF	Letální faktor anthraxu	Anthrax Lethal Factor
MARTX	Multifunkční **RTX** toxiny	Multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin
MFP	Membránový fúzní protein	Membrane fusion protein
NAD+	Nikotinamidadenindinukleotid	Nicotinamide adenine dinucleotide
NMR	Nukleární magnetická resonance	Nuclear magnetic resonance
PA	Protektivní antigen anthraxu	Anthrax protective antigene
PABD	PA vazebná doména	PA-binding domain
PAK	Protein kináza A	Protein kinase A
PDI	Proteinová disulfidizomeráza	Protein disulfide isomerase
PPI	Peptidylprolyl cis-trans-izomeráza	Peptidyl prolyl cis-trans-isomerase
PT/PTX		Pertussis toxin
RTX	Pertusový toxin	Repeats in toxin
Src	Tyrosinkináza rodiny Src	Tyrosine-protein kinase Src
SEC61	Proteiny, které se účastní na stavbě translokonu	The core component of the translocon
T1SS	Sekreční systém typu 1	Type I secretion system
T2SS	Sekreční systém typu 2	Type II secretion system
T3SS	Sekreční systém typu 3	Type III secretion system
TEM8	Nádorový endoteliální marker-8	Tumor Endothelial Marker 8
TR	Translokační oblast	Translocation region

Obsah

1 Úvod **1**

2 Rodina adenylátcyklázových toxinů **2**

2.1 **Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertusis*** **2**

2.1.1 Struktura CyaA 3

2.1.2 Aktivace CyaA 4

2.1.3 Sekrece toxinu z bakteriální buňky 4

2.1.4 Počáteční interakce s membránou 5

2.1.5 Translokace AC domény a tvorba pórů 6

2.1.6 Interakce s kalmodulinem 7

2.1.7 Účinek zvýšené hladiny vnitrobuněčného cAMP na hostitelskou buňku 8

2.2 Edemogenní (edema) faktor bakterie *Bacillus anthracis* **8**

2.2.1 Složky a receptory anthraxového toxinu 9

2.2.2 Buněčný vstup a endocytóza 9

2.2.3 Aktivace edemogenního faktoru 12

2.3 Exoenzym Y bakterie *Pseudomonas aeruginosa* **13**

2.3.1 Efektorové proteiny typu 3 13

2.3.2 Interakce s aktinem 14

3 Rodina ADP-ribosylačních toxinů **16**

3.1 Pertusový toxin **16**

3.1.1 Vstup pertusového toxinu do hostitelské buňky 17

3.1.2 ADP-ribosylační reakce 18

3.2 Tepelně-labilní enterotoxiny *E.coli* a *Vibrio cholerae* **20**

3.2.1 Proniknutí do cílové buňky 21

3.2.2 Aktivace enzymatické reakce 21

4 Závěr **23**

5 Seznam použité literatury **24**

1 Úvod

Cyklický adenosin monofosfát (3', 5'-cyklický adenosin monofosfát), známý také jako cyklický AMP nebo cAMP, je důležitým vnitrobuněčným druhým poslem a molekulou působící kaskádu událostí, které ovlivňují buněčné funkce různých forem života, včetně savců, hub, prvoků a bakterií. Metabolismus, regulace exprese genů, regulace růstových faktorů a imunitních funkcí jsou příklady mnoha biologických procesů, které závisí na vnitrobuněčné hladině cAMP (McDonough and Rodriguez, 2011). Různorodé rodiny vnitrobuněčných adenylátcyklás (AC) přísně regulují syntézu cAMP v buňkách, a proto tyto enzymy jsou cílem mnoha bakteriálních faktorů virulence.

Jedním z možných mechanismů zvýšení hladiny cAMP v hostiteli je produkce určitých typů toxinů patogenními bakteriemi. Narušením regulace vnitrobuněčné adenylátcyklázy tyto toxiny mění hladinu vnitrobuněčného cAMP, a tím narušují metabolismus a funkci cílových buněk (Ahuja, Kumar and Bhatnagar, 2004).

Strategie patogenních bakterií produkujících toxiny zvyšující hladinu cAMP v cílových buňkách lze rozdělit do dvou skupin:

1. Produkce toxinů, které mají aktivitu adenylátcyklázy. Patří sem adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, edmogenní faktor bakterie *Bacillus anthracis* a ExoY bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Ahuja, Kumar and Bhatnagar, 2004).

2. Produkce toxinů, které regulují aktivitu endogenní savčí adenylátcyklázy ADP-ribosylací heterotrimerního G proteinu tak, aby se zvýšila hladina vnitrobuněčného cAMP. Do této skupiny patří pertusový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, cholerový toxin bakterie *Vibrio cholerae* a tepelně labilní toxin bakterie *Escherichia coli* (Kato, 1991).

Tato práce vznikla za účelem porovnání toxinů *B. pertussis* s jinými bakteriálními toxiny, které umí zvyšovat množství vnitrobuněčného cAMP v hostitelské buňce. Tato práce je zaměřena na molekulární mechanismy interakce těchto toxinů s cílovou buňkou: způsob proniknutí přes eukaryotickou plazmatickou membránu, interakce s receptory, cesta do cytosolu cílové buňky a mechanismus regulace adenylátcyklázy.

2 Rodina adenylátcyklázových toxinů

Tyto toxiny po sekreci příslušnou bakterií vstupují do cílových buněk a jejich enzymatická podjednotka je aktivována eukaryotickými kofaktory, za účelem spuštění syntézy cAMP v těchto buňkách. Byly identifikovány čtyři toxiny s enzymatickou aktivitou: adenylátcykláza bakterie *Bordetella pertussis*, edemogenní faktor bakterie *Bacillus anthracis*, ExoY bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a adenylátcykláza bakterie *Yersinia pestis* (Ahuja, Kumar and Bhatnagar, 2004). Mechanismus působení adenylácyklázy bakterie *Yersinia pestis* není doposud nijak popsáno, existuje pouze vyřešená krystalová struktura (Smith *et al.*, 2006), a proto nebude dále zmiňována v této práci.

2.1 Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertusis*

Adenylátcyklázový toxin (CyaA, AC-Hly nebo ACT) je spolu s pertusovým toxinem (PT) jedním z hlavních faktorů virulence gramnegativní patogenní bakterie *Bordetella pertussis*, původce závažného onemocnění dýchacích cest zvané černý kašel (Melvin *et al.*, 2014). CyaA hraje klíčovou roli v raných stádiích kolonizace dýchacích cest *B. pertussis* a jeví se jako klíčový mechanismus obrany bakterie proti vrozené imunitní odpovědi organismu (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006; Carbonetti, 2010).

B. pertussis je přenášena kapénkovou infekcí a infikuje řasinkový epitel dýchacích cest (Melvin *et al.*, 2014). Bakterie postihuje lidi všech věkových skupin, ale je akutní a fatální zejména pro malé děti, u nichž vyvolává závažné komplikace včetně pneumonie a někdy i výraznou leukocytózu (Rocha *et al.*, 2015).

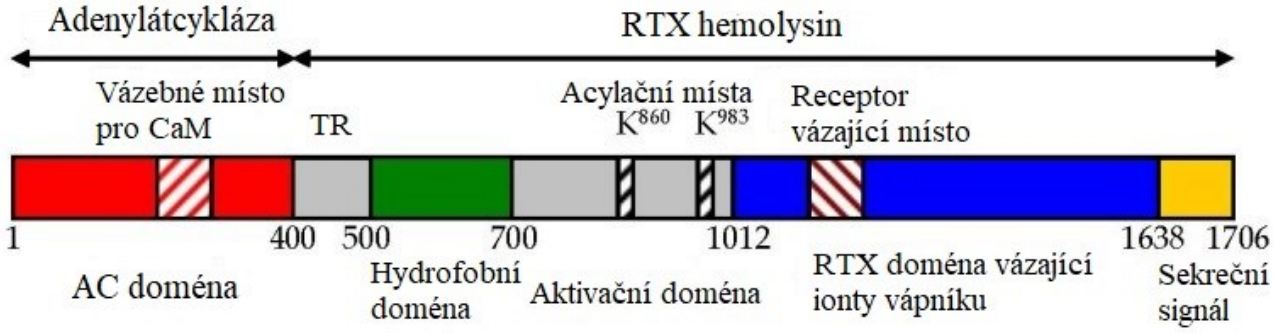
Odhaduje se, že černý kašel celosvětově způsobuje kolem 200 000 úmrtí ročně (kolem 50 procent z nich jsou kojenci do 1 roku). Například v roce 2014 bylo hlášeno více než 24 milionů nových případů u dětí mladších 5 let (Yeung *et al.*, 2017), a to navzdory širokému používání vakcín. Přestože se výskyt černého kašle od prvního zavedení vakcín dramaticky snížil, zůstává onemocnění jedním z hlavních globálních problémů v oblasti veřejného zdraví, většinou v rozvojových zemích. Překvapivě však prevalence onemocnění roste v západních zemích, zejména od konce 90. let po přechodu od celobuněčných vakcín první generace k bezbuněčným vakcínám nové generace. Používání účinných celobuněčných vakcín však bylo přerušeno kvůli obavám o jejich bezpečnost a v současnosti používané bezbuněčné vakcíny poskytují relativně neúčinnou a krátkodobou imunitu (přehled v (Solans and Locht, 2018)). Z tohoto důvodu se v současné době diskutuje o vývoji nových vakcín a očkovacích strategiích (Carbonetti, 2016).

Výsledky nashromážděné během posledních dvou desetiletí prokázaly, že geneticky detoxifikovaný CyaA toxoid je mimo jiné vysoce účinným a univerzálním dopravcem cizorodých antigenů, který je schopen indukovat všechny složky imunitní odpovědi. Potenciál tohoto vektoru byl

dobře prokázán na různých zvířecích modelech a byl také nedávno hodnocen u lidí v klinických studiích imunoterapie rakoviny děložního čípku (přehled v (Chenal and Ladant, 2018)).

2.1.1 Struktura CyaA

CyaA patří do velké rodiny tzv. RTX (z *Repeats in ToXin*) toxinů, pro které je společným znakem přítomnost RTX domény. CyaA o celkové délce 1706 aminokyselin se liší od ostatních členů rodiny RTX toxinů tím, že kromě C-koncové části (tzv. RTX hemolysinu) o délce ~ 1300 aminokyselin má na N-konci enzymatickou adenylátcyklázovou doménu (AC) o délce ~ 400 aminokyselin (Ladant and Ullmann, 1999) (obrázek 1). Tyto dvě části spojuje unikátní segment o délce ~ 100 aminokyselinových zbytků (Subrini *et al.*, 2013; Novak *et al.*, 2017; Voegele *et al.*, 2017). Tato doména reguluje obě aktivity toxinu: translokaci enzymatické AC domény přes cílovou membránu stejně jako tvorbu pórů v cílové membráně (Karst *et al.*, 2012; Subrini *et al.*, 2013; Ostolaza *et al.*, 2019).



Obrázek 1: Schematická struktura CyaA. CyaA polypeptid se skládá z 1706 aminokyselinových zbytků. N-koncová část sestává z enzymatické adenylátcyklázové (AC) domény (cca 400 zbytků), ve které se nachází vazebné místo pro kalmodulin (CaM). Za spojení s RTX hemolysinovou (Hly) částí (cca 1300 zbytků) zodpovídá segment, někdy také označovaný jako translokační oblast (TR). Hly část obsahuje několik funkčních subdomén: hydrofobní doménu vytvářející póry (zbytky 500 až 700); aktivační doménu (zbytky 800–1000), kde nastává posttranslační acylace na dvou zbytcích lysinu (K860 a K983); typická doména RTX vázající vápník (pozice 1012–1638) se segmentem vázajícím receptor CD11b / CD18; a sekreční signál na C-konci. Převzato a pozměněno podle (Novak *et al.*, 2017).

Samotná RTX hemolysinová (Hly) část CyaA se skládá z několika domén a každá z nich zprostředkovává důležité funkce v interakci celého toxinu s hostitelskou buňkou:

1. **Translokační oblast** (TR, angl. translocation region) je umístěná bezprostředně za katalytickou doménou a hraje klíčovou roli v translokaci AC domény přes plazmatickou membránu cílových buněk. Peptid mezi zbytky 454–484 vykazuje membránově aktivní vlastnosti a bylo ukázáno, že může být přímo zapojen do místní destabilizace lipidové dvojvrstvy pro podporu translokace katalytické domény přes plazmatickou membránu (Karst *et al.*, 2012; Voegele *et al.*, 2017). Struktura celého segmentu v přítomnosti detergentu byla nedávno vyřešena pomocí nukleární magnetické rezonance (Sukova *et al.*, 2020).

2. **Hydrofobní doména** vytvářející póry se nachází mezi zbytky 500 až 700 a sestává se z amfipatických α-helikálních struktur. Ty hrají klíčovou roli jak při translokaci AC domény, tak při

tvorbě pórů v membránách hostitelské buňky (Basler *et al.*, 2007; Osickova *et al.*, 2010; Masin *et al.*, 2017; Novak *et al.*, 2017).

3. **Aktivační doména** (pozice 700 až 1012): zde je toxin posttranslačně aktivován (acylován) na dvou zbytcích lysinu (K860 a K983) (Basar *et al.*, 2001).

4. **Typická RTX doména** (pozice 1012–1638) obsahuje pět bloků (blok I až V). Každý blok tvoří beta-struktury, které mají opakující se sekvence bohaté na glycin a kyselinu asparagovou. Tyto repetitivně struktury váží ionty vápníku (Bumba *et al.*, 2016). V této doméně se také nachází sekvence, která se váže na receptor CR3 (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003).

5. **Sekreční signál** na C-konci (74 posledních zbytků) je struktura rozpoznávaná bakteriálním sekrečním systémem typu I (T1SS) (Bumba *et al.*, 2016).

2.1.2 Aktivace CyaA

Adenylátcyklázový toxin je syntetizován v bakteriálním cytosolu jako neaktivní prekurzor (proCyaA nebo též protoxin). Aktivace protoxinu vyžaduje kovalentní posttranslační modifikaci pomocí acyltransferázy CyaC, která přenáší mastnou kyselinu (palmitovou a palmitoolejovou) na dva zbytky lysinu, Lys 860 a Lys 983, nacházející se v aktivační doméně CyaA (Basar *et al.*, 2001). Bylo také ukázáno, že acylace pouze na lysinu 983 nebo lysinu 860 je dostačující pro translokaci AC domény na buňkách nesoucích receptor CD11b/CD18 (Masin *et al.*, 2005).

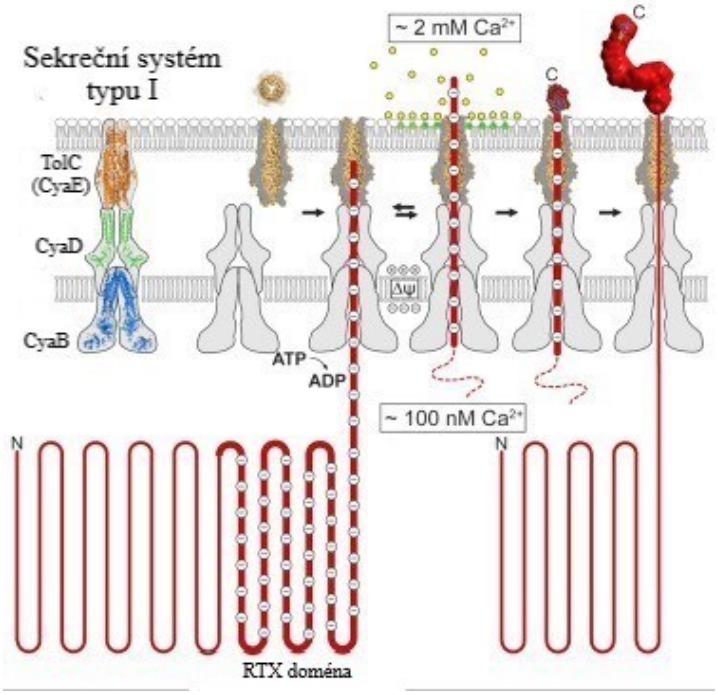
2.1.3 Sekrece toxinu z bakteriální buňky

Sekrece adenylátcyklázového toxinu přes bakteriální buněčnou stěnu probíhá pomocí sekrečního systému typu I (T1SS, obrázek 2), tvořeného proteiny CyaBDE (Masure *et al.*, 1990; Bumba *et al.*, 2016)**.** C-koncový sekreční signál CyaA je rozpoznán proteinem CyaB umístěným ve vnitřní bakteriální membráně. Tento protein patří do rodiny tzv. ABC transportérů. Na rozdíl od jiných proteinových translokačních systémů, které rozpoznávají N-koncové sekreční signály, jsou RTX proteinové substráty (ke kterým patří CyaA) rozpoznány sekrečním aparátem prostřednictvím neštěpitelných C-koncových sekvencí (Lenders *et al.*, 2015). Pro průchod CyaA sekrečním aparátem typu I je nezbytná energie ve formě ATP (Letoffe, Delepelaire and Wandersman, 1996; Du *et al.*, 2014).

Bezprostředně za signální sekvencí se nachází vápník vazebná RTX doména, charakteristická pro všechny toxiny patřící do RTX rodiny. Doména obsahuje pět bloků, z nichž každý se skládá z 8 až 10 motivů. Každý motiv je tandemové opakování konsenzuální sekvence bohaté na glycin (G) a kyselinu asparagovou (D), GGXGXDXXX (kde X představuje jakoukoliv aminokyselinu) (Rose *et al.*, 1995). Při nízkých koncentracích vápníku (cca 100 nM) v bakteriálním cytosolu nemá tato doména žádnou sekundární strukturu (Chenal *et al.*, 2009). Poté, co je protein transportován z

bakteriální buňky T1SS kanálem směrem od C-konce k N-konci, vstoupí toxin do extracelulárního prostoru, kde je milimolární koncentrace vápníku. To způsobuje vznik stabilní struktury, tzv. β-rollu (někdy označován i jako β-helix) (Sotomayor-Perez, Ladant and Chenal, 2014), který se skládá ze dvou paralelních beta-vláken (Rose *et al.*, 1995). Vápník je v této struktuře vázán mezi dvěma sousedními otáčkami helixu. Vytvořená kompaktní struktura zvyšuje rychlost sekrece CyaA (Bumba *et al.*, 2016) (Chenal *et al.*, 2009).

2.1.4 Počáteční interakce s membránou



Obrázek 2: Sekrece CyaA přes buněčnou stěnu. T1SS se skládá ze tří složek, které zahrnují ABC transportér (CyaB) zabudovaný do vnitřní bakteriální membrány, membránový fúzní protein (MFP, CyaD), který vytváří kanál z vnitřní membrány do periplazmy a protein TolC (CyaE), který spojuje CyaD s vnější membránou. C-konec rozloženého CyaA polypeptidu interaguje s ABC a na základě hydrolýzy ATP postupuje přes vytvořený kanál. Interakce vápník-vázající domény s Ca^{2+} v extracelulárním prostředí vytváří stabilní sekundární strukturu, která zastaví volný pohyb proteinu tam-zpět a umožní sekreci dalších částí proteinu směrem ven. Převzato a pozměněno podle (Bumba *et al.*, 2016)

CyaA se primárně váže na fagocyty, jako jsou například neutrofily, monocyty, makrofágy, dendritické buňky a NK-buňky, které nesou na svém povrchu integrin CD11b/CD18, známý také jako komplementový receptor-3 (CR3), integrin $\alpha_M\beta_2$ nebo Mac-1 (Guermonprez *et al.*, 2001; Osicka *et al.*, 2015). Integrin CD11b/CD18 je tvořen z transmembránových glykoproteinů (Asada *et al.*, 1991). Obě podjednotky nesou několik potenciálních glykosylačních míst. Zdá se, že počáteční vazba toxinu zahrnuje přímé rozpoznávání oligosacharidových řetězců na podjednotce CD11b nebo CD18 (Morova *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že oligosacharidové řetězce umístěné v C-koncové části podjednotky CD11b mohou tvořit strukturu, která by mohla být zodpovědná za vysokoafinitní vazbu CyaA toxinu (Hasan *et al.*, 2015).

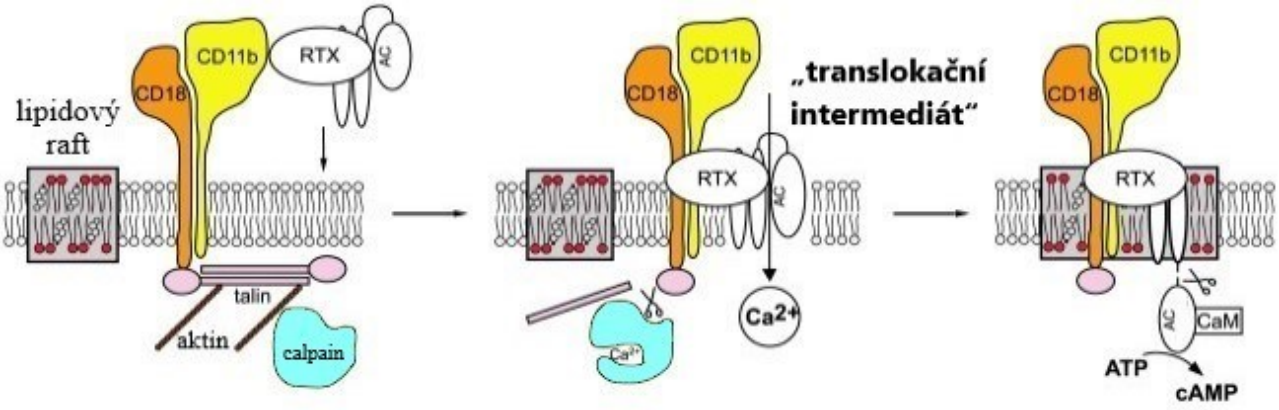
Motiv CyaA vázající CD11b (zbytky 1166–1287) se nachází mezi druhým a třetím blokem RTX domény. Po navázání volného vápníku tato oblast podléhá významným strukturním změnám, které následně umožnují účinnou vazbu toxinu na receptor (Rose *et al.*, 1995; El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003)

Kromě specifické vazby na receptor může CyaA interagovat s relativně nízkou afinitou s glykoproteiny přítomnými na povrchu eukaryotních buněk postrádajících receptor CD11b/CD18 nebo glykosylovanými lipidovými molekulami, jako jsou například gangliozidy (Vojtova *et al.*, 2006). CyaA může rozpoznávat oligosacharidové skupiny gangliosidů, například negativně nabité zbytků kyseliny sialové, podobně jako rozpoznává oligosacharidové řetězce přítomné na CD11b (Novak *et al.*, 2017).

2.1.5 Translokace AC domény a tvorba pórů

Bez přítomnosti CyaA toxinu je CD11b/CD18 difuzně distribuován po celé cytoplazmatické membráně mimo lipidové rafty, přičemž cytoplazmatický konec podjednotky CD18 je vázán k aktinovému cytoskeletu prostřednictvím proteinu talin (Bumba *et al.*, 2010). Po vazbě CyaA na CD11b podjednotku receptoru se vytváří komplex toxin-receptor neboli „translokační intermediát" CyaA (viz. obrázek 3). Předpokládá se, že v tomto intermediátu je část AC domény již zanořena do membrány a tím otevírá cestu pro vstup extracelulárního vápníku do cytoplazmatického prostoru eukaryotní buňky (Fiser *et al.*, 2007; Bumba *et al.*, 2010). Z vnějšího prostředí přicházející vápníkové ionty (nikoliv uvolňované z intracelulárních zásob hostitelské buňky) aktivují proteázu calpain, která zprostředkovává štěpení talinu. Štěpení talinu poté způsobí přemístění komplexu CyaA-integrin do lipidových raftů, kde v prostředí bohatém na cholesterol je dokončen poslední krok translokace pozitivně nabité AC domény přes buněčnou membránu (Bumba *et al.*, 2010). Translokace AC je relativně rychlý proces s poločasem translokace asi 30 sekund (Rogel and Hanski, 1992). Předpokládá se, že translokace je vedená negativním gradientem membránového potenciálu (Otero *et al.*, 1995). Na cytosolické straně buněčné membrány proteáza kalpain odštěpí od zbytku toxinové molekuly AC doménu, která dále může katalyzovat přeměnu ATP na cAMP (Uribe *et al.*, 2013; Masin *et al.*, 2015).

Současný model předpokládá (Osickova *et al.*, 2010), že CyaA toxin existuje nejméně ve dvou odlišných konformačních izomerech (vytváří se nejméně dva odlišné prekurzory), které jsou v rovnovážném stavu. Jeden z nich je zodpovědný za translokaci AC domény popsanou výše. Druhý prekurzor, paralelně a nezávislé na translokační aktivitě vytváří oligomerní kation-selektivní póry, které jsou schopné permeabilizovat buněčnou membránu (Wald *et al.*, 2014; Benz, 2016).



Obrázek 3: Translokace CyaA přes membránu cílové buňky. V prvním kroku se CyaA váže na integrin CD11b/CD18, nacházející se mimo lipidové rafty, přičemž cytoplasmatický konec podjednotky CD18 je vázán k aktinovému cytoskeletu prostřednictvím proteinu talin. Po spojení s receptorem se „translokační intermediát“ CyaA vloží do buněčné membrány. AC doména, částečně pronikající do buněčné membrány spolu s jinými segmenty toxinu tvořícími póry se podílí na tvorbě vápníkového kanálu přes buněčnou membránu. Tok vápenatých iontů do buněk indukuje aktivaci kalpainu, což vede ke štěpení talinu a uvolnění komplexu CyaA-CD11b/CD18 z vazby na aktinový cytoskelet. V důsledku toho je komplex přemístěn do lipidových raftů obohacených o cholesterol, kde probíhá dokončení translokace AC domény přes cytoplazmatickou membránu. Na cytosolické straně buněčné membrány se AC doména odštěpí od RTX hemolysinové části buněčnou proteázou. Vazba cytosolického kalmodulinu (CaM) pak aktivuje adenylácyklázu a katalyzuje neregulovanou přeměnu ATP na cAMP. Převzato a pozměněno podle (Bumba et al., 2010).

Stejně jako pro translokaci AC domény, tak pro tvorbu pórů je důležitá hydrofobní doména CyaA, ale na rozdíl od translokace AC domény je pro tvorbu pórů vyžadována oligomerizace několika molekul toxinu (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009) (Roderova *et al.*, 2019). Hly část oligomerizuje a vytváří malé kation-selektivní membránové póry o průměru 0,6 až 0,8 nm, které podporují únik draselných iontů z buněk a mohou způsobit koloidně-osmotickou (onkotickou) lyzi buněk (Wald *et al.*, 2014; Benz, 2016). Na rozdíl od jiných RTX toxinů, jako je například hemolysin HlyA z *E. coli*, který má průměr membránových pórů 2,0–3,0 nm (Benz *et al.*, 1994), je pórotvorná aktivita CyaA velmi nízká.

2.1.6 Interakce s kalmodulinem

Kalmodulin (CaM) je vysoce konzervovaný protein, který interaguje s celou řadou eukaryotických proteinů a enzymů a řídí jejich aktivitu, je klíčovým vápníkovým senzorem (Berridge, Bootman and Roderick, 2003). CaM má N- a C-koncové globulární domény (N- a C-CaM), které jsou spojeny α-helixem. Každá doména CaM má dva motivy vázající vápník a hořčík. Vazba vápníku na CaM indukuje konformační změny z převážně hydrofilního uzavřeného stavu do otevřené hydrofobní konformace, což je důležité při rozpoznávání cílového peptidu (Guo *et al.*, 2005). Na rozdíl od edemogenního faktoru (EF) bakterie *B. anthracis* (podrobný mechanismus interakce EF s kalmodulinem je popsán v kapitole **2.2.3**) není jasný přesný mechanismus aktivace CyaA pomocí CaM. Dosud neexistuje žádná struktura s vysokým rozlišením celého CaM vázaného na CyaA

(Springer *et al.*, 2017). Guo a jeho kolegové (Guo *et al.*, 2005) určili strukturu AC v komplexu jen s C-koncovou doménou CaM (C-CaM). Přestože jsou struktury AC domén podobné a místo, kde se váže CaM na tyto dva toxiny je také identické, aktivace CyaA a EF probíhá odlišně (Guo *et al.*, 2005, 2008).

2.1.7 Účinek zvýšené hladiny vnitrobuněčného cAMP na hostitelskou buňku

AC doména v buněčném cytosolu po aktivaci eukaryotickým kalmodulinen katalyzuje extrémně rychlou a nekontrolovanou přeměnu vnitrobuněčného ATP na cAMP (Vojtova, Kamanova and Sebo, 2006). Akumulace této klíčové signální molekuly rozvrací buněčnou fyziologii a rychle potlačuje baktericidní funkce fagocytů (Cerny *et al.*, 2015). Rychlé zvýšení koncentrace cAMP účinkem CyaA dále ovlivňuje četné signální dráhy aktivované proteinovou kinázou A (PKA) a proteinem Epac (výměnný protein přímo aktivovaný cAMP) (Fedele *et al.*, 2017). Dále cAMP blokuje produkci superoxidových radikálů v makrofázích (Cerny *et al.*, 2015) a také v závislosti na množství aplikovaného toxinu (a tedy různé hladině intoxikace cAMP v cytosolu) fagocyt může podlehnout apoptotické nebo nekrotické buněčné smrti (Bachelet *et al.*, 2002; Basler *et al.*, 2006; Hewlett, Donato and Gray, 2006). Tyto výsledky naznačují, že CyaA je nezbytným faktorem virulence bakterie v rané fázi kolonizace dýchacích cest, který umožňuje bakteriím uniknout hostitelskému imunitnímu systému.

2.2 Edemogenní (edema) faktor bakterie *Bacillus anthracis*

Strukturně a funkčně podobnou adenylátcyklázu té z *Bordetella pertussis* produkuje aerobní grampozitivní bakterie *Bacillus anthracis,* která způsobuje onemocnění zvané anthrax nebo sněť slezinná (Bostikova and Patocka, 2005). *Bacillus anthracis* napadá především býložravce, lidé jsou spíše náhodnými hostiteli při kontaktu s kontaminovanou potravou, živočišnými produkty nebo infikovanými zvířaty (Bostikova and Patocka, 2005). Onemocnění anthrax se dělí do čtyř typů v závislosti na místě vstupu bakterie do hostitele: kožní forma, gastrointestinální forma, plicní forma a anthraxové onemocnění u uživatelů drog (používání injekcí). Po smrti svého hostitele *B. anthracis* tvoří velmi odolné spóry, které mohou zůstat v půdě mnoho let a po vstupu do nového hostitele mohou znovu aktivovat svůj růst a produkci toxinů (Friebe, van der Goot and Burgi, 2016).

Anthrax je znám od 19. století, ale dlouhou dobu nepředstavoval velký problém, protože k onemocnění docházelo pouze u malého zlomku lidi pracujících přímo s hospodářskými zvířaty. Kromě toho, aby člověk onemocněl je potřeba vdechnout více než 10 000 spór (Bostikova and Patocka, 2005). V tom případě pak existuje velmi účinná antibiotická léčba a vakcína proti anthraxu (Kalamas, 2004).

Během dvacátého století začali používat některé země spóry *B. anthracis* jako biologickou zbraň. Na základě mezinárodní smlouvy v roce 1972 byly tyto typy biologických zbraní zakázané (Bostikova and Patocka, 2005). Přes to např. bývalý Sovětský svaz pokračoval v provádění studií na *B.anthracis* jako biologické zbrani. To vyšlo najevo jen díky katastrofě v roce 1979 ve Sverdlovsku (nyní Jekatěrinburg). Z biologického vojenského střediska tehdy unikly do vzduchu spóry *B. anthracis* a rozšířily se větrem směrem do města. Podle oficiálních údajů zemřelo kvůli tomuto incidentu asi 60 lidí, ale skutečný počet obětí může být větší (Meselson *et al.*, 1994). Na začátku 21. století anthrax našel nové využití jako nástroj bioterorismu. Spojené státy byly napadeny teroristy používáním tzv. anthraxových dopisů, poštovních zásilek obsahujících spóry *B. anthracis* (Bostikova and Patocka, 2005). Ačkoliv počet obětí byl malý, útoky zvýšily obavy a tím i zájem vědců a lékařů o léčení a prevenci proti anthraxu (Kalamas, 2004). Za posledních 20 let došlo k velkému pokroku v chápání molekulárních mechanismů působení anthraxového toxinu.

2.2.1 Složky a receptory anthraxového toxinu

Takzvaný anthraxový toxin je sekretován z bakterie jako tři monomerní proteiny (Liu, Moayeri and Leppla, 2014) dosud neznámým mechanismem. Jednotlivé podjednotky jsou netoxické, ale po vazbě na povrch buněk nesoucích receptor se sestavují do toxických oligomerních komplexů. Dva z těchto proteinů jsou enzymatické vnitrobuněčné efektory: letální faktor (LF) je Zn^{2+} aktivovaná proteáza a edemogenní faktor (EF) je adenylátcykláza, jejíž aktivita je závislá na přítomnosti eukaryotního kalmodulinu. Třetím proteinem je protektivní antigen o velikosti 83 kDa (PA83), který se váže na receptor a vytváří póry pro transport EF a LF do cytosolu savčích buněk (Young and Collier, 2007; Liu, Moayeri and Leppla, 2014).

Byly identifikovány dva homologní savčí receptory (Abrami et al., 2003), které váží anthraxový toxin. Jsou to nádorový endoteliální marker-8 (TEM8) (Bradley *et al.*, 2001), známý jako antraxový receptor-1 (ANTXR1), a protein kapilární morfogeneze-2 (CMG2) (Scobie *et al.*, 2003), také nazývaný jako anthraxový toxinový receptor 2 (ANTXR2), který má 10x vyšší vazebnou afinitu pro PA než TEM8 (Liu *et al.*, 2009).

PA83 se váže na receptor (ANTRX 1 nebo ANTRX2) a je proteolyticky aktivován buněčnou proteázou furin. Toto štěpení odstraní 20 kDa část (PA20) z N-konce, zatímco zbývající část 63 kDa (PA63) zůstane spojena s receptorem. Odstranění PA20 umožňuje PA63 tvořit se třemi nebo čtyřmi molekulami EF a/nebo LF oligomerní strukturu (heptamer nebo oktamer) (Young and Collier, 2007).

2.2.2 Buněčný vstup a endocytóza

Po vytvoření komplexu receptor-toxin dochází k jeho přemístění do lipidových raftů (viz. obrázek 4) způsobem, který pravděpodobně zahrnuje palmitoylaci seskupených receptorů (Abrami,

Leppla and van der Goot, 2006). V lipidových mikrodoménách bohatých na cholesterol se cytoplazmatická část receptorů stává přístupná pro různé modifikační děje. Je například fosforylována kinázami z rodiny Src/Fyn. To dává možnost přidání ubikvitinové skupiny k cytoplazmatickým lysinům receptorů pomocí ligázy Cbl (pro TEM8) nebo E3 ligázou (pro CMG2) (Abrami, Kunz and van der Goot, 2010), což následně umožňuje interakci s proteiny endocytického aparátu. Všechny modifikace vedou k navázání adaptérového proteinu AP-1 a klathrinu, tedy molekul vytvářející endocytické váčky, které jsou dále odštěpeny od cytoplazmatické membrány působením GTPázy dynaminu (Abrami *et al.*, 2010). Endocytóza obou receptorů po vazbě na toxin je závislá na aktinu a zdá se, že TEM8 je předem organizován aktinem na buněčném povrchu (Abrami *et al.*, 2010).

Jakmile je komplex uvnitř endozómu, PA podléhá konformační změně vyvolané nízkým pH a vytváří póry, které působí jako translokační kanál pro enzymatické podjednotky. Přesné místo, kde dochází k tvorbě pórů závisí na tom, zda je vstup zprostředkován TEM8 nebo CMG2. Pokud je PA vázán na TEM8, dochází k disociaci a tvorbě pórů v dřívějších krocích dráhy, pravděpodobně v časných endozómech. Po vazbě na CMG2 tvoří protektivní antigen póry později (Rainey *et al.*, 2005; Friebe, van der Goot and Burgi, 2016).

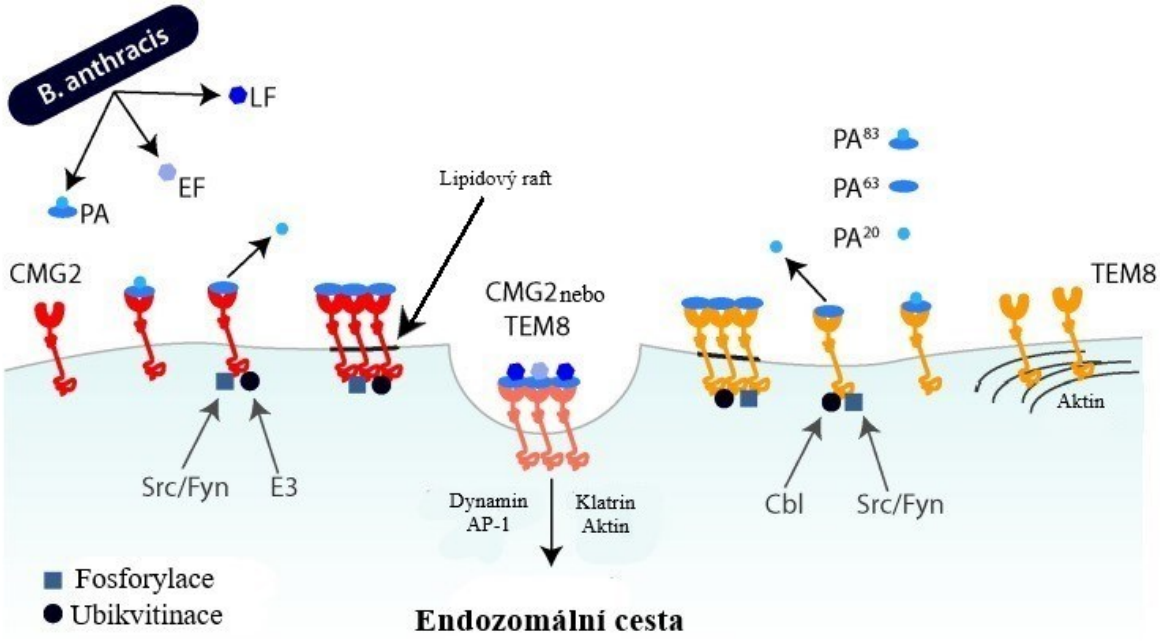
EF a LF jsou následně translokovány přes membránové póry jednak přímo do cytoplazmy nebo nejprve do vnitrobuněčných váčků (ILV, z angl. Intraluminal Vesicle) a poté jsou fúzovány zpět s pozdní endozomální membránou nebo autofagosomem (Abrami *et al.*, 2004; Lowe and Glomski, 2012). Tento způsob může být pro toxin výhodnější, neboť enzymové podjednotky mohou zůstat v ILV chráněné před lysozomálními enzymy. Kromě toho může být toxin uvolňován do extracelulárního prostředí pomocí exosomů a vstupovat do jiných buněk bez ohledu na receptor a tak zůstávat pro imunitní systém neviditelným (Abrami *et al.*, 2013).

Translokace LF a EF z endozomálního kompartmentu do cytosolu pomocí póru je proces, který nevyžaduje žádnou energii. Rozdíly v koncentracích protonů a elektrickém potenciálu dostačují pro efektivní transport PA pórem (Zhang *et al.*, 2004). Bylo však ukázáno (Jiang et al., 2015), že translokace vyžaduje rozvolnění struktury jak LF, tak EF, protože průměr póru je příliš malý pro průchod strukturovaného proteinu.

N-konec LF a EF vstupuje do póru tvořeného PA63 díky kyselému pH a pozitivnímu membránovému potenciálu a iniciuje translokaci rozvolněného polypeptidu ve směru od N k C-konci. Pór je selektivní pro kationty, a proto negativně nabité části translokovaného polypeptidu mohou vstoupit do póru až poté, co jsou pronotovány a neutralizovány. Když polypeptid enzymu prochází pórem a vstupuje do vyššího pH v cytosolu, kyselé aminokyseliny získávají negativní náboj a blokují

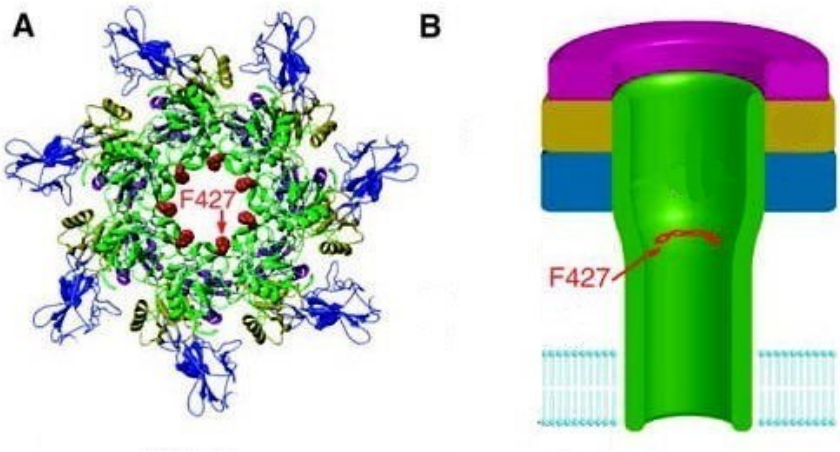
tak zpětnou difúzi peptidu do endozomu. Výsledkem je jednosměrný průchod polypeptidu přes membránu, končící strukturováním polypeptidu v cytosolu buňky (Young and Collier, 2007).

Postranní řetězce sedmi fenylalaninových aminokyselinových zbytků (Phe) na pozici 427 z



Obrázek 4: Buněčný vstup anthraxového toxinu. *B. anthracis* vytváří tři podjednotky antraxového toxinu: protektivní antigen (PA), letální faktor (LF) a edemogenní faktor (EF). PA83 se váže buď na CMG2 nebo TEM8 na buněčném povrchu, kde je štěpen furinem, což vede k PA63 spojenému s receptorem a rozpustnému PA20. Po navázání toxinu jsou receptory fosforylovány kinázami Src nebo Fyn, a ubikvitinovány Cbl (pro TEM8) nebo neznámou E3 ligázou (pro CMG2). Po oligomeraci v lipidových raftech komplex receptor-toxin podléhá endocytóze. Zdá se, že tato endocytóza do značné míry závisí na clathrinu, dynaminu, AP-1 a aktinu. Převzato a pozměněno podle (Friebe, van der Goot and Burgi, 2016).

každé podjednotky vytvářející pór tvoří zúžení (viz. obrázek 5), které je označováno jako Phe svorka (nebo také „ϕ svorka“) (Jiang *et al.*, 2015). Tuto svorku lze považovat za aktivní místo, klíčové pro translokaci proteinu (Krantz *et al.*, 2005; Collier, 2009). Funguje primárně k interakci přímo s translokujícím polypeptidem a tvoří jakési těsnění zabraňující průchodu iontů. Tato struktura je nezbytná pro zachování transmembránového pH gradientu v póru (Wang *et al.*, 2009).



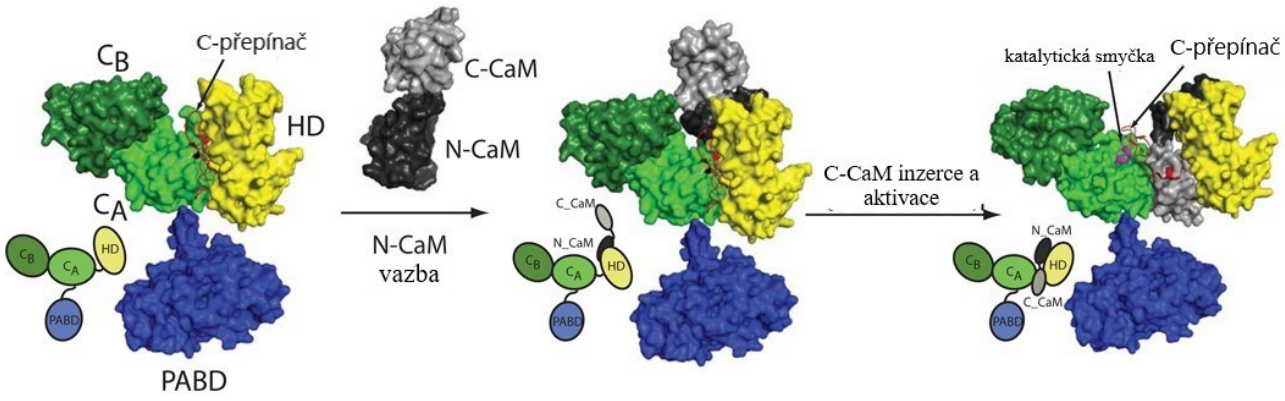
Obrázek 5: Umístění fenylalaninové (Phe, *ϕ*) svorky uvnitř anthraxového póru. A) Sedm fenylalaninových zbytků z každé podjednotky v pozici 427 (F427) tvoří aktivní místo pro průchod proteinu. Spodní pohled. B) Hypotetický průřez póru, obarvený jako v (A). Převzato a pozměněno podle (Krantz *et al.*, 2005).

Působení toxinu začíná ještě před tím, než se samotné účinné enzymy dostanou endocytozou dovnitř buňky. Bylo popsáno, že PA20, která se odštěpí od nativního protektivního antigenu, ovlivňuje transkripci genů souvisejících s apoptózou a růstem buněk v leukocytech (Hammamieh *et al.*, 2008). Je však jasné, že koordinovaný účinek obou anthraxových efektorů LF a EF zajišťuje úspěšnou infekci a celkovou virulenci (Ebrahimi *et al.*, 2011).

2.2.3 Aktivace edemogenního faktoru

Edemogenní faktor je vysoce aktivní adenylátcyklázový enzym závislý na vazbě kalmodulinu (CaM), stejně jako CyaA. Má tři modulární domény: N-koncovou PA vazebnou doménu (PABD), AC katalytickou doménu sestávající ze dvou subdomén (C_A a C_B), na jejichž rozhraní se tvoří aktivní místo (tzv. katalytická smyčka), a na C-konci tzv. helikální doménu (HD) (Shen et al., 2005). V nepřítomnosti kalmodulinu se helikální doména spojuje s katalytickou doménou a blokuje aktivitu toxinu (Guichard, Nizet and Bier, 2012). Studie Ulmera a kolegů (Ulmer *et al.*, 2003) ukazuje, že uzavřená konformace N-koncové části CaM bez navázaného vápníku je v kontaktu s helikální doménou EF a umožňuje C-koncové části CaM s navázaným vápníkem se vložit mezi katalytickou a helikální doménou EF (viz. obrázek 6). To iniciuje konformační změny tzv. C-přepínače, které vedou dále k stabilizaci katalytické smyčky a k zahájení enzymatické AC aktivity (Shen *et al.*, 2005; Tang and Guo, 2009).

Při běžné vnitrobuněčné nebo jen mírně zvýšené koncentraci vápníku (0,1–0,5 μM) je AC aktivita EF stimulovaná. Při vyšších koncentracích vápníku je však AC aktivita inhibována kompeticí iontů vápníku s ionty hořčíku v katalytickém místě (Shen *et al.*, 2005).



Obrázek 6: Model katalytické aktivace edema faktoru (EF) pomocí kalmodulinu (CaM). EF: katalytické subdomény C_A a C_B, helikální doména (HD), PA vazebná doména (PABD). Reakce je zahájená navázáním N-CaM na HD, což iniciuje inzerci C-CaM mezi katalytickou doménou a HD. C-přepínač stabilizuje katalytickou smyčku a dále následuje přeměna ATP na cAMP. Pro lepší vizualizaci jsou vlevo dole zobrazené domény schematicky znázorňující tyto tři stavy. Převzato a pozměněno podle (Tang and Guo, 2009).

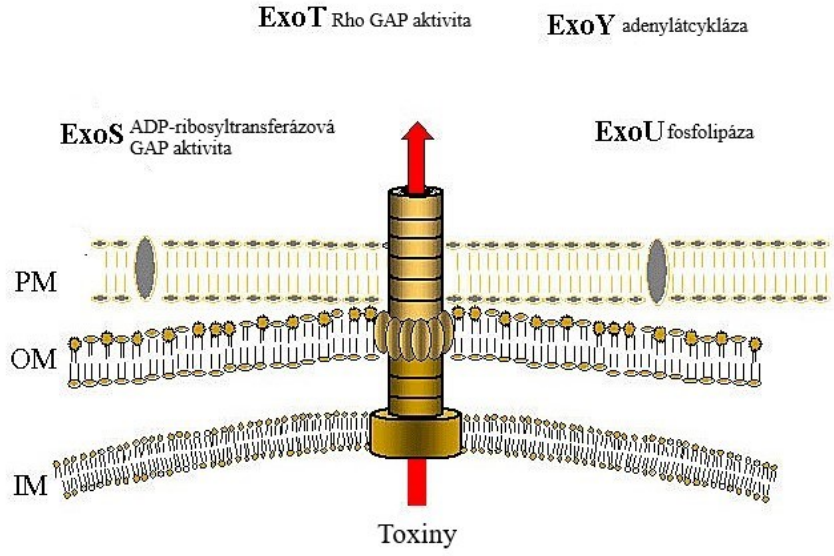
Na rozdíl od CyaA, který vytváří nejvyšší koncentraci cAMP v cytosolu buňky lokálně blízko plazmatické membrány, edemogenní faktor vytváří gradient cAMP vycházející z jádra a klesající směrem k plazmatické membráně (Dal Molin *et al.*, 2006). Důležitou odlišnosti je také afinita enzymu ke CaM, která je v případě CyaA 0,2 nM (Guo *et al.*, 2005), což je asi 100x vyšší hodnota než afinita k EF (Shen *et al.*, 2005).

2.3 Exoenzym Y bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Třetím a nejméně prozkoumaným proteinem z rodiny bakteriálních adenylátcyklás je ExoenzymY (ExoY) produkovaný gramnegativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa,* oportunistickým lidským patogenem. Tato všudypřítomná bakterie je vybavena faktory virulence, které kolonizují různé tkáně a orgány jedinců a je nebezpečná především pro pacienty s cystickou fibrózou (Sadikot *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* je díky své vysoké životaschopnosti v různých prostředích a své vlastní odolnosti vůči mnoha antibiotikům hlavní příčinou nozokomiálních infekcí v nemocnicích po celém světě (Lyczak, Cannon and Pier, 2002; Hauser, 2009).

2.3.1 Efektorové proteiny typu 3

Během infekce produkuje *P. aeruginosa* rozsáhlý repertoár faktorů virulence, mezi něž patří: adhezivní faktory, proteiny tvořící biofilm a faktory rezistence vůči antibiotikům. Dále jsou to sekretované toxiny včetně několika proteinových efektorů, jako například ExoS, ExoT, ExoU a ExoY, které jsou přenášeny přes membránu do hostitelských buněk pomocí sekrečního systému typu 3 (T3SS) (Gellatly and Hancock, 2013).



Obrázek 7: Vstup efektorových Exo proteinů do hostitelské buňky pomocí sekrečního systému typu 3 (T3SS). IM – vnitřní membrána bakterie, OM – vnější membrána bakterie, PM – cytoplazmatická membrána eukaryotické buňky. Převzato a pozměněno podle obrázku z webových stránek laboratoře Tim Yahr, The University of Iowa.

Sekreční systém typu 3 tvoří složitý jehlicovitý komplex na bakteriálním povrchu, který je zodpovědný za transport specifických Exo proteinů z bakteriálního cytosolu do extracelulárního prostředí cílové buňky (viz. obrázek 7). Tento systém také slouží jako senzor kontaktu s hostitelskou buňkou (Hauser, 2009).

Efektory ExoS a ExoT inhibují fagocytózu bakterií a usnadňují pronikání *P. aeruginosa* přes epitel (Soong *et al.*, 2008). Další efektor T3SS, ExoU, patřící do rodiny fosfolipáz A2 je aktivován interakcí s ubikvitinem (Tessmer *et al.*, 2017). Po aktivaci způsobuje ExoU narušení buněčných membrán a buněčnou smrt cílových buněk (Belyy *et al.*, 2018). Čtvrtý popsaný efektor, ExoY s adenylátcyklázovou aktivitou byl identifikován v roce 1998 (Yahr *et al.*, 1998) a o jeho roli během infekce *P. aeruginosa* v porovnání s ostatními efektorovými proteiny je známo jen málo.

ExoenzymY

Efektorový protein ExoY byl původně popisován jako adenylátcykláza se strukturální podobností s bakteriálními adenylátcyklázami, jako je CyaA z *Bordetella pertussis* a edemogenní faktor (EF) z *Bacillus anthracis*. Bylo však ukázáno (Morrow *et al.*, 2015), že ExoY je purinová a pyrimidinová nukleotidylcykláza, která vytváří cGMP, cAMP, cUMP a v menší míře i cCMP. V *in vivo* modelu se ukázalo, že cUMP je nejvýznamnějším cyklickým nukleotidem generovaným v plicích myší infikovaných ExoY (Bahre *et al.*, 2015).

Zda je ExoY posttranslačně modifikován nebo zda interaguje s jinými proteiny uvnitř bakterie není známo. Avšak analogicky s jinými efektory T3SS se předpokládá, že N-koncové zbytky ExoY nesou sekreční signál a možnou doménu vázající pomocné proteiny (chaperony) (Belyy *et al.*, 2018).

2.3.2 Interakce s aktinem

ExoY sdílí významnou sekvenční homologii v katalytické doméně s CyaA i edemogenním faktorem. Nicméně ve struktuře ExoY chyběla doména vázající se na kalmodulin, a proto eukaryotický kofaktor ExoY zůstával dlouho neznámý. Nedávno bylo ukázáno (Belyy *et al.*, 2016), že na aktivaci ExoY se podílí vláknitý aktin (F-aktin). ExoY po vazbě na F-aktin podstoupí strukturními změnami, které umožnují jeho katalytické doméně vytvořit vysoké množství cyklických nukleotidů, které narušují buněčnou signalizaci. To vyvolá reorganizaci cytoskeletu následovanou buněčnou smrtí (Sayner *et al.*, 2004). ExoY se váže na aktin tak, že blokuje rozpad aktinového vlákna a také narušuje vazbu vazebných proteinů, jako je například ADF (faktor způsobující depolymerizaci aktinu), způsobující rozpad aktinových vláken (Belyy *et al.*, 2018). Přesný mechanismus vysvětlující, jak ExoY ovlivňuje dynamiku aktinu a jak F-aktin aktivuje ExoY, však zůstává neznámý.

cAMP a v menší míře také cGMP, syntetizované po aktivaci ExoY, jsou zodpovědné za rozpad mikrotubulů, což vede ke změně tvaru buněk (Morrow *et al.*, 2017). Syntéza těchto nukleotidů

dále vede k narušení bariéry endoteliálních buněk a může aktivovat protein kinázu A (PKA), která fosforyluje protein tau spojený s mikrotubuly. Jakmile se protein tau stane fosforylovaným, uvolňuje se z mikrotubulů a tvoří oligomery o vysoké molekulové hmotnosti. Tyto oligomery jsou následně uvolňovány z endotelu a přenášejí se mezi buňkami, což způsobuje zvýšenou permeabilitu mezi buňkami a s tím spojenou cytotoxicitu. Podnět k uvolnění tau oligomerů není znám. Avšak i cUMP může působit jako druhý posel důležitý pro stimulaci uvolňování tau oligomerů (Morrow *et al.*, 2017).

Jak bylo diskutováno dříve, zatímco EF a CyaA jsou aktivovány kalmodulinem, ExoY definuje novou podskupinu nukleotidylcyklázových toxinů aktivovaných aktinem (Belyy *et al.*, 2016). Tato podskupina také zahrnuje různé ExoY-podobné (ExoY-L) moduly identifikované u několika členů multifunkčních autoprocesních RTX (MARTX) toxinů, které jsou produkovány různými gramnegativními patogeny (Belyy *et al.*, 2016). Například Ziolo s kolegy (Ziolo *et al.*, 2014) prokázali, že doména podobná ExoY z toxinu MARTX biotypu 3 *Vibrio vulnificus* je vybavena aktivitou adenylátcyklázy, stejně jako mořský patogen *Vibrio nigripulchritudo* (Belyy *et al.*, 2016). Zatímco F-aktinem aktivovaný ExoY z *P. aeruginosa* může generovat jak kanonické purinové, tak nekanonické pyrimidinové cNMP nukleiotidy (Winkelman *et al.*, 2014; Belyy *et al.*, 2016), ExoY z *Vibrio nigripulchritudo* je spíše podobný dobře známým toxinům z *B. anthracis* a *B. pertussis* (Khanppnavar and Datta, 2018; Mancl *et al.*, 2020).

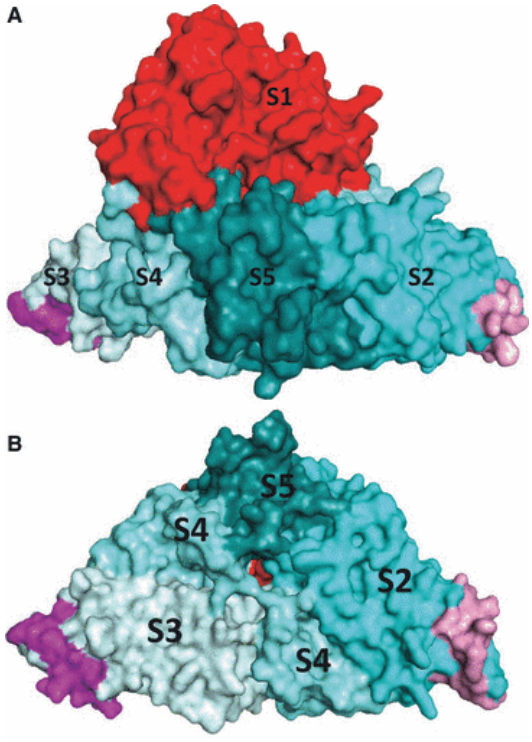
3 Rodina ADP-ribosylačních toxinů

Do rodiny tzv. ADP-ribosylačních toxinů patří velké množství toxinů, ale existují pouze tři, které umí manipulovat s vnitrobuněčnou koncentrací cAMP v hostitelské buňce: cholerový toxin (CT) bakterie *Vibrio cholerae*, pertusový toxin (PT) bakterie *Bordetella pertussis* a tepelně-labilní toxin (LT) bakterie *Escherichia coli*. CT i LT cílí na stimulační G-protein endogenního adenylátcyklázového systému přítomného v eukaryotních buňkách. Ribosylace způsobuje, že G protein je udržován ve svém aktivovaném stavu vázaném na GTP. PT naopak inhibuje aktivitu inhibičního G-proteinu. Obě tyto strategie vedou k následnému zvýšení množství cyklického AMP (Holbourn, Shone and Acharya, 2006). Podrobné mechanismy těchto dějů budou popsány níže.

3.1 Pertusový toxin

Pertusový toxin (PT nebo PTX) je, stejně jako CyaA, klíčovým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis*. PT hraje roli v mnoha komplikacích spojených s onemocněním černý kašel, má imunomodulační funkce a je nezbytný pro infekci hostitele (Carbonetti, 2010).

PT je protein, patřící do skupiny tzv. AB_5 toxinů (Beddoe *et al.*, 2010). Je složený z pěti různých podjednotek: S1, S2, S3, S4 a S5, které jsou uspořádané v architektuře A-B (Tamura *et al.*, 1982). S1 podjednotka je jediná ADP-ribosyltransferázová katalytická podjednotka označována také jako A-protomer, Podjednotky S2 až S5, spojené disulfidovými vazbami, tvoří komplex označovaný B-oligomer, který má stechiometrii: 1S2: 1S3: 2S4: 1S5 (Stein, Boodhoo, Armstrong, Cockle, *et al.*, 1994).



Obrázek 8: Krystalová struktura PT.(A) Boční pohled a (B) spodní pohled na holotoxin. Různé podjednotky jsou označeny a zobrazeny v různých barvách (červená pro S1 a různé odstíny zelené pro B podjednotky). Růžově jsou označena vazebná místa. Převzato a pozměněno podle (Locht, Coutte and Mielcarek, 2011).

PT je jedním z nejsložitějších bakteriálních toxinů, které jsou dosud známy. Všechny jeho podjednotky jsou spojeny do molekuly ve tvaru pyramidy (obrázek 8) s trojúhelníkovou základnou tvořenou B-oligomerem a na vrcholu tohoto trojúhelníku se nachází S1 podjednotka (Stein, Boodhoo, Armstrong, Cockle, *et al.*, 1994). Mezi A a B podjednotkami toxinu byly popsány pouze nekovalentní interakce, nicméně výsledný komplex vykazuje velkou stabilitu (Yang, Mou and Shao, 1994).

Po translaci každý syntetizovaný prekurzorový protein obsahuje N-koncovou signální sekvenci, která ho cílí do periplazmatického prostoru, kde se PT podjednotky shromáždí do tzv. AB holotoxinu. Ten je transportován přes vnější membránu do extracelulárního prostoru bakteriálním sekrečním systémem typu IV (Locht, Coutte and Mielcarek, 2011).

3.1.1 Vstup pertusového toxinu do hostitelské buňky

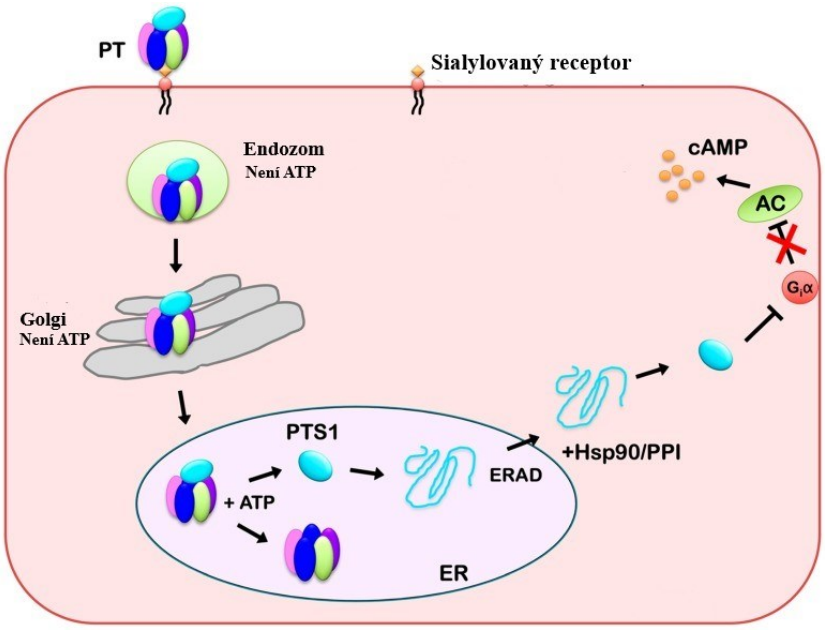
Jakmile je holotoxin transportován z bakterie, je schopen interagovat s cílovými buňkami. PT nemá popsaný žádný specifický receptor, ale podjednotky S2 a S3 obsahují vazebná místa pro kyselinu sialovou nacházející se na mnoha glykolipidech a glykoproteinech. To umožnuje adhezi PT k široké škále buněčných typů (Stein, Boodhoo, Armstrong, Heerze, *et al.*, 1994). Ve všech případech je vazba toxinu zprostředkována B podjednotkami (Bogdan *et al.*, 2003).

Potenciální schopnost PT rozpoznávat mnoho druhů sialylovaných povrchových receptorů naznačuje, že může použít různé receptory pro vstup do cílové buňky. PT podléhá endocytóze zprostředkované klathrinem a pohybuje se od endozomu přes Golgiho aparát až do endoplazmatického retikula (ER) (viz. obrázek 9) tzv. retrográdním transportem (Teter, 2019). Endozomální transport PT však není závislý na pH gradientu, jak je tomu u ostatních AB toxinů (Hausman and Burns, 1992).

ADP-ribosylační funkce S1 podjednotky se odehrává v cytoplazmě, kam se musí dostat z ER. Na to využívá translokační protein SEC61, což je pór v membráně ER, který umožňuje obousměrný pohyb proteinů určených pro degradaci mezi ER a cytozolem. Tento pór je součástí tzv. ERAD dráhy (angl. „endoplasmic reticulum associated degradation“, nebo česky „degradace spojená s endoplazmatickým retikulem“) a propouští proteiny pouze v nativním stavu (Hazes and Read, 1997; Pande *et al.*, 2006).

Hazes a kol. (Hazes *et al.*, 1996) ukázali, že ATP slouží jako molekulární senzor pro spuštění rozpadu holotoxinu. K tomu dochází specificky v místě pro translokaci S1 podjednotky z ER. Disulfidová vazba mezi A-monomerem a B-oligomerem je spontánně redukována a S1 podjednotka se oddělí, což aktivuje její enzymatickou funkci (Kaslow *et al.*, 1987; Teter, 2019). PT holotoxin a B-oligomer jsou stabilní komplexy (Yang, Mou and Shao, 1994), odštěpená S1 podjednotka má teplotu tání (Tm) jen 31ºC (Pande *et al.*, 2006). Proto po uvolnění z holotoxinu v ER, kde je teplota

kolem 37 ºC, enzymatická podjednotka spontánně změní konformaci a to umožní její průchod úzkým SEC61 pórem (Teter, 2019).



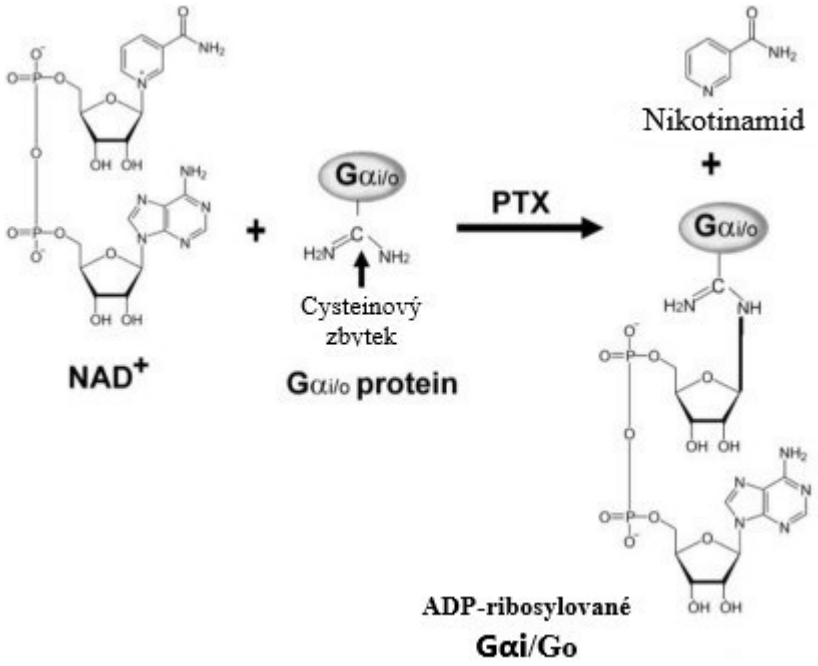
Obrázek 9: Vnitrobuněčná cesta a translokace PT. PT se váže na sialylovaný receptor na povrchu a vstupuje do cílové buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou. Poté se pohybuje jako neporušený holotoxin z endozomů, přes Golgiho aparát do endoplazmatického retikula (ER). Katalytická S1 podjednotka je udržována ve stabilní konformaci svou asociací s B-oligomerem, ale přemění se do nativního stavu, když ATP spustí jeho uvolnění z PT holotoxinu. Následně je S1 podjednotka rozpoznána jako ER-asociovaný degradační substrát (ERAD) pro export do cytosolu prostřednictvím mechanismu zahrnujícího mimo jiné proteiny pomáhající katalytické podjednotce udržovat správné prostorové uspořádání, Hsp90 a peptidyl prolyl cis/trans izomerázu (PPI). S1 se znovu skládá v cytozolu a inaktivuje Giα prostřednictvím ADP-ribosylace. Inaktivovaný Gia již nemůže inhibovat adenylátcyklázu (AC), což vede k trvale zvýšené hladině vnitrobuněčného cAMP. Převzato a pozměněno podle (Teter, 2019).

Produktivní intoxikace vyžaduje, aby se S1 podjednotka vyhnula obvyklému zpracování exportovaného substrátu v proteazómu, které závisí na ubikvitinu. Pomáhá tomu úplná eliminace lysinových zbytků v aminokyselinové sekvenci řetězce S1 podjednotky, na které se obvykle váže ubikvitin (Teter, 2019). Kvůli tepelné nestabilitě může být A-monomer náchylný k degradaci nezávislé na ubikvitinu pomocí tzv. 20S proteazomu (Pande et al., 2006). Bylo popsáno, že interakce s NAD^+ (Nikotinamidadenindinukleotid) může stabilizovat S1 podjednotku a inhibovat její tepelnou denaturaci (Pande *et al.*, 2006; Worthington and Carbonetti, 2007).

3.1.2 ADP-ribosylační reakce

S1 podjednotka PT používá NAD^+ jako donorovou molekulu (viz. obrázek 10) pro ADP-ribosylaci cysteinového zbytku v pozici 351 v α-podjednotce Gi/Go (Gαi/Go) (Hsia *et al.*, 1985). Gi/Go patří do rodiny heterotrimerních G-proteinů a ve zdravé buňce inhibuje prostřednictvím tzv. negativní regulace aktivitu AC. ADP-ribosylace α-podjednotky brání proteinům vazbě na GPCR (receptor spřažený s G proteinem) (Mangmool and Kurose, 2011). Odpojení GPCR od Gαi/Go proteinu má za následek narušení komunikace mezi receptorem a efektorovou molekulou

adenylátcyklázového komplexu. ADP-ribosylovaná forma Gi/Go je uzamčena v neaktivním stavu a dále nemůže regulovat funkci adenylátcyklázy. Konverzi ATP na cAMP tedy nelze zastavit, což vede k nadměrné hladině intracelulárního cAMP a následnému narušení mnoha buněčných procesů (Mangmool and Kurose, 2011).



Obrázek 10: Schéma ADP-ribosylace α-podjednotky heterotrimerního Gi/Go proteinu pertusovým toxinem (PTX). PTX katalyzuje štěpení vazby mezi atomem uhlíku ribózy a atomem dusíku nikotinamidu a přenáší ADP-ribosylovou část z nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) na akceptorovou molekulu na cílovém proteinu. Převzato a pozměněno podle (Mangmool and Kurose, 2011).

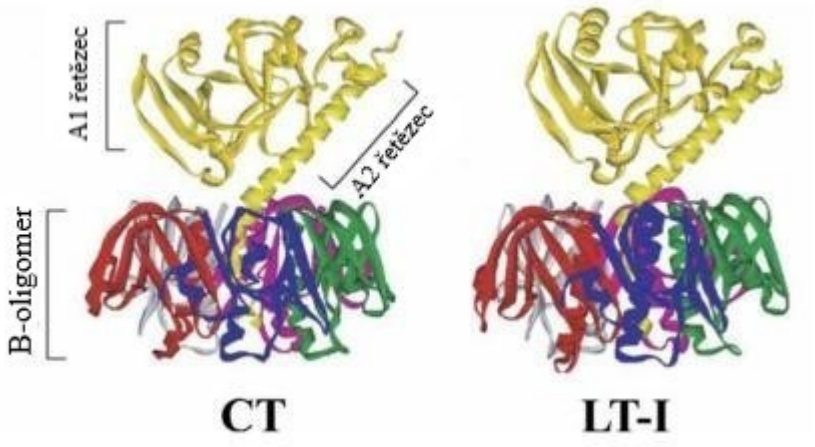
Protože jsou proteiny Gi/Go exprimovány v různých tkáních, účinky PTX jsou pozorovány téměř u všech typů buněk. Buněčné procesy ovlivněné PT-řízenou akumulací cAMP zahrnují citlivost k histaminu, potlačení adaptivních imunitních odpovědí, chemokinovou signalizaci, regulaci prozánětlivých cytokinů a zvýšenou sekreci inzulinu (Scanlon, Skerry and Carbonetti, 2019).

Samotný B-oligomer může také účinkovat na eukaryotické buňky nezávislé na ADP-ribosylační aktivitě S1 podjednotky. Například se váže na určité glykoproteiny na lidských krevních destičkách a vyvolává jejich rychlou agregaci a zvýšení hladiny vnitrobuněčného Ca^{2+} (Sindt *et al.*, 1994), která následně indukuje mitogenní stimulaci lidských T-buněk (Strnad and Carchman, 1987; Schneider, Weiss and Miller, 2007) a maturaci dendritických buněk (Wang *et al.*, 2006). Tato data naznačují dvojité působení PT: krátkodobé a velmi rychlé účinkem B-oligomeru a dlouhodobé s pomalým nástupem prostřednictvím ADP-ribosylace.

3.2 Tepelně-labilní enterotoxiny *E.coli* a *Vibrio cholerae*

Tepelně-labilní enterotoxiny (HLTs, *Heat-Labile enteroToxins*) jsou sekretovány bakteriemi *E. coli* a *Vibrio cholerae*, které způsobují průjmová onemocnění. Patří do rodiny strukturně příbuzných proteinů, které jsou rozděleny do dvou hlavních skupin: typ I sestává z cholerového toxinu (CT) produkovaného bakterií *Vibrio cholerae*, LT-I toxinu z enterotoxigenní *Escherichia coli* (ETEC) a příbuzných enterotoxinů z jiných bakterií (Connell and Holmes, 1995). Typ II (LT-II) zahrnuje tři varianty ETEC toxinů: LT-IIa, LT-IIb, LT-IIc, které vykazují vysokou homologii s CT a LT-I, ale rozpoznávají jiné receptory (Fukuta *et al.*, 1988). Tepelně labilní se tyto toxiny nazývají proto, že inkubace LT nebo CT při teplotě 70 ° C po dobu 10 minut je dostatečná pro destrukci jejich aktivity, přičemž tzv. tepelně stabilní toxin produkovaný stejnou ETEC bakterií vysoká teplota neinaktivuje (Gill *et al.*, 1981).

Oba toxiny, CT a LT, mají tzv. AB_5 oligomerní strukturu (stejně jako EF a PT). Pět B-podjednotek tvoří vysoce stabilní kruh (viz. obrázek 11). Tato část toxinu je zodpovědná za vazbu na cílové buňky (Zhang *et al.*, 1995). A-podjednotka je jediný polypeptid, který je posttranslačně modifikován štěpením proteázou. Po štěpení vznikají dva fragmenty A1 a A2, které stále zůstávají spojené disulfidovou vazbou (Sanchez and Holmgren, 2011). A1 doména vytváří trojúhelníkovou strukturu a je zodpovědná za ADP-ribosylační enzymatickou aktivitu toxinu, zatímco α-helikální A2 doména nekovalentně spojuje A1 doménu a B podjednotky toxinu (Zhang *et al.*, 1995).



Obrázek 11: Krystalová struktura cholerového toxinu (CT) a tepelně-labilního toxinu I (LT-1) z *E. coli*. Oba toxiny mají velmi podobnou strukturu: Helikální řetězec (A2) připojuje katalytický řetězec (A1) k B-oligomeru, který je složený z pěti podjednotek ve tvaru kruhu. A1 a A2 řetězce v CT a LTI jsou spojeny disulfidovou vazbou. Převzato a pozměněno podle (Connell, 2007).

3.2.1 Proniknutí do cílové buňky

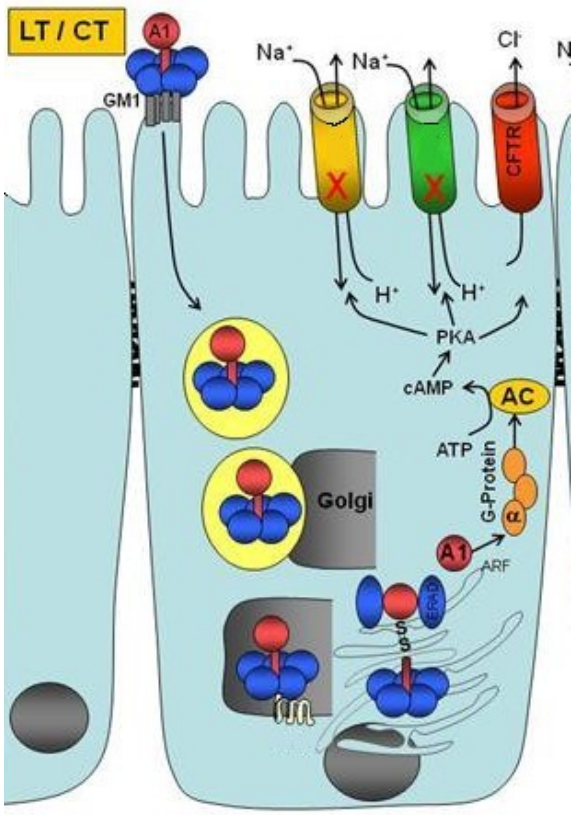
Transport enterotoxinů z bakteriálních buněk probíhá prostřednictvím sekrečního systému typu II (T2SS) (Tauschek *et al.*, 2002) a to po sestavení všech podjednotek do hotového holotoxinu v periplazmatickém prostoru bakterie. Jakmile jsou CT a LT-I ve střevním lumenu, zahájí svojí vnitrobuněčnou cestu vazbou na receptor GM1 (monosialogangliozid), která se děje s vysokou afinitou a specificitou. Tento receptor je přítomen na povrchu savčích buněk, včetně enterocytů, dendritických buněk, makrofágů, B a T buněk (Basset *et al.*, 2010; Sanchez and Holmgren, 2011). Pentamerická B-podjednotka váže stechiometricky pět molekul GM1 shromážděných v lipidových raftech na plazmatické membráně hostitelské buňky. Endocytoza je zahájená kaveoly (Parton, 1994), řízeným vychlípením váčku a následným transportem komplexu toxin-receptor do Golgiho aparátu. Není dosud jasné, v jakém kompartmentu a jak přesně probíhá uvolnění A a B podjednotek toxinu, existují však dvě alternativní vysvětlení tohoto procesu. B-podjednotka uvolněná v Golgiho aparátu může být recyklována do pozdních endozomů a lysozomů (Bastiaens *et al.*, 1996) a tzv. KDEL signál (signální sekvence aminokyselin lysin (K), kyselina asparagová (D), kyselina glutamová (E), leucin (L)) na C-konci A2-podjednotky umožnuje zpětný pohyb celé A podjednotky do endoplazmatického retikula (ER). Může také existovat endogenní retrográdní cesta do ER pro gangliosidy v lipidových raftech, na které se váže B podjednotka na cytoplazmatické membráně a tímto způsobem transportuje celý holotoxin do lumenu ER (Fujinaga *et al.*, 2003), kde je následně A1 řetězec odštěpen od zbytku komplexu pomocí enzymu PDI (proteinová disulfidizomeráza) (Tsai *et al.*, 2001).

V polarizovaných buňkách střevního epitelu se CT/LT-1 musí vázat přes GM1 na apikální membráně a aktivovat svojí katalytickou funkci až na cytosolovém povrchu bazolaterální membrány (viz obrázek 12). Nejjednodušším vysvětlením translokace obou toxinů je využití kanálu SEC61, který je součástí ERAD dráhy (Lencer, Hirst and Holmes, 1999), tedy stejné dráhy jako využívá pertusový toxin (Hazes and Read, 1997). Druhá teorie (Goins and Freire, 1985) vychází z myšlenky, že A1-peptidy CT a LT-I vykazují hydrofobní chování, proto může A1-peptid po translokaci zůstat spojený s membránou (nebo se znovu spojit s membránou) a přesunout se na bazolaterální membránu pomocí transportních sekrečních váčků. Fúze váčků nesoucích toxin dostane A-podjednotku do místa blízko endogenní adenylylcyklázy na cytosolické straně membrány a B-podjednotku k bazolaterální straně membrány enterocytu.

3.2.2 Aktivace enzymatické reakce

Po vstupu do buněčného cytosolu enzymatická podjednotka A1 katalyzuje ADP ribosylaci α-podjednotky stimulačního Gs proteinu (Gsα) (viz. obrázek 12), který zvyšuje aktivitu vlastní adenylátcyklázy hostitelské buňky (Moss and Richardson, 1978; Spangler, 1992). Tato enzymatická

reakce je alostericky aktivována tzv. ADP-ribosylačními faktory (ARF), které patří do rodiny GTPáz (Moss and Vaughan, 1995). Vazba ARF vyvolává výrazné změny v podjednotce A1, které umožní vazbu nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) na aktivní místo Gsα podjednotky adenylátcyklázového komplexu a potenciálně na další GTP-vazebné proteiny zapojené do signální transdukce (O'Neal *et al.*, 2005).



Obrázek 12: Mechanismus působení cholerového toxinu (CT) a tepelně labilního (LT) enterotoxinu *Escherichia coli* na epiteliální buňku tenkého střeva. CT nebo LT se váže na monosialogangliozidový receptor GM1 na povrchu hostitelské sliznice a spouští endocytózu holotoxinu. Al doména je transportována Golgiho komplexem do endoplazmatického retikula (ER), odkud se dostává do cytosolu pomocí ERAD dráhy. Tato doména interaguje v cytosolu s ADP-ribosylačními faktory (ARF) a Gsa podjednotkou stimulačního G-proteinu, který poté zvyšuje aktivitu adenylylcyklázy (AC). AC přeměňuje ATP na cAMP a následně aktivuje proteinovou kinázu A, která inhibuje absorpci NaCl a zvyšuje sekreci chloridu prostřednictvím transmembránového regulátoru cystické fibrózy (CFTR). Převzato a pozměněno podle (Lima and Fonteles, 2014).

Po ADP-ribosylaci zůstává adenylátcykláza ve stavu vázaném na GTP, což má za následek velkou enzymatickou adenylátcyklázovou aktivitu. To vede ke zvýšení hladiny cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) v cytosolu buňky (Basset *et al.*, 2010; Sanchez and Holmgren, 2011; Hajishengallis and Connell, 2013). Vyšší hladiny cAMP způsobují nerovnováhu v pohybu elektrolytů v epiteliální buňce střeva, protein kináza A (PKA) inhibuje absorpci Na^+ prostřednictvím (Na^+/H^+) kanálů a otevírá chloridový-kanál fosforylací transmembránového regulátoru cystické fibrózy (CFTR). Tyto změny v koncentraci elektrolytů způsobují ztrátu vody a průjem (Sears and Kaper, 1996; Viswanathan, Hodges and Hecht, 2009).

4 Závěr

Tato bakalářská práce popisuje a srovnává mechanismy interakce bakteriálních toxinů, které zvyšují hladinu vnitrobuněčného cAMP, s hostitelskou buňkou. Důraz je kladen především na molekulární strategie bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje černý kašel, velmi málo kontrolované respirační onemocnění, a to i navzdory všeobecným očkovacím programům. *B. pertussis* sekretuje dva toxiny (CyaA a PT), z nichž každý zvyšuje hladinu cAMP v cílové buňce jiným mechanismem. Konečným výsledkem je snížená fagocytóza buněk imunitního systému a snížená produkce jiných obranných mechanismů organismu během infekce (von Konig *et al.*, 2002).

Jedním z mechanismů, kterým bakteriální toxiny manipulují s hladinou cAMP v hostitelských buňkách je doprava vlastního enzymu, bakteriální adenylátcyklázy (AC), do buněčného cytosolu napadené buňky. Exogenní AC je pak aktivována nějakým kofaktorem v cytosolu hostitelské buňky. V případě dvou nejprozkoumanějších toxinů, CyaA bakterie *B. pertussis* a edemogenního faktoru bakterie *Bacillus anthracis*, je takovým kofaktorem intracelulární kalmodulin (Wolff *et al.*, 1980). Další exogenní adenylátcykláza, ExoY toxin bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, představuje novou skupinu adenylátcyklázaktivujících se eukaryotickým aktinem (Belyy *et al.*, 2018).

Druhá rodina tzv. ADP-ribosylačních toxinů využívá jinou strategii. Tyto toxiny dopravují svou enzymatickou ADP-ribosylační podjednotku do cytosolu cílové buňky, která modifikuje heterotrimerní G-proteiny. Modifikace tohoto proteinu vede k aktivaci eukaryotické adenylátcyklázy a produkci cAMP. Ve střevních epiteliálních buňkách to následně vyvolává sekreci chloridu, která je doprovázena masivním pohybem vody a následným průjmem (Spangler, 1992; Sanchez and Holmgren, 2011). Ten je charakteristickým znakem infekce způsobené bakterií *Vibrio cholerae* produkující cholerový toxin (CT) a enterotoxigenní *Escherichia coli*, která vylučuje tepelně labilní toxin (LT). Pertusový toxin (PT) produkovaný bakterií *B. pertussis* patří také do této rodiny (Beddoe *et al.*, 2010).

Základní výzkum CT a LT aktivně probíhal v 90. letech, ale za posledních 20 let existují pouze ojedinělé práce přispívající k pochopení mechanismů účinku těchto toxinů na molekulární úrovni. CyaA a ExoY jsou nyní poměrně hojně studované a studium těchto toxinů může prohloubit znalosti v oblasti mechanismů interakce bakteriálních patogenů s cílovými buňkami během infekce s možností identifikace nových antimikrobiálních cílů.

5 Seznam použité literatury

(Přehledné citace jsou označeny *)

Abrami, L. *et al.* (2003) 'Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process.', *The Journal of Cell Biology*. United States, 160(3), pp. 321–328. doi: 10.1083/jcb.200211018.

Abrami, L. *et al.* (2004) 'Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway.', *The Journal of Cell Biology*. United States, 166(5), pp. 645–651. doi: 10.1083/jcb.200312072.

Abrami, L. *et al.* (2010) 'Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors.', *PLoS Pathogens*. United States, 6(3), p. e1000792. doi: 10.1371/journal.ppat.1000792.

Abrami, L. *et al.* (2013) 'Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin.', *Cell Reports*. United States, 5(4), pp. 986–996. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.019.

Abrami, L., Kunz, B. and van der Goot, F. G. (2010) 'Anthrax toxin triggers the activation of src-like kinases to mediate its own uptake.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 107(4), pp. 1420–1424. doi: 10.1073/pnas.0910782107.

Abrami, L., Leppla, S. H. and van der Goot, F. G. (2006) 'Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis.', *The Journal of Cell Biology*. United States, 172(2), pp. 309–320. doi: 10.1083/jcb.200507067.

*Ahuja, N., Kumar, P. and Bhatnagar, R. (2004) 'The adenylate cyclase toxins.', *Critical Reviews in Microbiology*. England, 30(3), pp. 187–196. doi: 10.1080/10408410490468795.

Asada, M. *et al.* (1991) 'Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18.', *Biochemistry*. United States, 30(6), pp. 1561–1571. doi: 10.1021/bi00220a017.

Bachelet, M. *et al.* (2002) 'Mitochondrial alterations precede *Bordetella pertussis*-induced apoptosis.', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. England, 32(2), pp. 125–131. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00544.x.

Bahre, H. *et al.* (2015) 'cCMP and cUMP occur in vivo.', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. United States, 460(4), pp. 909–914. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.115.

Basar, T. *et al.* (2001) 'Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 276(1), pp. 348–354. doi: 10.1074/jbc.M006463200.

Basler, M. *et al.* (2006) 'Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes.', *Infection and Immunity*. United States, 74(4), pp. 2207–2214. doi: 10.1128/IAI.74.4.2207-2214.2006.

Basler, M. *et al.* (2007) 'Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 282(17), pp. 12419–12429. doi: 10.1074/jbc.M611226200.

*Basset, C. *et al.* (2010) 'Cholera-like enterotoxins and Regulatory T cells.', *Toxins*. Switzerland, 2(7), pp. 1774–1795. doi: 10.3390/toxins2071774.

Bastiaens, P. I. *et al.* (1996) 'Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin.', *The EMBO Journal*. England, 15(16), pp. 4246–4253.

*Beddoe, T. *et al.* (2010) 'Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins.', *Trends in Biochemical Sciences*. England, 35(7), pp. 411–418. doi: 10.1016/j.tibs.2010.02.003.

Belyy, A. *et al.* (2016) 'Actin activates *Pseudomonas aeruginosa* ExoY nucleotidyl cyclase toxin and ExoY-like effector domains from MARTX toxins.', *Nature Communications*. England, 7, p. 13582. doi: 10.1038/ncomms13582.

*Belyy, A. *et al.* (2018) 'ExoY, an actin-activated nucleotidyl cyclase toxin from *P. aeruginosa*: A minireview.', *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*. England, 149, pp. 65–71. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.12.046.

Benz, R. *et al.* (1994) 'Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli.', *The Journal of*

Biological Chemistry. United States, 269(44), pp. 27231–27239.

Benz, R. (2016) 'Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity.', *Biochimica et Biophysica Acta*. Netherlands, 1858(3), pp. 526–537. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.025.

*Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) 'Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. England, 4(7), pp. 517–529. doi: 10.1038/nrm1155.

Bogdan, J. A. *et al.* (2003) 'Identification of peptides that mimic the pertussis toxin binding site on bovine fetuin.', *Applied and Environmental Microbiology*. United States, 69(10), pp. 6272–6279. doi: 10.1128/aem.69.10.6272-6279.2003.

*Bostikova, V. and Patocka, J. (2005) 'Antrax', *Kontakt*, 7(1), pp. 133–137. Available at: https://kont.zsf.jcu.cz/artkey/knt-200501-0026.php.

Bradley, K. A. *et al.* (2001) 'Identification of the cellular receptor for anthrax toxin.', *Nature*. England, 414(6860), pp. 225–229. doi: 10.1038/n35101999.

Bumba, L. *et al.* (2010) '*Bordetella* adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps.', *PLoS Pathogens*. United States, 6(5), p. e1000901. doi: 10.1371/journal.ppat.1000901.

Bumba, L. *et al.* (2016) 'Calcium-Driven Folding of RTX Domain beta-Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts.', *Molecular Cell*. United States, 62(1), pp. 47–62. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.018.

*Carbonetti, N. H. (2010) 'Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools.', *Future Microbiology*. England, 5(3), pp. 455–469. doi: 10.2217/fmb.09.133.

Carbonetti, N. H. (2016) '*Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment.', *Current Opinion in Infectious Diseases*. United States, 29(3), pp. 287–294. doi: 10.1097/QCO.0000000000000264.

Cerny, O. *et al.* (2015) '*Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase.', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 194(10), pp. 4901–4913. doi: 10.4049/jimmunol.1402941.

Chenal, A. *et al.* (2009) 'RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 284(3), pp. 1781–1789. doi: 10.1074/jbc.M807312200.

*Chenal, A. and Ladant, D. (2018) 'Bioengineering of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Antigen-Delivery and Immunotherapy.', *Toxins*. Switzerland, 10(7). doi: 10.3390/toxins10070302.

*Collier, R. J. (2009) 'Membrane translocation by anthrax toxin.', *Molecular Aspects of Medicine*. England, 30(6), pp. 413–422. doi: 10.1016/j.mam.2009.06.003.

Connell, T. D. (2007) 'Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins.', *Expert Review of Vaccines*. England, 6(5), pp. 821–834. doi: 10.1586/14760584.6.5.821.

Connell, T. D. and Holmes, R. K. (1995) 'Mutational analysis of the ganglioside-binding activity of the type II *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT-IIb.', *Molecular Microbiology*. England, 16(1), pp. 21–31. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02388.x.

Dal Molin, F. *et al.* (2006) 'Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin.', *The EMBO Journal*. England, 25(22), pp. 5405–5413. doi: 10.1038/sj.emboj.7601408.

Du, D. *et al.* (2014) 'Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump.', *Nature*. England, 509(7501), pp. 512–515. doi: 10.1038/nature13205.

Ebrahimi, C. M. *et al.* (2011) 'Contribution of lethal toxin and edema toxin to the pathogenesis of anthrax meningitis.', *Infection and Immunity*. United States, 79(7), pp. 2510–2518. doi: 10.1128/IAI.00006-11.

El-Azami-El-Idrissi, M. *et al.* (2003) 'Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 278(40), pp. 38514–38521. doi: 10.1074/jbc.M304387200.

*Fedele, G. *et al.* (2017) 'Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity.', *Toxins*. Switzerland, 9(10). doi: 10.3390/toxins9100293.

Fiser, R. *et al.* (2007) 'Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 282(5), pp. 2808–2820. doi: 10.1074/jbc.M609979200.

*Friebe, S., van der Goot, F. G. and Burgi, J. (2016) 'The Ins and Outs of Anthrax Toxin.', *Toxins*. Switzerland, 8(3). doi: 10.3390/toxins8030069.

Fujinaga, Y. *et al.* (2003) 'Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulm.', *Molecular Biology of the Cell*. United States, 14(12), pp. 4783–4793. doi: 10.1091/mbc.e03-06-0354.

Fukuta, S. *et al.* (1988) 'Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb.', *Infection and Immunity*. United States, 56(7), pp. 1748–1753.

*Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. W. (2013) '*Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses.', *Pathogens and Disease*. United States, 67(3), pp. 159–173. doi: 10.1111/2049-632X.12033.

Gill, D. M. *et al.* (1981) 'Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.', *Infection and Immunity*. United States, 33(3), pp. 677–682.

Goins, B. and Freire, E. (1985) 'Lipid phase separations induced by the association of cholera toxin to phospholipid membranes containing ganglioside GM1.', *Biochemistry*. United States, 24(7), pp. 1791–1797. doi: 10.1021/bi00328a033.

Guermonprez, P. *et al.* (2001) 'The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18).', *The Journal of Experimental Medicine*. United States, 193(9), pp. 1035–1044. doi: 10.1084/jem.193.9.1035.

*Guichard, A., Nizet, V. and Bier, E. (2012) 'New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses.', *Microbes and Infection*. France, 14(2), pp. 97–118. doi: 10.1016/j.micinf.2011.08.016.

Guo, Q. *et al.* (2005) 'Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase toxin with calmodulin.', *The EMBO Journal*. England, 24(18), pp. 3190–3201. doi: 10.1038/sj.emboj.7600800.

Guo, Q. *et al.* (2008) 'Protein-protein docking and analysis reveal that two homologous bacterial adenylyl cyclase toxins interact with calmodulin differently.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 283(35), pp. 23836–23845. doi: 10.1074/jbc.M802168200.

*Hajishengallis, G. and Connell, T. D. (2013) 'Type II heat-labile enterotoxins: structure, function, and immunomodulatory properties.', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Netherlands, 152(1–2), pp. 68–77. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.034.

Hammamieh, R. *et al.* (2008) 'Activity of the *Bacillus anthracis* 20 kDa protective antigen component.', *BMC Infectious Diseases*. England, 8, p. 124. doi: 10.1186/1471-2334-8-124.

Hasan, S. *et al.* (2015) 'Interaction of *Bordetella* adenylate cyclase toxin with complement receptor 3 involves multivalent glycan binding.', *FEBS Letters*. England, 589(3), pp. 374–379. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.023.

*Hauser, A. R. (2009) 'The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection.', *Nature Reviews. Microbiology*. England, 7(9), pp. 654–665. doi: 10.1038/nrmicro2199.

Hausman, S. Z. and Burns, D. L. (1992) 'Interaction of pertussis toxin with cells and model membranes.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 267(19), pp. 13735–13739.

Hazes, B. *et al.* (1996) 'Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor.', *Journal of Molecular Biology*. England, 258(4), pp. 661–671. doi: 10.1006/jmbi.1996.0277.

*Hazes, B. and Read, R. J. (1997) 'Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells.', *Biochemistry*. United States, 36(37), pp. 11051–11054. doi: 10.1021/bi971383p.

Hewlett, E. L., Donato, G. M. and Gray, M. C. (2006) 'Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP!', *Molecular Microbiology*. England, 59(2), pp. 447–459. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04958.x.

*Holbourn, K. P., Shone, C. C. and Acharya, K. R. (2006) 'A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins.', *The FEBS Journal*. England, 273(20), pp. 4579–4593. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05442.x.

Hsia, J. A. *et al.* (1985) 'Amino acid-specific ADP-ribosylation. Sensitivity to hydroxylamine of

[cysteine(ADP-ribose)]protein and [arginine(ADP-ribose)]protein linkages.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 260(30), pp. 16187–16191.

Jiang, J. *et al.* (2015) 'Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation.', *Nature*. England, 521(7553), pp. 545–549. doi: 10.1038/nature14247.

*Kalamas, A. G. (2004) 'Anthrax.', *Anesthesiology Clinics of North America*. United States, 22(3), pp. 533–40, vii. doi: 10.1016/j.atc.2004.05.009.

Karst, J. C. *et al.* (2012) 'Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 287(12), pp. 9200–9212. doi: 10.1074/jbc.M111.316166.

Kaslow, H. R. *et al.* (1987) 'Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin.', *Biochemistry*. United States, 26(1), pp. 123–127. doi: 10.1021/bi00375a018.

*Kato, I. (1991) 'Bacterial ADP-ribosylating toxins: molecular structures and signal transducing functions.', *Microbiology and Immunology*. Australia, 35(5), pp. 349–359. doi: 10.1111/j.1348-0421.1991.tb01565.x.

Khanppnavar, B. and Datta, S. (2018) 'Crystal structure and substrate specificity of ExoY, a unique T3SS mediated secreted nucleotidyl cyclase toxin from *Pseudomonas aeruginosa*.', *Biochimica et Biophysica acta. General Subjects*. Netherlands, 1862(9), pp. 2090–2103. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.05.021.

von Konig, C. H. W. *et al.* (2002) 'Pertussis of adults and infants.', *The Lancet. Infectious Diseases*. United States, 2(12), pp. 744–750. doi: 10.1016/s1473-3099(02)00452-8.

Krantz, B. A. *et al.* (2005) 'A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 309(5735), pp. 777–781. doi: 10.1126/science.1113380.

*Ladant, D. and Ullmann, A. (1999) '*Bordatella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents.', *Trends in Microbiology*. England, 7(4), pp. 172–176. doi: 10.1016/s0966-842x(99)01468-7.

*Lencer, W. I., Hirst, T. R. and Holmes, R. K. (1999) 'Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin.', *Biochimica et Biophysica Acta*. Netherlands, 1450(3), pp. 177–190. doi: 10.1016/s0167-4889(99)00070-1.

Lenders, M. H. H. *et al.* (2015) 'Directionality of substrate translocation of the hemolysin A Type I secretion system.', *Scientific Reports*. England, 5, p. 12470. doi: 10.1038/srep12470.

Letoffe, S., Delepelaire, P. and Wandersman, C. (1996) 'Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding.', *The EMBO Journal*. England, 15(21), pp. 5804–5811.

Lima, A. A. M. and Fonteles, M. C. (2014) 'From *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to mammalian endogenous guanylin hormones.', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*. Brazil, 47(3), pp. 179–191. doi: 10.1590/1414-431X20133063.

Liu, S. *et al.* (2009) 'Capillary morphogenesis protein-2 is the major receptor mediating lethality of anthrax toxin in vivo.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 106(30), pp. 12424–12429. doi: 10.1073/pnas.0905409106.

*Liu, S., Moayeri, M. and Leppla, S. H. (2014) 'Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis.', *Trends in Microbiology*. England, 22(6), pp. 317–325. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.012.

*Locht, C., Coutte, L. and Mielcarek, N. (2011) 'The ins and outs of pertussis toxin.', *The FEBS Journal*. England, 278(23), pp. 4668–4682. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08237.x.

*Lowe, D. E. and Glomski, I. J. (2012) 'Cellular and physiological effects of anthrax exotoxin and its relevance to disease.', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Switzerland, 2, p. 76. doi: 10.3389/fcimb.2012.00076.

*Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. (2002) 'Lung infections associated with cystic fibrosis.', *Clinical Microbiology Reviews*. United States, 15(2), pp. 194–222. doi: 10.1128/cmr.15.2.194-222.2002.

Mancl, J. M. *et al.* (2020) '*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y directly bundles actin filaments.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 295(11), pp. 3506–3517. doi: 10.1074/jbc.RA119.012320.

*Mangmool, S. and Kurose, H. (2011) 'G(i/o) protein-dependent and -independent actions of *Pertussis Toxin* (PTX).', *Toxins*. Switzerland, 3(7), pp. 884–899. doi: 10.3390/toxins3070884.

Masin, J. *et al.* (2005) 'Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate

cyclase on CD11b-expressing cells.', *Biochemistry*. United States, 44(38), pp. 12759–12766. doi: 10.1021/bi050459b.

*Masin, J. *et al.* (2015) '*Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme.', *Pathogens and Disease*. United States, 73(8), p. ftv075. doi: 10.1093/femspd/ftv075.

Masin, J. *et al.* (2017) 'The conserved tyrosine residue 940 plays a key structural role in membrane interaction of *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *Scientific Reports*. England, 7(1), p. 9330. doi: 10.1038/s41598-017-09575-6.

Masure, H. R. *et al.* (1990) 'Secretion of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase from Escherichia coli containing the hemolysin operon.', *Biochemistry*. United States, 29(1), pp. 140–145. doi: 10.1021/bi00453a017.

*McDonough, K. A. and Rodriguez, A. (2011) 'The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword.', *Nature Reviews. Microbiology*. England, 10(1), pp. 27–38. doi: 10.1038/nrmicro2688.

*Melvin, J. A. *et al.* (2014) '*Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges.', *Nature Reviews. Microbiology*. England, 12(4), pp. 274–288. doi: 10.1038/nrmicro3235.

Meselson, M. *et al.* (1994) 'The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 266(5188), pp. 1202–1208. doi: 10.1126/science.7973702.

Morova, J. *et al.* (2008) 'RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 105(14), pp. 5355–5360. doi: 10.1073/pnas.0711400105.

Morrow, K. A. *et al.* (2015) 'Heterogeneity of pulmonary endothelial cyclic nucleotide response to *Pseudomonas aeruginosa* ExoY infection.', *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. United States, 309(10), pp. L1199-207. doi: 10.1152/ajplung.00165.2015.

Morrow, K. A. *et al.* (2017) 'The *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme Y: A Promiscuous Nucleotidyl Cyclase Edema Factor and Virulence Determinant.', *Handbook of Experimental Pharmacology*. Germany, 238, pp. 67–85. doi: 10.1007/164_2016_5003.

Moss, J. and Richardson, S. H. (1978) 'Activation of adenylate cyclase by heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of choleragen.', *The Journal of Clinical Investigation*. United States, 62(2), pp. 281–285. doi: 10.1172/JCI109127.

Moss, J. and Vaughan, M. (1995) 'Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 270(21), pp. 12327–12330. doi: 10.1074/jbc.270.21.12327.

*Novak, J. *et al.* (2017) 'Structure-Function Relationships Underlying the Capacity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes.', *Toxins*. Switzerland, 9(10). doi: 10.3390/toxins9100300.

O'Neal, C. J. *et al.* (2005) 'Structural basis for the activation of cholera toxin by human ARF6-GTP.', *Science (New York, N.Y.)*. United States, 309(5737), pp. 1093–1096. doi: 10.1126/science.1113398.

Osicka, R. *et al.* (2015) '*Bordetella* adenylate cyclase toxin is a unique ligand of the integrin complement receptor 3.', *eLife*. England, 4, p. e10766. doi: 10.7554/eLife.10766.

Osickova, A. *et al.* (2010) 'Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore.', *Molecular Microbiology*. England, 75(6), pp. 1550–1562. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07077.x.

*Ostolaza, H. *et al.* (2019) 'Membrane Permeabilization by Pore-Forming RTX Toxins: What Kind of Lesions Do These Toxins Form?', *Toxins*. Switzerland, 11(6). doi: 10.3390/toxins11060354.

Otero, A. S. *et al.* (1995) 'Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 270(17), pp. 9695–9697. doi: 10.1074/jbc.270.17.9695.

Pande, A. H. *et al.* (2006) 'The pertussis toxin S1 subunit is a thermally unstable protein susceptible to degradation by the 20S proteasome.', *Biochemistry*. United States, 45(46), pp. 13734–13740. doi: 10.1021/bi061175+.

Parton, R. G. (1994) 'Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae.', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*. United States, 42(2), pp. 155–166. doi: 10.1177/42.2.8288861.

Rainey, G. J. A. *et al.* (2005) 'Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States,

102(37), pp. 13278–13283. doi: 10.1073/pnas.0505865102.

*Rocha, G. *et al.* (2015) 'Pertussis in the newborn: certainties and uncertainties in 2014.', *Paediatric Respiratory Reviews*. England, 16(2), pp. 112–118. doi: 10.1016/j.prrv.2014.01.004.

Roderova, J. *et al.* (2019) 'Residues 529 to 549 participate in membrane penetration and pore-forming activity of the *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *Scientific Reports*. England, 9(1), p. 5758. doi: 10.1038/s41598-019-42200-2.

Rogel, A. and Hanski, E. (1992) 'Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 267(31), pp. 22599–22605.

Rose, T. *et al.* (1995) 'Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 270(44), pp. 26370–26376. doi: 10.1074/jbc.270.44.26370.

*Sadikot, R. T. *et al.* (2005) 'Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. United States, 171(11), pp. 1209–1223. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO.

*Sanchez, J. and Holmgren, J. (2011) 'Cholera toxin - a foe & a friend.', *The Indian Journal of Medical Research*. India, 133, pp. 153–163.

Sayner, S. L. *et al.* (2004) 'Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY.', *Circulation Research*. United States, 95(2), pp. 196–203. doi: 10.1161/01.RES.0000134922.25721.d9.

*Scanlon, K., Skerry, C. and Carbonetti, N. (2019) 'Association of Pertussis Toxin with Severe Pertussis Disease.', *Toxins*. Switzerland, 11(7). doi: 10.3390/toxins11070373.

Schneider, O. D., Weiss, A. A. and Miller, W. E. (2007) 'Pertussis toxin utilizes proximal components of the T-cell receptor complex to initiate signal transduction events in T cells.', *Infection and Immunity*. United States, 75(8), pp. 4040–4049. doi: 10.1128/IAI.00414-07.

Scobie, H. M. *et al.* (2003) 'Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 100(9), pp. 5170–5174. doi: 10.1073/pnas.0431098100.

Sears, C. L. and Kaper, J. B. (1996) 'Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion.', *Microbiological Reviews*. United States, 60(1), pp. 167–215.

Shen, Y. *et al.* (2005) 'Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor.', *The EMBO Journal*. England, 24(5), pp. 929–941. doi: 10.1038/sj.emboj.7600574.

Sindt, K. A. *et al.* (1994) 'Pertussis toxin activates platelets through an interaction with platelet glycoprotein Ib.', *Infection and Immunity*. United States, 62(8), pp. 3108–3114.

Smith, N. *et al.* (2006) 'Crystallization of the class IV adenylyl cyclase from *Yersinia pestis*.', *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*. England, 62(Pt 3), pp. 200–204. doi: 10.1107/S1744309106002855.

*Solans, L. and Locht, C. (2018) 'The Role of Mucosal Immunity in Pertussis.', *Frontiers in Immunology*. Switzerland, 9, p. 3068. doi: 10.3389/fimmu.2018.03068.

Soong, G. *et al.* (2008) 'The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function.', *Journal of Bacteriology*. United States, 190(8), pp. 2814–2821. doi: 10.1128/JB.01567-07.

*Sotomayor-Perez, A.-C., Ladant, D. and Chenal, A. (2014) 'Disorder-to-order transition in the CyaA toxin RTX domain: implications for toxin secretion.', *Toxins*. Switzerland, 7(1), pp. 1–20. doi: 10.3390/toxins7010001.

*Spangler, B. D. (1992) 'Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.', *Microbiological Reviews*. United States, 56(4), pp. 622–647.

Springer, T. I. *et al.* (2017) 'Interaction with adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* affects the metal binding properties of calmodulin.', *FEBS Open Bio*. England, 7(1), pp. 25–34. doi: 10.1002/2211-5463.12138.

Stein, P. E., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Heerze, L. D., *et al.* (1994) 'Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding.', *Nature Structural Biology*. United States, 1(9), pp. 591–596. doi: 10.1038/nsb0994-591.

Stein, P. E., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Cockle, S. A., *et al.* (1994) 'The crystal structure of pertussis

toxin.', *Structure (London, England : 1993)*. United States, 2(1), pp. 45–57. doi: 10.1016/s0969-2126(00)00007-1.

Strnad, C. F. and Carchman, R. A. (1987) 'Human T lymphocyte mitogenesis in response to the B oligomer of pertussis toxin is associated with an early elevation in cytosolic calcium concentrations.', *FEBS Letters*. England, 225(1–2), pp. 16–20. doi: 10.1016/0014-5793(87)81123-7.

Subrini, O. *et al.* (2013) 'Characterization of a membrane-active peptide from the *Bordetella pertussis* CyaA toxin.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 288(45), pp. 32585–32598. doi: 10.1074/jbc.M113.508838.

Sukova, A. *et al.* (2020) 'Negative charge of the AC-to-Hly linking segment modulates calcium-dependent membrane activities of *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. Netherlands, 1862(9), p. 183310. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183310.

Tamura, M. *et al.* (1982) 'Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model.', *Biochemistry*. United States, 21(22), pp. 5516–5522. doi: 10.1021/bi00265a021.

*Tang, W.-J. and Guo, Q. (2009) 'The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor.', *Molecular Aspects of Medicine*. England, 30(6), pp. 423–430. doi: 10.1016/j.mam.2009.06.001.

Tauschek, M. *et al.* (2002) 'Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 99(10), pp. 7066–7071. doi: 10.1073/pnas.092152899.

Tessmer, M. H. *et al.* (2017) 'Cooperative Substrate-Cofactor Interactions and Membrane Localization of the Bacterial Phospholipase A2 (PLA2) Enzyme, ExoU.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 292(8), pp. 3411–3419. doi: 10.1074/jbc.M116.760074.

*Teter, K. (2019) 'Intracellular Trafficking and Translocation of Pertussis Toxin.', *Toxins*. Switzerland, 11(8). doi: 10.3390/toxins11080437.

Tsai, B. *et al.* (2001) 'Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin.', *Cell*. United States, 104(6), pp. 937–948. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00289-6.

Ulmer, T. S. *et al.* (2003) 'Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor.', *The Journal of Biological Chemistry*. United States, 278(31), pp. 29261–29266. doi: 10.1074/jbc.M302837200.

Uribe, K. B. *et al.* (2013) 'Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain.', *PloS One*. United States, 8(6), p. e67648. doi: 10.1371/journal.pone.0067648.

*Viswanathan, V. K., Hodges, K. and Hecht, G. (2009) 'Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea.', *Nature Reviews. Microbiology*. England, 7(2), pp. 110–119. doi: 10.1038/nrmicro2053.

Voegele, A. *et al.* (2017) 'Membrane-Active Properties of an Amphitropic Peptide from the CyaA Toxin Translocation Region.', *Toxins*. Switzerland, 9(11). doi: 10.3390/toxins9110369.

Vojtova-Vodolanova, J. *et al.* (2009) 'Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. United States, 23(9), pp. 2831–2843. doi: 10.1096/fj.09-131250.

Vojtova, J. *et al.* (2006) '*Bordetella* adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes.', *Microscopy Research and Technique*. United States, 69(2), pp. 119–129. doi: 10.1002/jemt.20277.

*Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2006) '*Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense.', *Current Opinion in Microbiology*. England, 9(1), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.mib.2005.12.011.

Wald, T. *et al.* (2014) 'Quantification of potassium levels in cells treated with *Bordetella* adenylate cyclase toxin.', *Analytical Biochemistry*. United States, 450, pp. 57–62. doi: 10.1016/j.ab.2013.10.039.

Wang, J. *et al.* (2009) 'Functions of phenylalanine residues within the beta-barrel stem of the anthrax toxin pore.', *PloS One*. United States, 4(7), p. e6280. doi: 10.1371/journal.pone.0006280.

Wang, Z. Y. *et al.* (2006) 'Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways.', *Experimental Hematology*. Netherlands, 34(8), pp. 1115–1124. doi: 10.1016/j.exphem.2006.04.025.

Winkelman, J. D. *et al.* (2014) 'Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-bundled F-actin networks with Fascin.', *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America. United States, 111(11), pp. 4121–4126. doi: 10.1073/pnas.1322093111.

Wolff, J. *et al.* (1980) 'Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 77(7), pp. 3841–3844. doi: 10.1073/pnas.77.7.3841.

Worthington, Z. E. V and Carbonetti, N. H. (2007) 'Evading the proteasome: absence of lysine residues contributes to pertussis toxin activity by evasion of proteasome degradation.', *Infection and Immunity*. United States, 75(6), pp. 2946–2953. doi: 10.1128/IAI.02011-06.

Yahr, T. L. *et al.* (1998) 'ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States, 95(23), pp. 13899–13904. doi: 10.1073/pnas.95.23.13899.

Yang, J., Mou, J. and Shao, Z. (1994) 'Structure and stability of pertussis toxin studied by in situ atomic force microscopy.', *FEBS Letters*. England, 338(1), pp. 89–92. doi: 10.1016/0014-5793(94)80122-3.

Yeung, K. H. T. *et al.* (2017) 'An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study.', *The Lancet. Infectious Diseases*. United States, 17(9), pp. 974–980. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30390-0.

*Young, J. A. T. and Collier, R. J. (2007) 'Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation.', *Annual Review of Biochemistry*. United States, 76, pp. 243–265. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142728.

Zhang, R. G. *et al.* (1995) 'The three-dimensional crystal structure of cholera toxin.', *Journal of Molecular Biology*. England, 251(4), pp. 563–573. doi: 10.1006/jmbi.1995.0456.

Zhang, S. *et al.* (2004) 'Protein translocation through anthrax toxin channels formed in planar lipid bilayers.', *Biophysical Journal*. United States, 87(6), pp. 3842–3849. doi: 10.1529/biophysj.104.050864.

Ziolo, K. J. *et al.* (2014) '*Vibrio vulnificus* biotype 3 multifunctional autoprocessing RTX toxin is an adenylate cyclase toxin essential for virulence in mice.', *Infection and Immunity*. United States, 82(5), pp. 2148–2157. doi: 10.1128/IAI.00017-14.

Internetové zdroje

https://yahr.lab.uiowa.edu/projects