

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie



Jan Poledňák

Mechanismy a aplikace translokace makromolekul přes membrány eukaryotických buněk
účinkem bakteriálních toxinů

Mechanisms and applications of macromolecule translocation across membranes of eukaryotic
cells by bacterial toxins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 13.5.2016

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat především svému školiteli RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za cenné rady, inspiraci a odborné vedení při psaní této práce. Také bych rád poděkoval všem členům Laboratoře fyziologie bakterií na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za vřelé přijetí a za pomoc a rady při experimentální práci. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Mechanismy translokace přes plazmatickou membránu eukaryotických buněk jsou důležitým faktorem virulence patogenních bakterií způsobujících onemocnění eukaryotickým organismům. Toxiny translokují své vlastní domény s toxickou aktivitou dovnitř buňky nebo vytvoří v její membráně pór, kterým mohou procházet další molekuly od iontů až po DNA, RNA nebo proteiny. Výzkum translokace těchto látek umožňuje charakterizovat mechanismus translokace a také i vlastnosti pórotvorných toxinů. Několik těchto toxinů je natolik podrobně popsáno, že po cílené mutagenězi se dají využívat pro určování vlastností molekul, které jejich póry prochází. Jednou z takových aplikací je cílená doprava léčiv do rakovinných buněk pomocí Shiga toxinu nebo měření průchodu nukleotidů i celých vláken nukleových kyselin přes membránový kanál vytvářený α -hemolysinem *S. aureus*. Tato metoda si v současné době našla uplatnění při sekvenaci DNA.

Klíčová slova: translokace, bakteriální toxiny, plasmatická membrána, nanopórové sekvenování

Abstract

The bacterial protein toxins endowed with the ability to translocate across the plasmatic membrane are often crucial virulence factors of pathogenic bacteria invading eukaryotic organisms. These toxins translocate either their own protein domains carrying toxic activity or can form pores transferring other substances like small ions, DNA, RNA or proteins. By observing the translocation of these molecules together with other artificially prepared agents on synthetic membranes it allows detailed understanding of mode of action of individual pore-forming toxins. Some of the toxins were actually described in such a detail that can serve as tools for drug delivery or characterization of new translocated molecules. One of such examples is the transfer of nucleotides or the whole nucleic acid molecules across the membrane pore of *S. aureus* α -hemolysine. Nowadays, this application is commercially used for DNA sequencing.

Keywords: translocation, bacterial toxins, plasmatic membrane, nanopore sequencing

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
2. Jednomolekulový systém translokace toxinu	8
3. Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů	10
3.1 Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha	11
3.2 Shiga toxin	12
3.3 Difterický toxin	15
3.4 Botulotoxin	16
4. In vitro systémy pro výzkum translokace	18
4.1 α -hemolysin	18
4.2 Nanopórové sekvenování	21
4.2.1 Biologické nanopóry	22
4.2.2 Nanopóry v pevné membráně	22
4.2.3 Hybridní nanopóry	22
4.2.4 Detekce a záznam signálu	24
4.3 Studium sekundárních struktur proteinů	25
4.4 Antraxový toxin	26
4.5 Cílená distribuce léčiv do rakovinných buněk	30
5. Závěr	31
6. Použitá literatura	32

Seznam použitých zkratek

- α -HL – α -hemolysin (*Staphylococcus aureus*)
- AC – adenylát-cyklázová doména adenylát cyklázového toxinu
- ADAM 10 – disintegrin a metaloproteáza 10 (a disintegrin and metalloprotease 10)
- ATP – adenosintrifosfát
- BLM - černé lipidické membrány
- CaM - kalmodulin
- cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
- ClpX – kaseinolytická peptidáza
- COPI – komplex obalových proteinů I (coat protein complex I)
- CyaA – adenylát cyklázový toxin (*Bordetella pertussis*)
- DIB - dvojvrstva na rozhraní kapičky
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DTRAP 27 – protein 27 asociovaný s receptorem pro difterický toxin (diphtheria toxin receptor associated protein 27)
- EF – edémový faktor (*Bacillus anthracis*)
- Gb3 – globotriaosylceramid
- GM1 – monosialotetrahexosylgangliosid
- GTP – guanosintrifosfát
- HlyA – α -hemolysin (*Escherichia coli*)
- LF – letální faktor (*Bacillus anthracis*)
- M_r – molekulová hmotnost
- p38 MAPK – protein kináza aktivovaná mitogenem
- PA – protektivní antigen (*Bacillus anthracis*)
- PDI – protein disulfid isomeráza
- cPLA2 α – cytosolická fosfolipáza A2 α
- PKC δ – protein kináza C delta
- ProHB-EGF – prekurzor pro epidermální růstový faktor vázající hemoglobin
- RNA – ribonukleová kyselina
- RTX toxiny – označení skupiny toxinů (Repeats in ToXins)
- SDS – Dodecylsírán sodný

SNARE protein – receptor pro transportní proteiny v buňce (Soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) Attachment Protein Receptor)

Syk – tyrosinová kináza (spleen tyrosin kinase)

TISS – sekrece typu I (Type I Secretion System)

1. Úvod

Bakteriální toxiny schopné translokace přes eukaryotickou membránu jsou důležitým virulentním faktorem. Naše laboratoř se věnuje výzkumu pórotvorných toxinů jako jsou adenylát cyklázový toxin (CyaA) (*Bordetella pertussis*), α -hemolysin (HlyA) (*Escherichia coli*), α -hemolysin (α -HL, *Staphylococcus aureus*), exotoxin ApxIA (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) a kolicin U (*Shigella boydii*). Proto bych se v této práci chtěl zaměřit na mechanismy translokace látek přes buněčné membrány a dalšímu aplikovanému využití translokace na umělých membránách. V poslední době se podobných toxinů využívá pro dopravu antigenů do buněk imunitního systému, pro sledování translokace makromolekul (sítě kapiček a hydrogelu) a dokonce i pro sekvenování DNA a RNA.

Cílem této práce je stručně shrnout vědomosti o mechanismech translokace makromolekulárních látek (jako jsou proteiny, nukleové kyseliny nebo oligosacharidy) přes fosfolipidovou membránu eukaryotních buněk a jejich možných aplikacích. Systémy in vitro založené na vlastnostech těchto toxinů jsou využívány i pro charakterizaci přenášených molekul a objasnění mechanismu působení použitých toxinů na úrovni základního výzkumu.

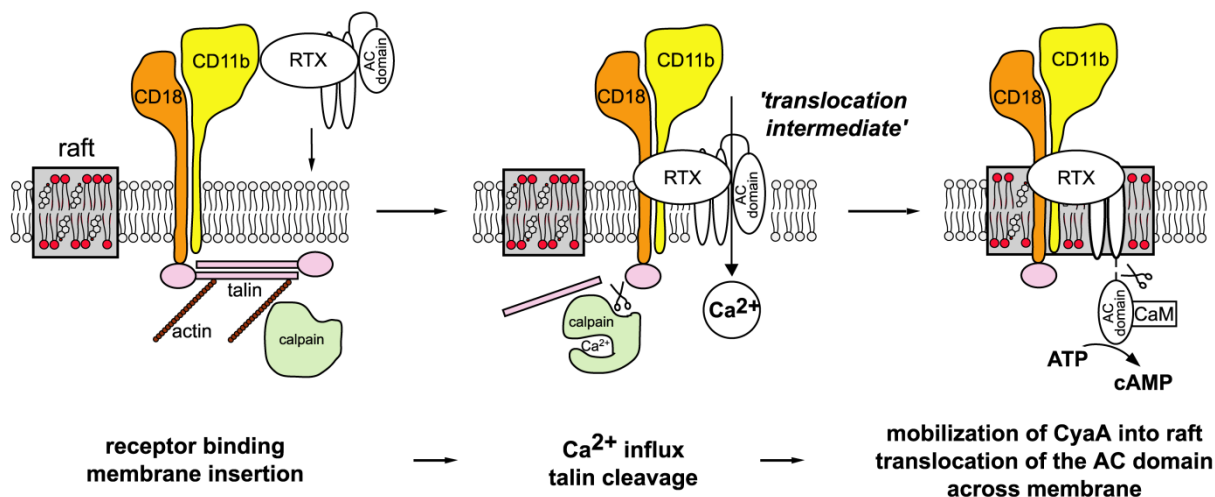
2. Jednomolekulový systém translokace toxinu

Do této skupiny se dají zařadit toxiny skládající se pouze z jedné podjednotky, která má vazebnou, translokační i enzymatickou aktivitu na jednom řetězci. Nejvýznamnějším členem této skupiny je adenylát-cyklázový toxin.

Adenylát-cyklázový (CyaA) toxin je významným faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis* jako původce černého kašle. Protein je složen z 1706 aminokyselin. Adenylát-cyklázová doména (AC) se nachází na N-konci a je dlouhá 400 aminokyselin a na C-konci je 1306 aminokyselin dlouhá hemolysinová doména. Mezi residui 500 a 750 se nachází hydrofobní segmenty, které zaujímají α -helikální strukturu, aby se vnořily do membrány a přitom vytvořily póry, které selektivně propouští kationty. Tyto póry jsou odpovědné za hemolytickou aktivitu toxinu. C-konec (aminokyseliny 1000 až 1706) je zodpovědný za vazbu toxinu na specifický receptor cílové buňky – $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18) (Guermontprez et al., 2001). V této oblasti (residua 1014 – 1613) se také nachází přibližně 40 kopií vazebných míst pro vápenaté ionty, které jsou rozděleny do 5 bloků nonapeptidových repeticí, které jsou charakteristické pro RTX (Repeats in ToXin) toxiny. RTX toxiny jsou klasifikovány jako

toxiny, které obsahují nonapeptidovou konsensus sekvenci v různém počtu opakování (6-50) na C-konci proteinu. Tato sekvence je bohatá na glycin a aspartátu a váže vápník. Poslední dva bloky repetitivní byly v Laboratoři fyziologie bakterií krystalizovány a vytvářejí strukturu typickou pro RTX proteiny, takzvaný β -roll (Bumba et al., 2016). CyaA toxin je exprimován ve formě neaktivního prekurzoru, který je aktivován specifickou acylací dvou lysinů – Lys⁸⁶⁰ a Lys⁹⁸³ (Barry et al., 1991). Následně je sekretován sekrečním systémem typu I (TISS) přes cytoplasmatickou a vnější membránu bakterie. Toxin se v hostiteli váže na myeloidní fagocytické buňky exprimující $\alpha_M\beta_2$ integrin CD11b/CD18. Tento toxin je unikátní tím, že je schopen invaze i přes to, že integrin není přítomen v buňce, i když s asi 100krát menší účinností (Eby et al., 2010). Proces translokace enzymatické domény je závislý na přítomnosti vápenatých iontů a negativním membránovém potenciálu (Otero et al., 1995; Rogel a Hanski, 1992; Veneziano et al., 2013).

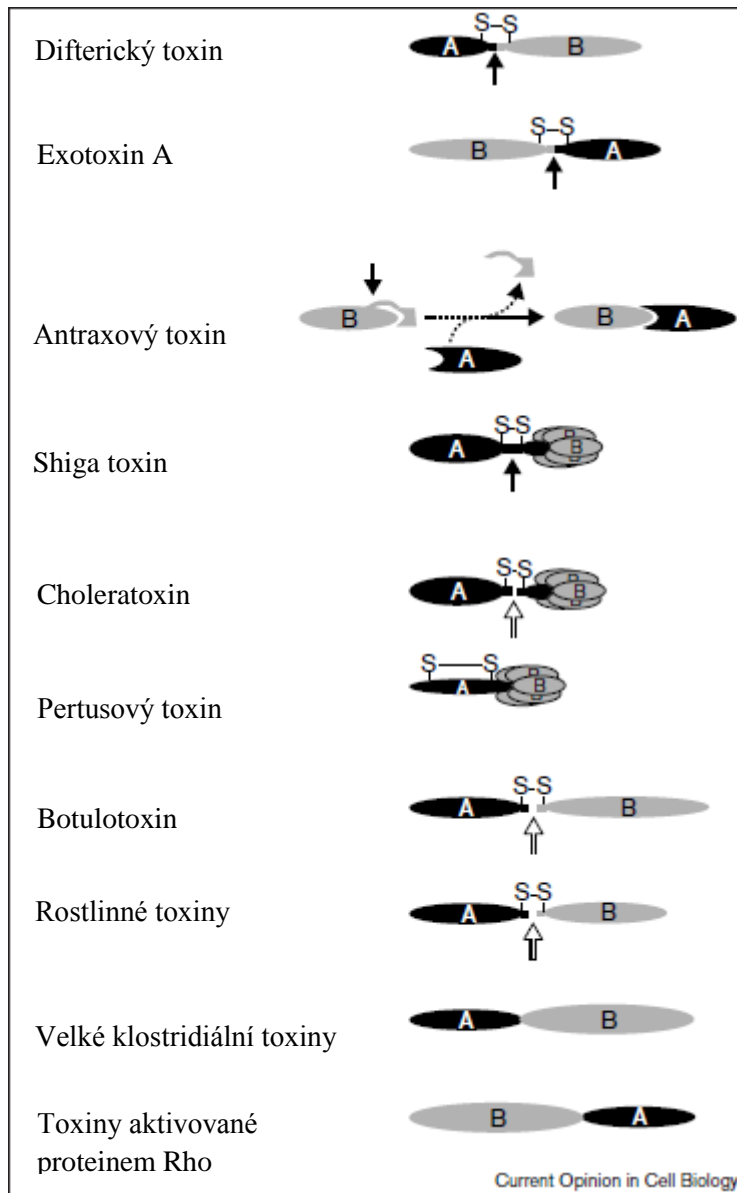
CyaA toxin se váže na integrinový receptor CD11b/CD18 v cytoplasmatické membráně makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk. Tento receptor je rozptýlen v membráně mimo lipidické rafty a má cytoplasmatický konec podjednotky CD18 navázaný na aktinové řetězce přes propojující protein talin. Po vazbě na receptor se translokační intermediát CyaA toxinu zanoří do lipidické dvojvrstvy buněčné membrány. Translokační intermediát je označen stavu, kdy je do lipidické dvojvrstvy zasunuta částečně AC doména spolu s pórtvorným segmentem, který se podílí na vytvoření přechodně otevřené dráhy pro Ca^{2+} skrz buněčnou membránu. Přísun iontů Ca^{2+} z vnějšího prostředí má za následek aktivaci proteáz závislých na Ca^{2+} (kalpainů) nacházejících se v cytosolu buňky, které odštěpí komplex CyaA-CD11b/CD18 od aktinového vlákna. V důsledku odštěpení se tento komplex přesune do lipidového raftu s vysokým obsahem cholesterolu, kde je translokace AC domény přes buněčnou membránu dokončena. V cytosolu může být AC doména odštěpena kalpainem od hemolysinové domény (Uribe et al., 2013). Odštěpení AC domény není podstatné pro spuštění aktivity, ale pouze určí, zda bude AC doména volně v cytosolu nebo bude stále navázaná na hemolysinovou doménu. Následná vazba kalmodulinu (CaM) spustí AC enzymatickou aktivitu – neregulovatelnou přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Obr. 1) (Bumba et al., 2010).



Obr. 1 Translokace CyaA přes buněčnou membránu. Prvním krokem je vazba na integrinový receptor CD11b/CD18, který se nachází mimo lipidický raft a CD18 je navázaná na aktinový cytoskelet pomocí linkeru proteinu talin. Poté dojde k zasunutí translokačního intermediátu do membrány, následný přísun Ca²⁺ z vnějšího prostředí vede k aktivaci kalpainu, který odštěpí komplex CyaA-CD11b/CD18 od aktinového vlákna. Po odštěpení se tento komplex přemístí do lipidického raftu s vysokým obsahem cholesterolu, ve kterém je dokončena translokace AC domény. Po navázání CaM je spuštěna enzymatická aktivita AC domény (Bumba et al., 2010).

3. Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů

AB toxiny se skládají ze dvou podjednotek (Obr. 2). Podjednotka A s toxickou aktivitou vede ke změně fyziologie buňky nebo až k její smrti. Podjednotka B zajišťuje navázání toxinu k receptoru na plazmatické membráně a může hrát roli i při translokaci podjednotky A do cytosolu cílové buňky. Mezi vnitrobuněčné cíle těchto toxinů patří například aktin, ribozomy, nebo malé proteiny vázající GTP jako Rho nebo G-proteiny. V této práci se nevěnuji všem toxinům této skupiny, ale pouze těm, u kterých jsou mechanismy působení prozkoumány nejpodrobněji.



Obr. 2 Přehled schématických struktur jednotlivých dvoupodjednotkových AB toxinů (Falnes a Sandvig, 2000).

3.1 Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha

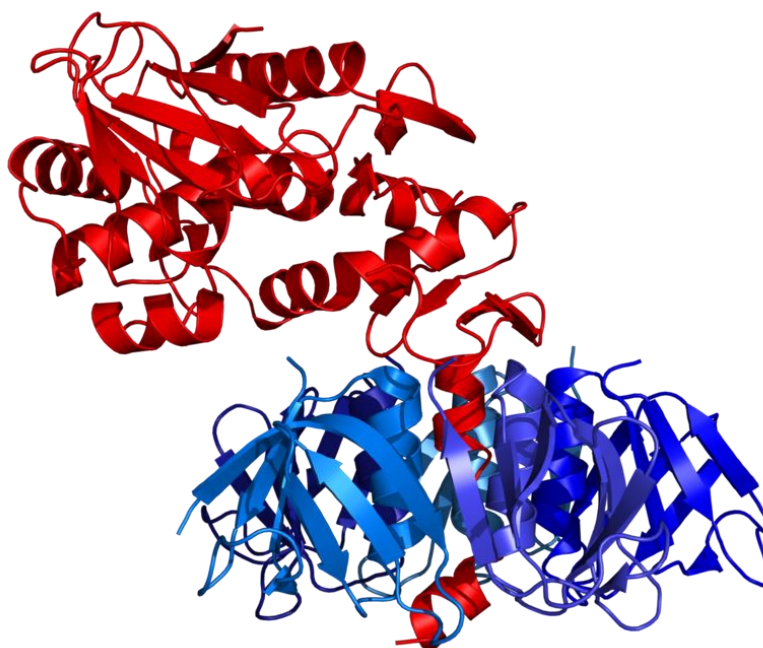
AB toxiny mají ve většině případů specifický receptor na povrchu cílové buňky. Receptorem pro difterický toxin je nerozštěpený prekurzor pro růstový faktor EGF (ProHB-EGF) vázající heparin (Naglich et al., 1992), pro Shiga toxin je receptorem globotriaosylceramid (Gb3) (Lindberg et al., 1987) a pro cholera toxin je to monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) (Holmgren et al., 1975). Kromě vazby toxinu mohou mít receptory i další úlohy. Za prvé mohou mít přímou úlohu při penetraci toxinu skrz membránu – pro difterický toxin je to nezbytná vlastnost. Pokud zaměníme transmembránovou nebo cytoplasmatickou doménu receptoru za GPI-kotvu, dojde ke snížení nebo zablokování

pórotnorné aktivity, čímž se potvrzuje, že receptor hraje nezbytnou roli při translokaci toxinu (Lanzrein et al., 1996). Za druhé receptory určují cílovou organelu pro toxin ještě před jeho vlastním vstupem do cytosolu, např. lipidové složení receptoru pro Shiga toxin je esenciální pro retrográdní transport toxinu (Arab a Lingwood, 1998). A za třetí, když je receptor umístěn v klathrinové jamce, toxin je endocytován mnohem rychleji, než kdyby se nacházel v planární membráně.

3.2 Shiga toxin

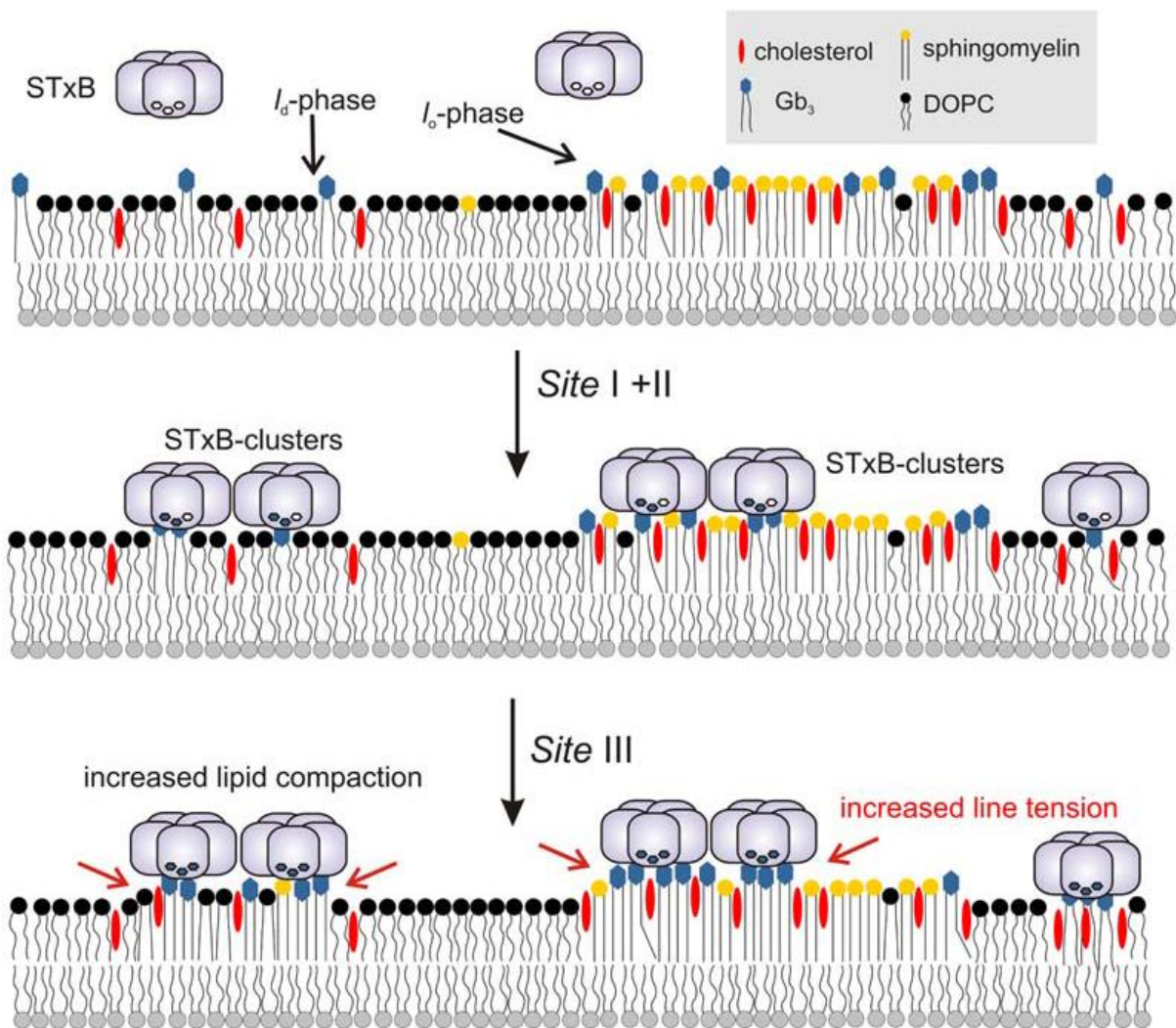
Toxinů, které jsou dopravovány přímo skrze membránu (*Bordetella pertussis* – adenylát-cyklázový toxin) není mnoho, většina z nich vstupuje do buňky pomocí endocytózy. Mezi takové patří Shiga toxin, který bude příkladem pro vysvětlení procesu endocytózy a retrográdního transportu.

Shiga toxin má AB₅ strukturu, což znamená, že k podjednotce A je navázáno 5 domén podjednotky B, přesněji k C-konci podjednotky A (Obr. 3). Podjednotka A má enzymatickou aktivitu, účinkuje jako N-glykosidáza odštěpující adenin na 28S ribozomové podjednotce způsobující inhibici proteosyntézy, pro funkci Shiga toxinu je proto nezbytné translokovat jeho doménu A přes membránu. Podjednotka A obsahuje sekvenci Arg248-Val-Ala-Arg251, kterou rozeznává proteáza furin a v tomto místě způsobí rozštěpení podjednotky A na domény A1 a A2, které ale stále zůstanou spojeny disulfidickou vazbou. Doména A2 zůstává navázána na povrch membrány cílové buňky, zatímco doména A1 s toxickou aktivitou je transportována dovnitř buňky. Tento proces je nezbytný pro aktivaci toxinu v napadené buňce (Garred et al., 1995).



Obr. 3 Schéma struktury Shiga toxinu. Podjednotka A je označena červeně a podjednotka B tvořená pentamerem je označena modře. Pentamer je navázán na C-konec podjednotky A – doména A1 (PDB 1R4P) (Fraser et al., 2004).

Navázání toxinu na receptor se jeví jako komplexní proces, protože každá z pěti domén podjednotky B Shiga toxinu má tři vazebná místa pro receptor Gb3. Z nich pouze dvě mají vysokou afinitu k receptoru, zatímco třetí vazebné místo slouží k nahromadění Gb3 v dostatečném množství, aby se mohl na membráně vytvořit shluk molekul cholesterolu. Tyto shluky se spojují dohromady a vytváří větší, těsně navázané domény, které zvyšují pnutí membrány a způsobují její prohnutí dovnitř. Tento stres na lipidické membráně může být hnací silou k endocytóze nezávislé na klathrinu (Obr. 4) (Windschiegl et al., 2009).



Obr. 4 Schématické zobrazení vazby Shiga toxinu na membránu. Podjednotka B se díky vysoké afinitě vazebných míst I a II (Site I a II) naváže k receptoru Gb₃ na membráně a vytvoří proteinové clustery (STxB clusters). Přes vazebné místo III (Site III) se zajistí dostatečné množství Gb₃ pod clustery, aby došlo ke ztluštění membrány a nahuštění lipidů (dioleylphosphatidylcholin DOPC, a sphingomyelin). Výsledkem tohoto je zvýšené stlačení lipidů/zvýšené pnutí na membráně (červené šipky), které vede k vytvoření membránových domén. Na levé straně obrázku je příklad volné membrány (*I_d*-phase) a na pravé je příklad membrány planární (*I_o*-phase) (Windschiegl et al., 2009).

Při vazbě toxinu hraje důležitou roli nejen podjednotka B, ale především podjednotka A, která sama o sobě stimuluje přenos přes cytoplazmatickou membránu závislou na klathrinu. Toxin samotný se preferenčně váže na receptory Gb₃ v klathrinových jamkách. Podjednotka A interaguje s membránovými proteiny, především s tyrosin-kinázou (Syk), která fosforyluje klathrin a zvyšuje tak množství klathrinových jamek. Endocytóza závislá na klathrinu je podstatně účinnější než endocytóza nezávislá na klathrinu (Torgersen et al., 2005).

Dalším krokem je přesun Shiga toxinu časným endosomem, popř. pozdním endosomem do Golgiho aparátu. Jeho cesta endosomy a interakce s membránami Golgiho aparátu je překvapivě rychlá, pohybuje se v řádu jednotek minut. Po transportu do Golgiho aparátu se

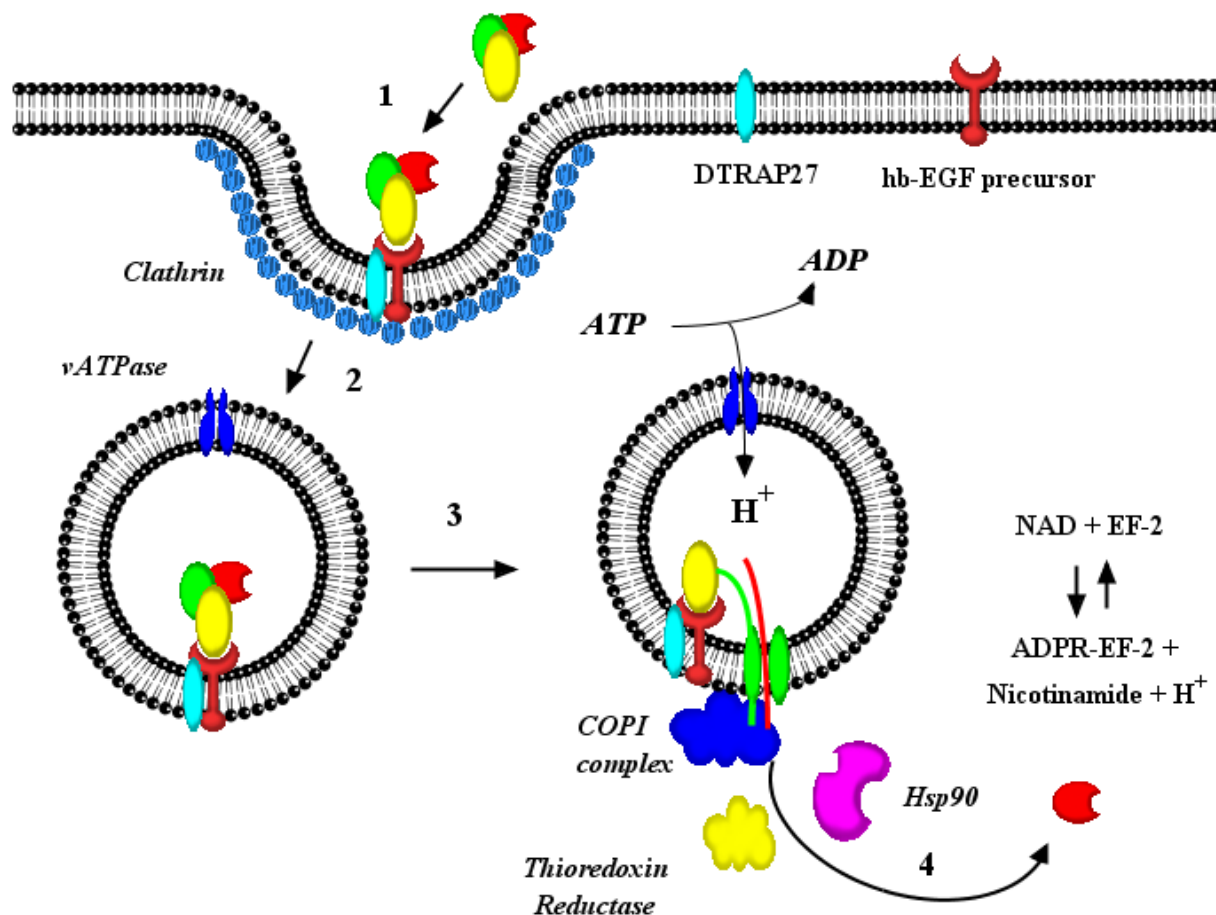
toxin už nehromadí v organelách pozdní endosomální dráhy (Mallard et al., 1998). Za zpomalením této dráhy by mohla být inhibice enzymů PKC δ , p38 MAPK a cPLA $_2\alpha$, které využívá toxin pro transport endosomu do Golgiho aparátu. Nejsilnějším inhibitelem transportu je látka ONO-RS-082, inaktivující cPLA $_2\alpha$. Na transport toxinu má též vliv pH, snížení hladiny lysosomální V-ATPázy zodpovědné za acidifikaci endosomů, nebo přidání bafilomycinu, který je inhibitelem V-ATPázy. Naopak chloroquin, který také ovlivňuje pH endosomu, neblokuje transport toxinu do Golgiho aparátu. Dalším inhibitelem je molekula Retro-2 a její deriváty, které inhibují transport endosomů, ale nemají vliv na jejich morfologii a neblokuje tak transport endogenních markerů jako TGN46 nebo CI-M6PR (Noel et al., 2013).

Po retrográdním transportu Golgiho aparátem do endoplasmatického retikula dochází k disociaci podjednotek A a B pomocí protein disulfid isomerázy (PDI), která působí v hydrofobní oblasti mezi doménou A1 a podjednotkou B. Disulfidická vazba mezi doménami A1 a A2 (residua 248 – 251) je redukována vnitřním prostředím lumen endoplasmatického retikula. Následně spontánně rozbalená doména A1 interaguje s chaperony Hsp40 a ERdj3, které spolu se Sec61 translokují A1 doménu přes membránu endoplasmatického retikula (Yu a Haslam, 2005). Translokaci toxinu z endosomu podrobně vysvětlím na příkladu difterického toxinu (viz kapitola 3.3), protože je zde detailněji prozkoumaná.

3.3 Difterický toxin

Difterický toxin, jehož producentem je bakterie *Corynebacterium diphtheriae*, způsobuje onemocnění zvané záškrť. Toxin jako člen AB toxinů je tvořen dvěma podjednotkami - A a B. Podjednotka B se váže na membránový receptor – ProHB-EGF. Tato vazba může být zesílena asociací receptoru s proteinem DTRAP 27 (diphtheria toxin receptor associated protein 27), což je homolog lidského glykoproteinu CD9. Vazba toxinu na receptor je situována do klathrinových jamek, které jsou později změněny na časné endosomy. Pro úspěšnou translokaci toxinu je potřeba nízké pH v endosomu, kde se obě podjednotky toxinu rozbalí, aby se zpřístupnily hydrofobní domény pro zesílení interakce s membránovými lipidy. V podstatě nízké pH uvnitř endosomu spouští translokaci toxinu do cytosolu. Po rozbalení toxinu dochází k inserci translokační domény B podjednotky, který vytvoří v membráně endosomu pór široký 18 – 22 Å. Samotná inserce translokační domény je iniciována protonací kyselých aminokyselin Glu³⁴⁹ a Asp³⁵³ na hrotu vlásenky mezi helixy 8 a 9 (TH8/9). N-koncová část translokační domény a C-koncová část fragmentu A jsou translokovány skrz membránu, translokace se účastní COPI komplex (coat protein complex I), který umožní vtažení těchto

částí pórem. Disulfidický můstek spojující tyto dvě části je redukován vlivem prostředí uvnitř cílové buňky. Posledním krokem je dokončení translokace zbylé části podjednotky A za asistence thioredoxin reduktázy, a následné sbalení chaperonem Hsp90 (Obr. 5) (Falnes et al., 1994; Silverman et al., 1994).

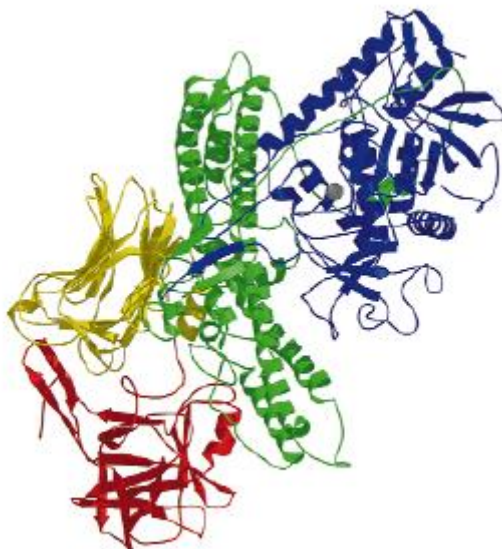


Obr. 5 Schéma mechanismu translokace difterického toxinu do cytosolu eukaryotické buňky. 1) Toxin se váže na receptor (hb-EGF prekursor) na povrchu cytoplazmatické membrány a 2) je vtažen spolu s proteinem DTRAP27 do klathrinové (Clathrin) jamky, která vytvoří časný endosom. 3) Změnou vnitřního pH pomocí ATPázy lumenu, které reorganizuje celý toxin, se spustí inserce translokační domény B podjednotky, která vytvoří pór v membráně, kterým 4) se translokuje katalytická doména za účasti COPI komplexu, thioredoxin reduktasy a Hsp90. Po opětovném sbalení do aktivní konformace provádí toxin ADP-ribosylaci elongačního faktoru 2 (EF2). Difterický toxin je označen: červená pro katalytickou doménu, zelená pro transmembránovou doménu a žlutá pro doménu vázající se na receptor (Murphy, 2011).

3.4 Botulotoxin

Botulotoxin, další významný člen AB toxinů, je toxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum*. Botulotoxin je považován za nejúčinnější jed, který známe. Smrtelná dávka je 1,3 – 2,1 ng/kg při nitrožilním podání a 10 – 13 ng/kg při inhalaci. Nejčastější intoxikace ovšem nastává při požití spor *C. botulinum*, které jsou obsaženy ve špatně konzervovaných

pokrmech. Toxin způsobuje onemocnění zvané botulismus. Protein je tvořen dvěma řetězci – lehkým a těžkým, které jsou spojeny disulfidickým můstkem a tvoří tři funkční domény proteinu. Je to 1) vazebná, 2) katalytická, a 3) pórtvorná a translokační doména (Obr. 6).



Obr. 6 Struktura botulotoxinu. Katalytická doména má modrou barvu, translokační doména je zeleně, N-koncová sub-doména vazebné domény na protein je žlutě, C-koncová sub-doména vazebné domény na protein je červeně a vazebné místo pro zinek je šedě. Helixy translokační domény se spirálovitě točí kolem sebe a okolo nich je navázána katalytická doména (Lacy et al., 1998).

Doména, která se váže na receptor, je tvořena ze dvou zhruba stejně velkých sub-domén, které jsou tvořeny především β -listy a jsou navzájem spojené jedním α -helixem. Vazebná doména se nachází daleko od α -helixů translokační domény a vůbec se jí nedotýká, a proto se všechny smyčky na povrchu mohou účastnit vazby na receptor. Translokační doména má ve své střední části dva centrální α -helixy dlouhé 105 Å a kolem nich se balí katalytická doména a to ještě předtím, než se zformuje hlavní tělo toxinu cylindrického tvaru. α -helixy se točí kolem sebe do spirály. Podobná struktura se nachází i u kolicinu Ia a u chaperonu GrpE. α -helixy jsou antiparalelní a amfipatické. Katalytická doména je tvořena α -helixy i β -listy. Aktivní místo domény je zanořeno 20-24 Å dovnitř proteinu, má negativní náboj a je zpřístupněno kanálem, který je chráněn jak hlavní částí domény, tak i jejím opaskem, který se vine kolem translokační domény (Kumaran et al., 2009; Lacy et al., 1998).

Botulotoxin B je aktivní, pokud je ve formě heterodimeru a je redukován disulfidický můstek mezi dvěma řetězci. Těžký řetězec je zodpovědný za vazbu proteinu k receptoru v klathrinové jamce neurální buňky, poté je toxin endocytován. Inzerci lehkého řetězce do membrány endosomu obstarává těžký řetězec a následně je spuštěna jeho enzymatická aktivita.

Proteázová aktivita je lokalizována na lehkém řetězci a je specifická pouze pro SNARE proteiny, proteiny malých synaptických vezikulů. Jejich štěpením se redukuje uvolňování neurotransmiteru (Schiavo et al., 1992).

Botulotoxin se páruje s netoxickým nehemagglutininovým proteinem za vytvoření komplexu, který chrání botulotoxin v zažívacím traktu před proteolýzou. Proteiny při pH 8 zaujmají konformaci, která neumožňuje párování do komplexu. Při změně okolních podmínek, kdy je pH 6, se ukáže, že botulotoxin konformaci již nemění, ale nehemagglutininový protein změní konformaci, která již umožňuje párování do komplexu zajišťující ochranu pro botulotoxin (Matsui et al., 2014).

4. In vitro systémy pro výzkum translokace

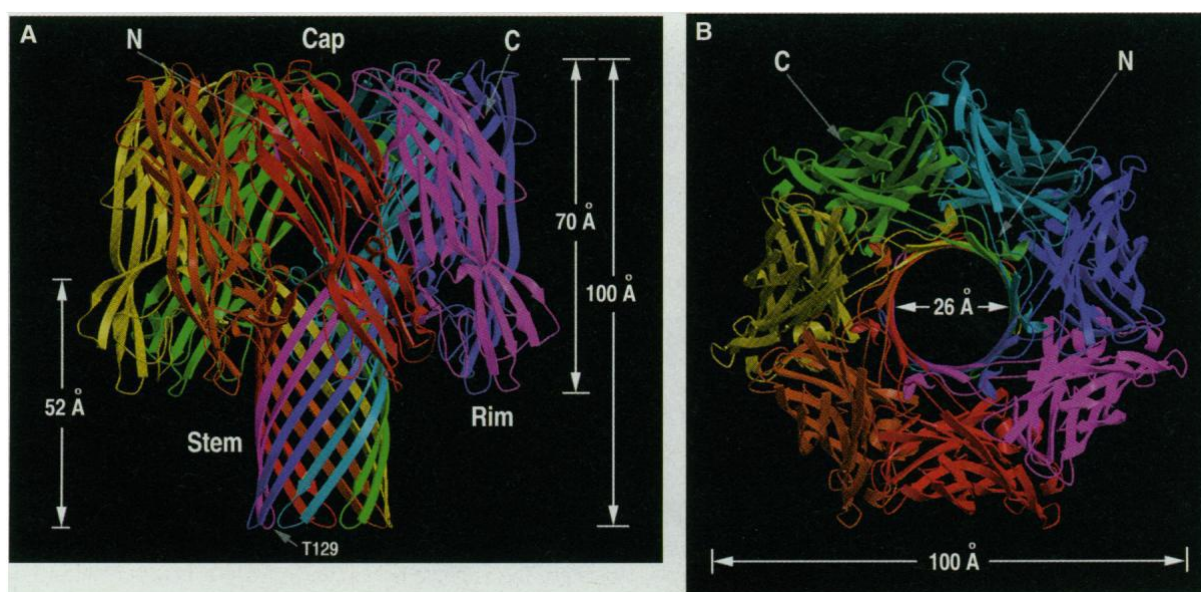
4.1 α -hemolysin

α -hemolysin (α -HL) sekretovaný bakterií *Staphylococcus aureus* způsobuje lyzi buněk. Napadá především krevní buňky – červené krvinky, monocyty, krevní destičky, lymfocyty a endoteliální buňky (Bhakdi a Trantum-Jensen, 1991; Thelestam a Blomqvist, 1988). Není to člen skupiny AB toxinů, tedy netranslokuje žádnou svoji část, ale vytváří póry, kterými mohou procházet jiné molekuly. Dále vysvětlím translokaci skrze α -HL společně s detailním popisem jeho struktury, což je důležité pro lepší pochopení jeho využití při sekvenaci nukleových kyselin.

α -HL tvoří membránový pór, který má hříbovitý tvar, jehož rozměry jsou 100 Å na výšku a 100 Å na šířku. Pór je tvořen sedmi monomery (Gouaux et al., 1994). Protein je rozdělen na tři základní části, kterými jsou čepička (cap), kmen (stem) a lem (rim) (Obr. 7). Protein je na membránové dvojvrstvě orientován tak, že čepička a lem jsou na povrchu fosfolipidové membrány a kmen je zanořen do membrány a tvoří transmembránový kanál. Čepička je tvořena sedmi „ β sandwich“ strukturami. Každá z nich se skládá z β -listů postavených proti sobě a dohromady tak tvoří β -barel. Lem vyčnívá ze spodní části čepičky a je v těsné blízkosti, nikoli v přímém kontaktu s fosfolipidovou membránou. Mezi kmenem a lem se nachází trhlina, která vymezuje oblast bohatou na aminokyseliny, které se podílejí na interakci mezi proteinovým lemem a hlavičkami fosfolipidů nebo receptorů na povrchu fosfolipidové membrány. Rozsáhlé plochy povrchu kontaktu hydrofobních a hydrofilních částí na povrchu jednotlivých protomerů způsobují pevnost a stabilitu celého heptameru. Protomery

jsou spojeny aminokyselinami, které jsou do sebe zaklesnuté. Je s podivem, že delece pouhých dvou aminokyselin vede k inaktivaci hemolytické aktivity, přestože jednotlivé aminokyseliny v této oblasti nemají esenciální roli v proteinu. Konzervativní substituce na pozici His³⁵ vede ke snížení oligomerizační, lytické a letální aktivity, zatímco nekonzervativní substituce všechny tyto aktivity zcela ruší (Song et al., 1996).

Protomerové jádro je tvořeno asi 80 % všech aminokyselin. Jádro je elipsovitého tvaru o rozměrech 70 x 45 x 20 Å. Struktura protomerů se podle krystalografie liší jen o 0,24 Å. Každý protomer obsahuje 16 β listů, 3 krátké úseky α helixů, dlouhý náhodně spletený úsek Asp¹⁸³ až Lys²⁰⁵ a značnou část „non α“ a „non β“ struktur (Song et al., 1996).

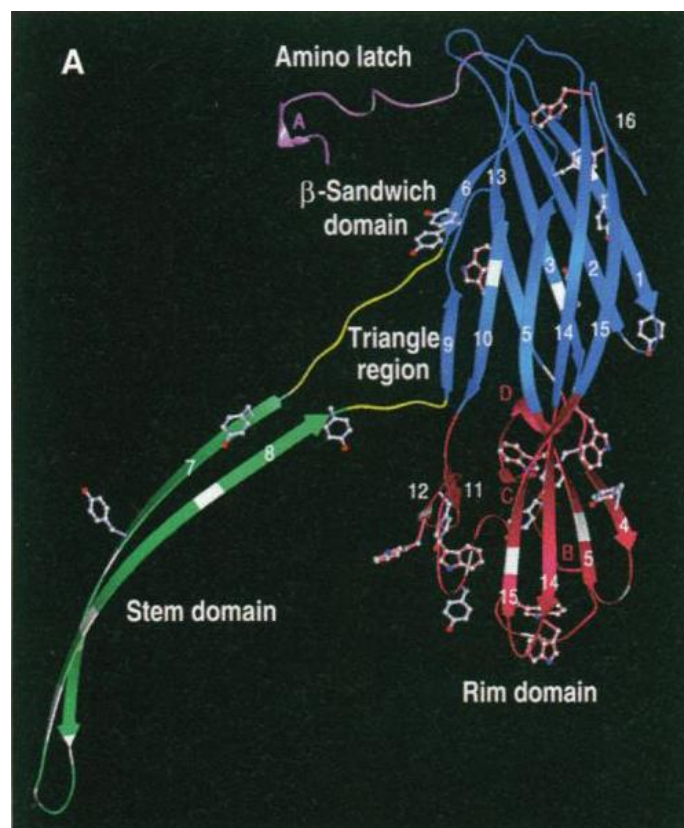


Obr. 7 Krystalová struktura zobrazuje heptamer α -hemolysinu jinou barvou pro každý protomer. Vyznačeny jsou části: čepička (cap), kmen (stem) a lem (rim). Vlevo je boční pohled na protein a vpravo je pohled shora na heptamer (Song et al., 1996).

Transmembránový kmen tvořící kanál je složen ze 14 antiparalelních β skládaných listů, jeden pár pro každý protomer. Vlákna kmenu začínají na Lys¹¹⁰ a končí na Tyr¹⁴⁸. Tato vlákna tvoří β skládaný barel o výšce 52 Å a průměru 26 Å. Každé vlákno se v barelu otočí přibližně o 180° okolo β barelu. Průměr kanálu není v celé délce proteinu stejný, v nejširším místě má průměr 46 Å a v nejužším místě měří 15 Å. Nejširší bod se nachází na vrcholu trojúhelníkové oblasti (Obr. 8), přesněji na Pro¹⁰³. Nejužší bod se nachází v místě spojení kmenové domény a trojúhelníkové oblasti. V β barelu má kanál průměr od 14 do 24 Å v závislosti na množství postranních řetězců aminokyselin kmenové domény. Horní i spodní okraj kmenu je tvořen ze zásaditých a kyselých residuí, zatímco vnitřek je složen z neutrálních aminokyselin (Song et al., 1996).

Na horní vnitřní hraně čepičky – na hraně vstupu do proteinu se nachází aminokyseliny, které mají úlohu při interakci nukleotidu s α -HL a jeho následný průchod proteinem. Jsou to Lys⁸, Ile¹⁶, Asn¹⁷, Thr¹⁸, Lys⁴⁶ a Asp⁴⁷, které nejčastěji interagují s nukleotidem, který se přibližuje k proteinu a následně je vtažen do transmembránového kmene (Manara et al., 2015).

Trojúhelníková oblast je spojení mezi jádrem protomeru a kmenovou doménou (Obr. 8). Odděluje je od sebe a zároveň interaguje s oblastmi sousedních protomerů vytvořením vodíkových vazeb mezi polárními aminokyselinami: Lys¹¹⁰ (B) – Asp¹⁵²(C) – Asn¹⁷³(C) a Lys¹⁴⁷(B) – Glu¹¹¹(B) – Glu¹¹¹(A) (písmeno označuje protomer v řadě tří protomerů A, B, C) (Song et al., 1996).



Obr. 8 Stuhový model protomeru α -hemolysinu. Modrou barvu má doména v čepičce, červená zobrazuje doménu v lemu, zelená v β -barelu a žlutá pro trojúhelníkovou oblast oddělující kmenovou doménu od čepičkové domény a šedě označené aminokyseliny jsou Tyr, Trp a Gly (Song et al., 1996).

Toxin je z buňky vylučován v podobě ve vodě rozpustného nativního monomeru, který je schopný se navázat na membránu cílové buňky obsahující fosfatidylcholin nebo sfingomyelin a cholesterol. Po vytvoření vazby začne oligomerizovat do podoby heptameru, který ale ještě není schopný vytvořit transmembránový kanál, ten se otevírá až po vnoření pórtvorné domény (Valeva et al., 1997).

Vazba na membránu má nejdůležitější roli, která je zprostředkována přes ADAM 10 (disintegrin a metaloproteáza 10)(Wilke and Wardenburg, 2010). Toxin se neváže na buňku, jejíž membrána obsahuje fosfatidyletanolamin a fosfatidylglycerol, protože v takových membránách toxin nedokáže integrovat pórotvornou doménu. Oligomerizace vede k tvorbě dostatečně velké hydrofobní struktury k udržení stabilní polohy uvnitř dvojvrstvy. Oligomerizace se zdá být upřednostňována před laterální difuzí jednotlivých již zanořených monomerů. Nejméně známým jevem v celkovém působení α -HL je inserce kmenové domény do dvojvrstvy (Galdiero et al., 2007).

V membráně se po vnoření pórotvorné domény vytvoří neselektivní kanál, schopný přenášet molekuly do M_r 4000, jež má například Dextran 4, který už neprojde skrze pór a tím se zablokuje hemolýza (Bhakdi et al., 1984). Vzhledem k vyřešené struktuře, výborné stabilitě (odolnost vůči změnám teploty a pH, přítomnosti SDS) a jeho všestrannosti se s ním začalo pracovat in vitro jako s nanopórem umožňujícím sledovat translokaci částic jako jsou ionty kovů (Braha et al., 2000), malé organické molekuly (Gu et al., 1999), RNA (Japrun et al., 2010), DNA (Howorka et al., 2001) a proteiny (Movileanu et al., 2000).

4.2 Nanopórové sekvenování

Po popisu struktury α -HL bych se rád zaměřil na jeho momentálně nejrozšířenější a už i komerčně využívanou aplikaci – sekvenování pomocí nanopórů, jehož velmi nedávné zavedení na trh vedlo ke snížení nákladů za sekvenaci celého jednoho genomu na 1000 USD. Sekvenovat se dají DNA i RNA. Při jejich sekvenování je nutné, aby nukleové kyseliny byly jednovláknové.

Tato metoda sekvenování je založena na identifikaci každé báze, která prochází skrz pór. Aby bylo dosaženo dobrých výsledků při čtení vlákna, je nutné dodržet několik podmínek. Vlákno musí být schopno se přiblížit k detekčnímu systému, aby mohlo být zachyceno a následně prošlo pórem. Základními předpoklady pro správné zpracování vlákna a jeho přečtení jsou následující: (i) každý nukleotid procházející skrz pór musí vytvořit zaznamatelnou jedinečnou krátkodobou blokadu průchodu elektrického proudu vyvolaného protékajícími ionty; (ii) vnitřní prostor póru musí mít takovou velikost, aby se v něm držel pouze jeden nukleotid v daném čase; (iii) rychlost měření a sběru dat musí být tak vysoká, aby bylo možno zachytit hodnotu iontového proudu probíhajícího kolem nukleotidu v okamžiku jeho průchodu pórem; (iv) je nezbytně nutné zamezit zpětnému chodu vlákna skrz pór; (v) membrána i kanál, ve kterých probíhá měření, musí být dostatečně odolné, aby vydržely chemické a teplotní změny

prostředí nutné pro odstranění sekundární struktury (denaturaci) analyzovaného vlákna (Thompson a Oliver, 2012).

4.2.1 Biologické nanopóry

Jako biologické nanopóry se používají pórotvorné toxiny buď v původní divoké formě, nebo mutované. Jako nejvhodnější se osvědčil α -HL (Kasianowicz et al., 1996), protože tvoří transmembránový kanál, který propouští jednovláknovou DNA (ssDNA), ale nikoliv dvouvláknovou DNA (dsDNA). Není ovšem použit v divoké formě, ale je upraven mutacemi, aby se upravil vnitřní rozměr póru. Tento protein se za normálních podmínek váže na lipidickou dvojvrstvu. Ta má omezenou životnost, je s ní náročná manuální práce, není odolná vůči chemickým a teplotním výkyvům. Proto musela být pro komerční využití nahrazena odolnější alternativou (viz níže) (Howorka et al., 2001).

Aby byla výstupní data použitelná, je za účelem zaznamenání signálu pouze od jedné báze translokace DNA zpomalena zvýšením viskozity, koncentrací použitých solí nebo změnou kationtů v roztoku.

4.2.2 Nanopóry v pevné membráně

Jako základní materiál pro tvorbu membrány se používají deriváty křemíku, především nitrid křemičitý (Si_3N_4). Na rozdíl od lipidové dvojvrstvy jsou tyto pevné membrány odolnější vůči měnícím se podmínkám při sekvenování skrz nanopóry a umožňují kvalitní sběr dat. Rychlost translokace vlákna DNA o velikosti 93 kpb přes nanopór v pevné membráně je cca 10 kb/ms (rychlost vlákna, které je volně přenášeno nanopórem za pomoci vkládaného elektrického napětí). Tato rychlost přesahuje citlivost detektorů snímání proudu, proto bylo nutné ji zpomalit použitím mutovaných pórotvorných proteinů, které jsou zanořované do pevné křemičité membrány (viz níže). (Healy et al., 2007).

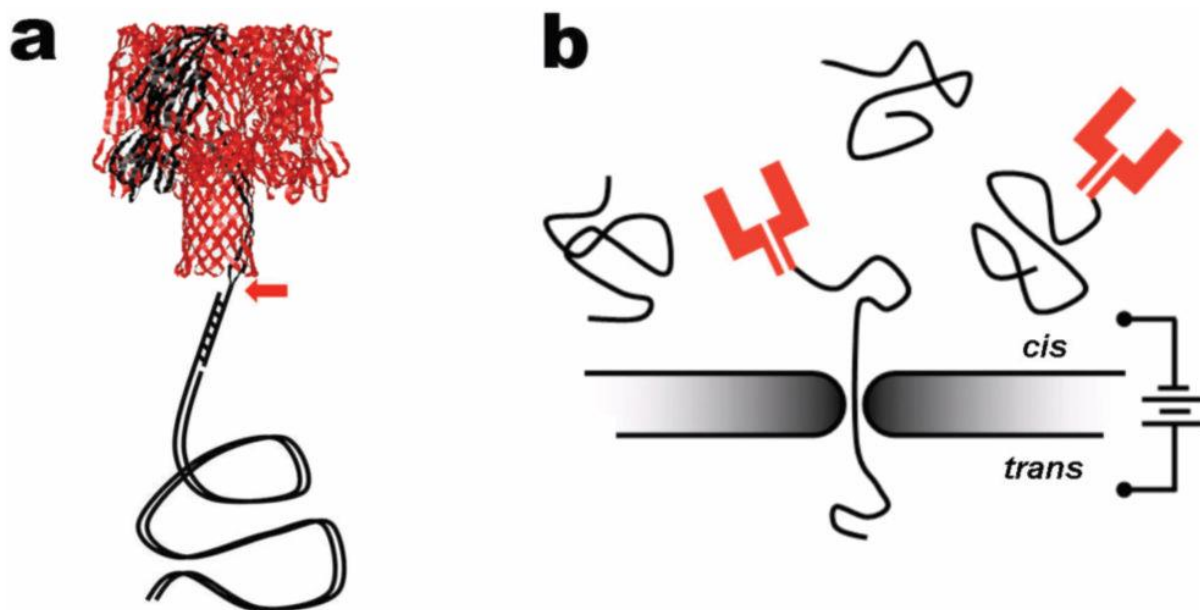
4.2.3 Hybridní nanopóry

Hybridní nanopóry vznikají vložením jednotlivých, předem sestavených α -hemolysinů do nanopóru vyrobeného v pevné membráně. Monomer α -hemolysinu je modifikován přidáním smyčky (loopem) o délce 11 aminokyselin na výběžek β -barelu. Smyčka nese vazebné místo obsahující cystein, na který se disulfidickým můstkem váže 12 bází dlouhý DNA oligomer, který tvoří vazebný bod pro 3 kbp dlouhou dsDNA molekulu s komplementárním jednovláknovým koncem. Tato navázaná dsDNA je nezbytná pro zavedení α -HL do membrány,

dsDNA je elektroforézou translokována skrze pór v pevné membráně a ta za sebou táhne i α -HL, který se po translokování celého vlákna navázané dsDNA zastaví přímo na membráně, protože čepička proteinu neprojde úzkým nanopórem. Nezbytné je dodržet velikost nanopóru v membráně a to v rozmezí 2,4 - 3,6 nm, která je dostatečně velká, aby jím prošla molekula dsDNA a kmen α -HL, a přitom dostatečně malá, aby jím už nedokázala projít čepička proteinu. Tímto způsobem se dá docílit, aby čepička směřovala na cis stranu (strana s molekulami určenými k translokaci) membrány a β -barel ústil na trans straně (strana, kam jsou molekuly translokovány) membrány (Obr. 9). Tomuto jevu napomáhá i to, že α -hemolysin je velká hydrodynamická brzda vzhledem k své obrovské velikosti a tudíž se k póru v membráně přiblíží, teprve když je translokována celá molekula dsDNA. Následná sekvenace už pracuje se ssDNA, které se přidávají na cis stranu (Hall et al., 2010).

4.2.3.1 Mutace α -hemolysinu pro import do křemíkové membrány

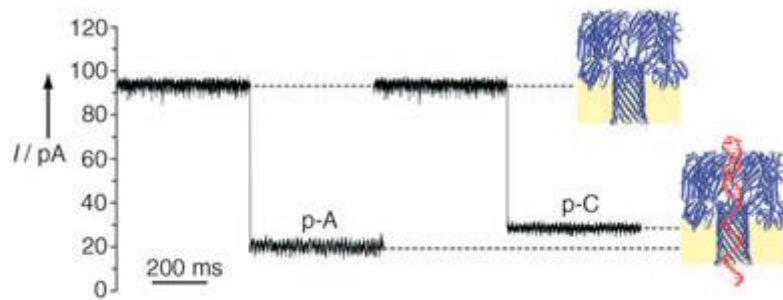
Monomer α -hemolysinu je produkován s 11 aminokyselin dlouhou smyčkou obsahující cystein (GGSSGCGSSGG), která nahrazuje residuum 129 a na C-konec je přidáno 8 molekul aspartátu. Tyto monomery jsou smíchány s monomery mutanty α -hemolysinu M113N, která na pozici Met¹¹³ nese záměnu za Asn. U této mutanty α -hemolysinu dochází k zadržení molekuly DNA v lumen kanálu až na stovky milisekund (Gu et al., 2001). Heteroheptamerní proteinový pór se vytvoří na buněčných membránách králičích červených krvinek. Proteiny navázané na membránu jsou poté separovány polyakrylamidou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), aby se získaly póry s podjednotkami v poměru 1:6 (α -hemolysinCys : α -hemolysinM113N), které jsou extrahovány přímo z gelu (Bayley a Jayasinghe, 2004; Howorka et al., 2001).



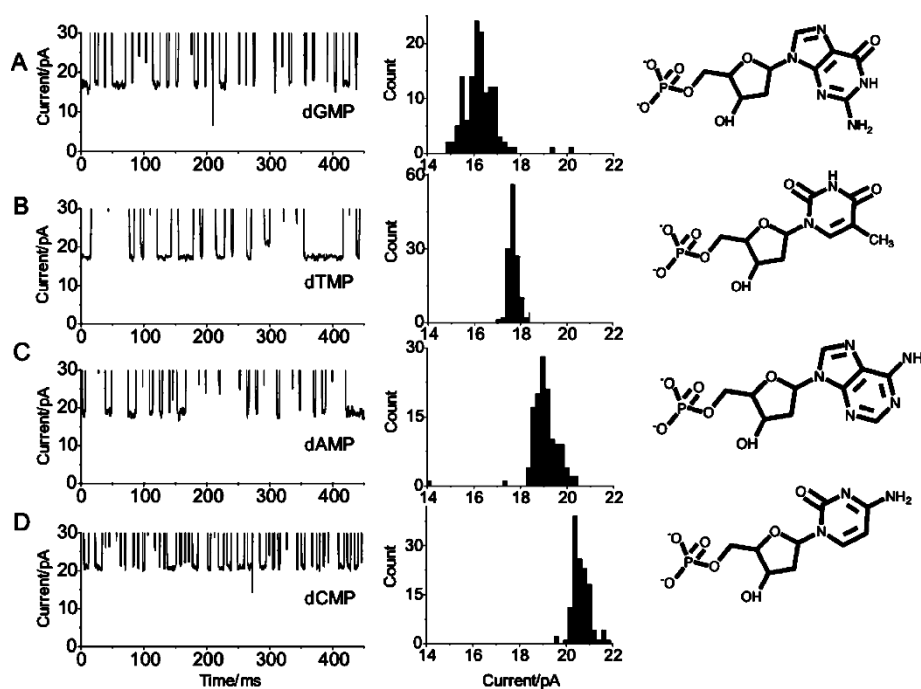
Obr. 9 Příprava hybridních nanopórů. (a) α -HL heteroheptamer s navázaným oligomerem o délce 12 bází, na který je navázaná dsDNA, která (b) navede α -HL do póru v pevné membráně a protein se v něm zastaví, protože jeho čepička neprojde pórem (Hall et al., 2010).

4.2.4 Detekce a záznam signálu

Detekce signálu během sekvenace probíhá měřením elektrického proudu vyvolaného tokem monovalentních iontů přes pórotvorný protein. Měření proudu probíhá s frekvencí 100 kHz, aby byly zachyceny všechny báze translokované ssDNA. Při této detekci se sledují pouze dva stavy proteinu - otevřený a blokový (Obr. 10). Při otevřeném stavu dochází k proudu iontů limitovaným pouze vlastnostmi měřicí aparatury a prostředím (vysoký vodivostní stav). Při blokováném stavu dochází k blokaci proudu iontů (skokový pokles proudu) procházející molekulou (Gu et al., 1999). Tento rozdíl se detekuje a slouží jako unikátní poznávací znak pro jednotlivé molekuly (Obr. 11). Měření v konkrétních podmínkách se zjistilo, že hodnota blokováného elektrického proudu pro jednotlivé nukleotidy je následující: guanin (dGMP) má v záznamu hodnotu 16.2 ± 0.5 pA, thymin (dTMP) 17.6 ± 0.6 pA, adenin (dAMP) 18.6 ± 0.6 pA a cytosin (dCMP) 20.2 ± 0.5 pA (Ashkenasy et al., 2005; Astier et al., 2006).



Obr. 10 Otevřený stav (vysoký proud) a blokový stav (skokový pokles proudu) a jeho projev na záznamu elektrického proudu v čase (Ashkenasy et al., 2005).

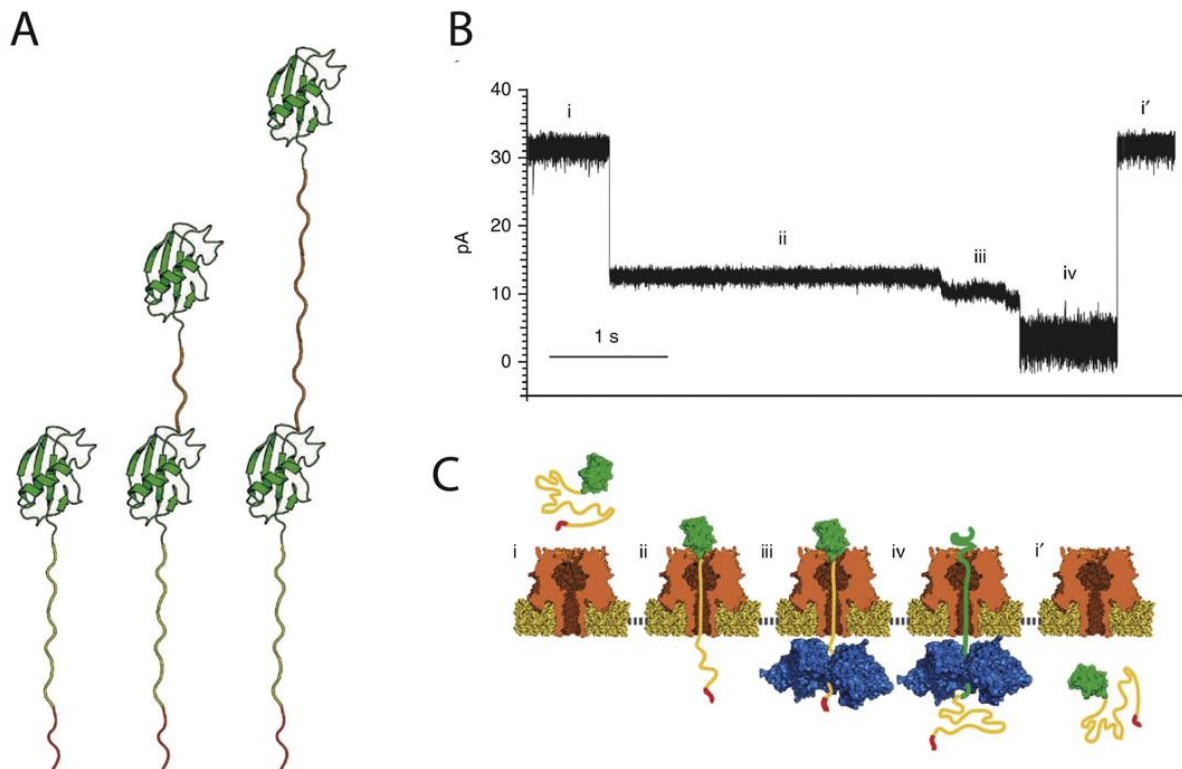


Obr. 11 Hodnoty elektrického proudu procházející pórem pro jednotlivé nukleotidy. Při translokaci nukleotidů dochází k blokaci elektrického proudu a zjišťují se dva stavy – otevřeno a blokováno. Při otevřeném stavu je pór volně průchozí pro ionty a při blokováném stavu je v póru navázaná báze. V grafech v levém sloupci jsou zobrazeny blokové stavy, které snižují hodnotu proudu. V prostředním sloupci jsou histogramy četnosti hodnoty blokováného proudu, z nichž se odvodila hodnota blokace proudu pro všechny jednotlivé báze (Astier et al., 2006).

4.3 Studium sekundárních struktur proteinů

Další využití membránových toxinů je ve výzkumu sekundární struktury proteinů (např. u vlásenky DNA). Celý proces spočívá v tom, že k vlásence je připojen linker s nabitým koncem, který jej pomůže nasměrovat k α -HL a následně jej protáhnout skrze pór vytvořený α -HL. Volný konec tohoto proteinu je veden pórem, zatímco vlásenka se zastaví u vstupu do póru

kvůli její struktuře, která neprojde pórem (Obr. 16). Vlászence se vlivem elektrického proudu rozvolní vazby, které ji drží v sekundární struktuře. Životnost vlásenky koreluje s volnou energií formace a je značně závislá na správném párování bází v sekvenci. Jakákoliv změna jednotlivých bází má za následek velký rozdíl ve stabilitě sekundární struktury. Tato metoda dokázala, že energie vazby bází je možné brát jako funkci sekvence (Kasianowicz et al., 2016).



Obr. 16. Schématické zobrazení metody pro výzkum sekundární struktury proteinu. A) Zkoumaný protein (zeleně) s navázaným linker proteinem s vazebným místem rozeznávající zkoumaný protein (žlutě) a nabitý konec pro ulehčení zachycení pórem (červeně). B) Záznam průchodu proteinu pórem: volný pór (i), do kterého se naváže nabitý konec (přechod mezi i a ii), protein je přitažen a navázán na pórtvorný protein (iii), ATP hydrolýza vyvolaná ClpX pohání rozbalení zkoumaného proteinu a jeho translokaci pórem (iv) a následné uvolnění póru (i'). C) Animovaná ilustrace nanopóru a ClpX enzymu (modře), který kontroluje rozbalení a translokaci proteinu (zeleně, žlutě a červeně) pórem a generuje dostatečnou mechanickou sílu pro denaturaci proteinu tím, že jej táhne skrz pór (Kasianowicz et al., 2016; Nivala et al., 2013).

4.4 Antraxový toxin

Dalším toxinem, který má schopnost translokace je antraxový toxin, jenž je produkován bakterií *Bacillus anthracis*, původcem onemocnění antrax. Toxin je složen z tří

proteinů: protektivní antigen (PA), smrtící faktor (lethal factor – LF) a edémový faktor (edema factor – EF). LF a EF mají enzymatickou aktivitu a PA se váže na cílovou buňku. EF je adenylát cykláza závislá na kalmodulinu, která se pro aktivaci musí dostat do cytosolu napadené buňky. LF je proteáza závislá na zinku, která štěpí kinázy aktivované mitogenem. Tyto tři části jsou kódovány na plasmidu pXO1, ale jsou syntetizovány a sekretovány zvlášť (Brossier et al., 2000).

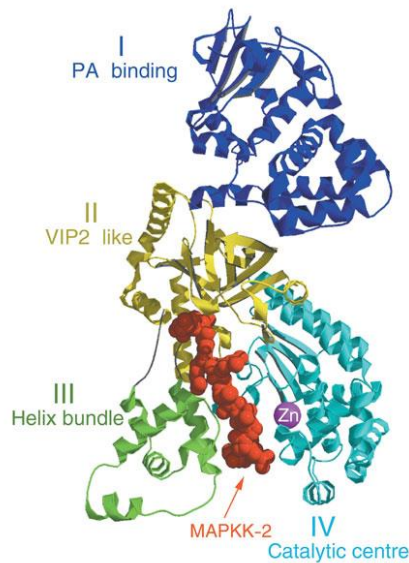
Toxin se váže na receptor - von Willebrandův faktor domény A lidského proteinu pro morfogenezi kapilár 2 (Bradley et al., 2001). Vazbu na receptor zajišťuje PA, který musí projít proteolýzou v oblasti residuí 164-167, kde furin rozeznává sekvenci Arg¹⁶⁴-Lys¹⁶⁵-Lys¹⁶⁶-Arg¹⁶⁷, aby se mohl správně navázat na receptor a vytvořit v membráně heptamer pro následnou translokaci LF a EF (Klimpel et al., 1992). Monomer je tvořen ze 4 domén (Obr. 12). PA je díky své schopnosti přenášet různé molekuly využitelný jako základní transportní systém in vitro (Petosa et al., 1997).



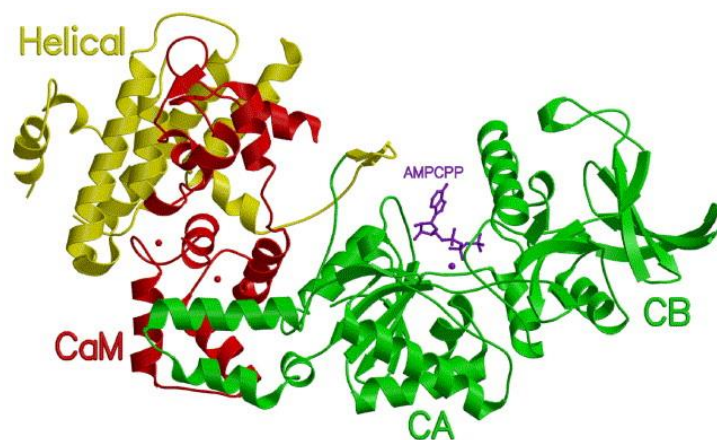
Obr. 12 Protektivní antigen a jeho čtyři domény: doména 1 (modrá) má aktivní místo pro proteolytickou aktivaci; doména 2 (zelená) zprostředkovává heptamerizaci a podílí se na inzerci do membrány; doména 3 (žlutá) má neznámou funkci a doména 4 (červená) je doména vázající se na receptor (PDB 1ACC) (Petosa et al., 1997).

PA tvoří v kombinaci s EF edémový toxin a v kombinaci s LF letální toxin. V obou komplexech funguje PA jako molekula rozpoznávající receptor a zajišťující vazbu do membrány, zatímco LF a EF jsou doménami s toxickou aktivitou (Brossier et al., 2000). Virulenční faktory se do cílové buňky dostávají přes vazbu na PA, který už je proteolyticky aktivovaný, navázaný na receptor a oligomerizovaný. Následuje endocytóza zprostředkovaná

receptorem a nízké pH v endosomu způsobí konformační změnu PA, která umožní translokaci faktorů do cytosolu buňky (Obr. 13 a 14) (Collier, 1999). EF má katalytickou doménu velmi podobnou adenylát-cyklázové doméně CyaA (*B. pertussis*) a tedy váže kalmodulin a katalyzuje tvorbu cAMP. Na druhou stranu LF štěpí N-konec MAP kináz (MAPKK1 a MAPKK2), což má za následek inhibici signální dráhy MAPK (Brossier et al., 2000).

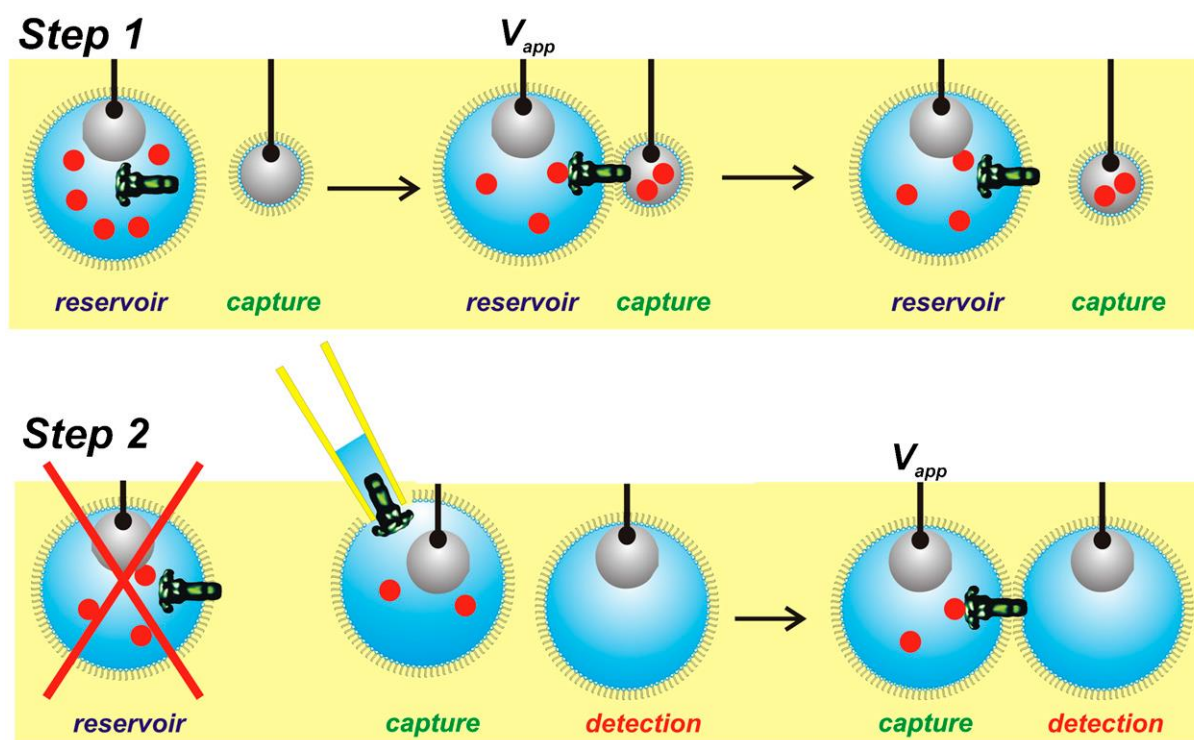


Obr. 13 Struktura LF a jeho čtyř domén: doména 1 (modrá) váže translokační doménu PA; doména 2 (žlutá) se podobá ADP-ribosylačnímu toxinu *Bacillus cereus*; doména 3 (zelená) je vsunuta do domény 2 jako strukturální duplikát její části; doména 4 (světle modrá) je podobná proteáze závislé na zinku (navázaný zinek je označen fialově) a obsahuje aktivní katalytické místo s navázanou MAPK kinázou (červeně) (Pannifer et al., 2001).



Obr. 14 Struktura EF se třemi doménami – jedna helikální (žlutá) a dvě subdomény (zelená CA a CB), které tvoří katalytické centrum; mezi doménami CA a helikální doménou je navázan CaM (červená). Mezi doménami CA a CB je aktivní místo tvořené navázaným analogem 3'-deoxy-ATP (v tomto případě AMPCPP - Adenosin 5'-(α,β -metylen)-trifosfát) (Shen et al., 2004).

PA se díky svým vlastnostem přenašeče molekul využívá při výzkumu translokace in vitro. Využívá se při výzkumu na černých lipidických membránách (BLM) anebo na membránové dvojvrstvě vytvořené na rozhraní kapiček hydrogelu (DIB). Obě tyto metody spočívají ve vytvoření umělé lipidické membrány mezi dvěma prostředími, do kterých jsou zavedeny elektrody, které umožní elektroforetický přenos látky ze strany cis na stranu trans. V membráně je třeba vytvořit pór, kterým by molekuly procházely a my bychom mohli měřit četnost, vlastnosti anebo rychlost přenosu. BLM je systém, kde jsou dva oddíly květy spojeny malým otvorem, ve kterém vytvoříme planární lipidovou membránu, jejíž složení si navolíme podle experimentu. DIB je systém využívající vzniku monovrstvy lipidů na povrchu kapičky, která po kontaktu s druhou kapičkou vytvoří dvojvrstvu na jejich rozhraní (Obr. 15). Mezi nejčastěji využívané toxiny pro přenos molekul skrz pór patří PA, CyaA a α -HL (Fischer et al., 2011).



Obr. 15 Schéma experimentu s antraxovým toxinem v DIB systému pro výzkum samotné translokace nebo extrémně citlivou detekci translokovaných molekul. Krok 1: elektrody jsou obaleny v 2% agarose (šedá) a jsou ponořeny do roztoku lipidů v hexadekanu (žlutá), zásobní kapička („reservoir“) obsahuje PA (černá) a LF (červená), po kontaktu s další prázdnou kapičkou („capture“) se na rozhraní mezi nimi vytvoří dvojvrstva, do které se zanoří PA. Následuje translokace LF poháněná membránovým potenciálem a poté jsou kapičky zase odděleny. Krok 2: zásobní kapička je úplně odstraněna a do kapičky s LF je přidán PA. Dále se vytvoří nová kapička („detection“), mezi níž a kapičkou s PA a LF se vytvoří dvojvrstva. Do té se inkorpuluje PA a proběhne translokace LF, která je zaznamenána (Fischer et al., 2011).

4.5 Cílená distribuce léčiv do rakovinných buněk

Toxiny popsané výše mohou sloužit nejen k výzkumu samotné translokace, ale najdou i své využití i v klinické praxi. Pro účinnou a cílenou distribuci léčiv do rakovinných buněk je nezbytné, aby se zvýšila přímá doprava terapeutik přímo do tumorových tkání a co nejvíce se omezila distribuce do neinfikovaných zdravých tkání, aby se zabránilo jejich poškození. Účinnost cílené dopravy léčiv závisí na těchto následujících podmínkách: i) zvýšená exprese receptorů pro přijetí transportních proteinů v rakovinných tkáních, ii) schopnost a ochota ligandu vázat se na receptor, iii) hladký transport fyziologickými bariérami, jako jsou například buněčné membrány a iv) extracelulární a intracelulární degradace léčiva. Pokud by se pro tyto účely využívaly toxoidy odvozené z výše popsaných bakteriálních virulenních faktorů, pak by nutným požadavkům nejlépe odpovídal Shiga toxin a to i především kvůli jeho receptoru - gangliosidu Gb3, který je exprimován lidskými tumory (Zhan et al., 2015). Nepoužívá se kompletní toxin, ale pouze jeho podjednotka B, která je bez toxické aktivity a váže se na receptor Gb3. Podjednotku B je možné upravit přímo jako terapeutický agens nebo jako nanonosič pro léčiva. Toxiny nebo jejich deriváty mohou proniknout přímo do buněčných organel, které jsou cílovou oblastí pro mnoho léků k léčbě rakoviny (Engedal et al., 2011).

Shiga toxin s navázaným inhibitorem topoizomerázy I (SN38) je v porovnání s irinotecanem (také inhibitor topoizomerázy I) 20 krát účinnější při využití na rakovinných buňkách ze slinivky břišní po dobu 15 minut (Zhan et al., 2015).

5. Závěr

V této práci jsem stručně shrnul znalosti o mechanismech translokace bakteriálních toxinů přes membránu eukaryotických buněk a jejich aplikace. V práci jsem se věnoval základnímu rozdělení translokace podle struktury bakteriálních toxinů. A zároveň jejich in vitro použití usnadní a urychlí analýzu dlouhých molekulových řetězců, které mohou být translokovány těmito systémy. Výzkum nanopórů probíhá již dvě dekády a zaznamenal velké množství experimentálních a teoretických studií a jejich využití při detekci a identifikaci biomolekul. Vše to začalo při použití nanopórů (α -HL), přes které bylo možné provléct molekuly DNA. A v současné době je již možné sledovat sekvenaci DNA v přímém přenosu za nesrovnatelně nižší náklady a za velmi krátkou dobu. Nanopóry a jejich využití ale neslouží pouze pro sekvenování DNA a dalších biomolekul, ale i pro zkoumání sekundárních struktur a jejich vnitřních interakcí u proteinů, či detekci mikromolekul RNA.

Výzkum botulotoxinu pomůže osvětlit otázky ohledně translokace L metaloproteázové domény z lumenu synaptických vezikulů nebo jiných kompartmentů s kyselým pH v koncových oblastech nervového systému, což je nejméně prozkoumaný proces intoxikace a následné paralýzy způsobené právě tímto toxinem.

RTX toxiny svoji pórotvornou aktivitou vedou k lyzi napadených buněk, nicméně výzkum prováděný na BLM zaměřený na jejich aktivitu na membráně a schopnost tvořit póry zjistil, že vytvoření póru je důležitý faktor virulence, ale může být pouze nepřímý mechanismus toxické aktivity RTX toxinu. Pro některé z RTX toxinů jako je třeba velmi dobře prostudovaný HlyA, ukazují, že způsobují u člověka silné zánětlivé odezvy, která vede ke stimulaci neutrofilů, jejich degranulaci a produkci eikosanoidu a interleukinu-1 z monocytů.

Některé receptory pro toxiny jsou exprimovány na membránu nemocných tkání a stejně tak na zdravých tkáních nebo orgánech, což představuje jisté riziko pro cílenou léčbu při špatném zásahu zdravých tkání. Například Gb3 je exprimován především tumorovými buňkami, ale je i ve vyšší míře přítomen v játrech, proto je nutné dávat speciální ohled na cílenou dopravu léčiv pomocí Shiga toxinu, při které může dojít k poškození jater. Při fúzi terapeutického proteinu nebo antigenu s toxinem nebo jeho fragmentem je nutné, aby bylo řízené sbalení proteinu, protože může nastat změna konformace, což může razantně snížit schopnost cílené vazby na receptor a snížit tím v podstatě účinnost léčby. A fúzovaný protein musí také být schopen prokázat svoji stabilitu a životnost in vivo podmínkách. Toto všechno se musí vzít v potaz při vývoji těchto léčebných metod.

6. Použitá literatura

- Arab, S., and Lingwood, C.A. (1998). Intracellular targeting of the endoplasmic reticulum nuclear envelope by retrograde transport may determine cell hypersensitivity to verotoxin via globotriaosyl ceramide fatty acid isoform traffic. *J. Cell. Physiol.* *177*, 646–660.
- Ashkenasy, N., Sanchez-Quesada, J., Bayley, H., and Ghadiri, M.R. (2005). Recognizing a single base in an individual DNA strand: A step toward DNA sequencing in nanopores. *Angew. Chem.-Int. Ed.* *44*, 1401–1404.
- Astier, Y., Braha, O., and Bayley, H. (2006). Toward single molecule DNA sequencing: Direct identification of ribonucleoside and deoxyribonucleoside 5' -monophosphates by using an engineered protein nanopore equipped with a molecular adapter. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 1705–1710.
- Barry, E., Weiss, A., Ehrmann, I., Gray, M., Hewlett, E., and Goodwin, M. (1991). Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin and Hemolytic Activities Require a 2nd Gene, *Cyac*, for Activation. *J. Bacteriol.* *173*, 720–726.
- Bayley, H., and Jayasinghe, L. (2004). Functional engineered channels and pores - (Review). *Mol. Membr. Biol.* *21*, 209–220.
- Bhakdi, S., and Trantum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* *55*, 733–751.
- Bhakdi, S., Muhly, M., and Fussle, R. (1984). Correlation Between Toxin Binding and Hemolytic-Activity in Membrane Damage by Staphylococcal Alpha-Toxin. *Infect. Immun.* *46*, 318–323.
- Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., and Young, J. a. T. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* *414*, 225–229.
- Braha, O., Gu, L.Q., Zhou, L., Lu, X.F., Cheley, S., and Bayley, H. (2000). Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nat. Biotechnol.* *18*, 1005–1007.
- Brossier, F., Weber-Levy, M., Mock, M., and Sirard, J.C. (2000). Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun.* *68*, 1781–1786.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., and Sebo, P. (2010). Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its β 2 Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps. *PLoS Pathog* *6*, e1000901.
- Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., et al. (2016). Calcium-Driven Folding of RTX Domain beta-Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* *62*, 47–62.
- Collier, R.J. (1999). Mechanism of membrane translocation by anthrax toxin: insertion and pore formation by protective antigen. *J. Appl. Microbiol.* *87*, 283–283.

- Eby, J.C., Ciesla, W.P., Hamman, W., Donato, G.M., Pickles, R.J., Hewlett, E.L., and Lencer, W.I. (2010). Selective Translocation of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 10662–10670.
- Engedal, N., Skotland, T., Torgersen, M.L., and Sandvig, K. (2011). Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb. Biotechnol.* *4*, 32–46.
- Falnes, P.O., and Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 407–413.
- Falnes, P., Choe, S., Madshus, I., Wilson, B., and Olsnes, S. (1994). Inhibition of Membrane Translocation of Diphtheria-Toxin-a Fragment by Internal Disulfide Bridges. *J. Biol. Chem.* *269*, 8402–8407.
- Fischer, A., Holden, M.A., Pentelute, B.L., and Collier, R.J. (2011). Ultrasensitive detection of protein translocated through toxin pores in droplet-interface bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16577–16581.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'Brien, A.D., and James, M.N.G. (2004). Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157 : H7. *J. Biol. Chem.* *279*, 27511–27517.
- Galdiero, S., Galdiero, M., and Pedone, C. (2007). beta-barrel membrane bacterial proteins: Structure, function, assembly and interaction with lipids. *Curr. Protein Pept. Sci.* *8*, 63–82.
- Garred, O., Vandeurs, B., and Sandvig, K. (1995). Furin-Induced Cleavage and Activation of Shiga Toxin. *J. Biol. Chem.* *270*, 10817–10821.
- Gouaux, J., Braha, O., Hobaugh, M., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., and Bayley, H. (1994). Subunit Stoichiometry of Staphylococcal Alpha-Hemolysin in Crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12828–12831.
- Gu, L.Q., Braha, O., Conlan, S., Cheley, S., and Bayley, H. (1999). Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* *398*, 686–690.
- Gu, L.Q., Cheley, S., and Bayley, H. (2001). Capture of a single molecule in a nanocavity. *Science* *291*, 636–640.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., and Leclerc, C. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* *193*, 1035–1044.
- Hall, A.R., Scott, A., Rotem, D., Mehta, K.K., Bayley, H., and Dekker, C. (2010). Hybrid pore formation by directed insertion of alpha-haemolysin into solid-state nanopores. *Nat. Nanotechnol.* *5*, 874–877.
- Healy, K., Schiedt, B., and Morrison, A.P. (2007). Solid-state nanopore technologies for nanopore-based DNA analysis. *Nanomed.* *2*, 875–897.

Holmgren, J., Lonnroth, I., Mansson, J., and Svennerholm, L. (1975). Interaction of Cholera Toxin and Membrane Gm1 Ganglioside of Small-Intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 2520–2524.

Howorka, S., Cheley, S., and Bayley, H. (2001). Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat. Biotechnol.* 19, 636–639.

Japrun, D., Henricus, M., Li, Q., Maglia, G., and Bayley, H. (2010). Urea Facilitates the Translocation of Single-Stranded DNA and RNA Through the alpha-Hemolysin Nanopore. *Biophys. J.* 98, 1856–1863.

Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D.W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13770–13773.

Kasianowicz, J.J., Balijepalli, A.K., Ettetdgui, J., Forstater, J.H., Wang, H., Zhang, H., and Robertson, J.W.F. (2016). Analytical applications for pore-forming proteins. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1858, 593–606.

Klimpel, K., Molloy, S., Thomas, G., and Leppla, S. (1992). Anthrax Toxin Protective Antigen Is Activated by a Cell-Surface Protease with the Sequence Specificity and Catalytic Properties of Furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10277–10281.

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Furey, W., Navaza, J., Sax, M., and Swaminathan, S. (2009). Domain Organization in Clostridium botulinum Neurotoxin Type E Is Unique: Its Implication in Faster Translocation. *J. Mol. Biol.* 386, 233–245.

Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., DasGupta, B.R., and Stevens, R.C. (1998). Crystal structure of botulinum neuro-toxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* 5, 898–902.

Lanzrein, M., Sand, O., and Olsnes, S. (1996). GPI-anchored diphtheria toxin receptor allows membrane translocation of the toxin without detectable ion channel activity. *Embo J.* 15, 725–734.

Lindberg, A., Brown, J., Stromberg, N., Westlingryd, M., Schultz, J., and Karlsson, K. (1987). Identification of the Carbohydrate Receptor for Shiga Toxin Produced by Shigella-Dysenteriae Type-1. *J. Biol. Chem.* 262, 1779–1785.

Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B., and Johannes, L. (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* 143, 973–990.

Manara, R.M.A., Tomasio, S., and Khalid, S. (2015). The Nucleotide Capture Region of Alpha Hemolysin: Insights into Nanopore Design for DNA Sequencing from Molecular Dynamics Simulations. *Nanomaterials* 5, 144–153.

Matsui, T., Gu, S., Lam, K., Carter, L.G., Rummel, A., Mathews, I.I., and Jin, R. (2014). Structural Basis of the pH-Dependent Assembly of a Botulinum Neurotoxin Complex. *J. Mol. Biol.* 426, 3773–3782.

- Movileanu, L., Howorka, S., Braha, O., and Bayley, H. (2000). Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore. *Nat. Biotechnol.* *18*, 1091–1095.
- Murphy, J.R. (2011). Mechanism of Diphtheria Toxin Catalytic Domain Delivery to the Eukaryotic Cell Cytosol and the Cellular Factors that Directly Participate in the Process. *Toxins* *3*, 294–308.
- Naglich, J., Metherall, J., Russell, D., and Eidels, L. (1992). Expression Cloning of a Diphtheria-Toxin Receptor - Identity with a Heparin-Binding Egf-Like Growth-Factor Precursor. *Cell* *69*, 1051–1061.
- Nivala, J., Marks, D.B., and Akeson, M. (2013). Unfoldase-mediated protein translocation through an alpha-hemolysin nanopore. *Nat. Biotechnol.* *31*, 247–250.
- Noel, R., Gupta, N., Pons, V., Goudet, A., Garcia-Castillo, M.D., Michau, A., Martinez, J., Buisson, D.-A., Johannes, L., Gillet, D., et al. (2013). N-Methyldihydroquinazolinone Derivatives of Retro-2 with Enhanced Efficacy against Shiga Toxin. *J. Med. Chem.* *56*, 3404–3413.
- Otero, A., Yi, X., Gray, M., Szabo, G., and Hewlett, E. (1995). Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* *270*, 9695–9697.
- Pannifer, A.D., Wong, T.Y., Schwarzenbacher, R., Renatus, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D.B., Collier, R.J., Park, S., Leppla, S.H., et al. (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* *414*, 229–233.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* *385*, 833–838.
- 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. *J. Biol. Chem.* *267*, 22599–22605.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Delaureto, P., Dasgupta, B., and Montecucco, C. (1992). Tetanus and Botulinum-B Neurotoxins Block Neurotransmitter Release by Proteolytic Cleavage of Synaptobrevin. *Nature* *359*, 832–835.
- Shen, Y., Guo, Q., Zhukovskaya, N.L., Drum, C.L., Bohm, A., and Tang, W.-J. (2004). Structure of anthrax edema factor–calmodulin–adenosine 5'-(α,β -methylene)-triphosphate complex reveals an alternative mode of ATP binding to the catalytic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *317*, 309–314.
- Silverman, J., Mindell, J., Zhan, H., Finkelstein, A., and Collier, R. (1994). Structure-Function-Relationships in Diphtheria-Toxin Channels .1. Determining a Minimal Channel-Forming Domain. *J. Membr. Biol.* *137*, 17–28.
- Song, L.Z., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., and Gouaux, J.E. (1996). Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* *274*, 1859–1866.

- Thelestam, M., and Blomqvist, L. (1988). Staphylococcal-Alpha Toxin - Recent Advances. *Toxicon* 26, 51–65.
- Thompson, J.F., and Oliver, J.S. (2012). Mapping and sequencing DNA using nanopores and nanodetectors. *Electrophoresis* 33, 3429–3436.
- Torgersen, M.L., Lauvrak, S.U., and Sandvig, K. (2005). The A-subunit of surface-bound Shiga toxin stimulates clathrin-dependent uptake of the toxin. *Febs J.* 272, 4103–4113.
- Uribe, K.B., Etxebarria, A., Martin, C., and Ostolaza, H. (2013). Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *Plos One* 8, e67648.
- Valeva, A., Walev, I., Pinkernell, M., Walker, B., Bayley, H., Palmer, M., and Bhakdi, S. (1997). Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11607–11611.
- Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J.-M., Ladant, D., and Chopineau, J. (2013). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20473–20478.
- Wilke, G.A., and Wardenburg, J.B. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13473–13478.
- Windschiegl, B., Orth, A., Roemer, W., Berland, L., Stechmann, B., Bassereau, P., Johannes, L., and Steinem, C. (2009). Lipid Reorganization Induced by Shiga Toxin Clustering on Planar Membranes. *Plos One* 4, e6238.
- Yu, M., and Haslam, D.B. (2005). Shiga Toxin Is Transported from the Endoplasmic Reticulum following Interaction with the Luminal Chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect. Immun.* 73, 2524–2532.
- Zhan, C., Li, C., Wei, X., Lu, W., and Lu, W. (2015). Toxins and derivatives in molecular pharmaceuticals: Drug delivery and targeted therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 90, 101–118.