

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



**Anna Suková**

Struktura a funkce bakteriální toxinů tvořících póry

Structure and function of bacterial pore-forming toxins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Mašín Ph.D.

Praha, 2015

**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, 8. 8. 2015

.....  
Anna Suková

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D. za cenné rady, inspiraci a pomoc při vypracovávání bakalářské práce.

Další poděkování patří vedoucímu Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AVČR Prof. Ing. Peteru Šebovi, CsC.. za možnost práce v jeho laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře fyziologie bakterií Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, především RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za neocenitelnou odbornou pomoc. Neméně mé díky patří i Doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CsC., RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D., Mgr. Petře Liškové, Mgr. Lucii Motlové, Bc. Tereze Dolejšové a Bc. Dominiku Pinkasovi a Lucii Jánské za celkovou podporu, pomoc a mnohé rady.

# Obsah

## Obsah

### Seznam použitých zkratek

### Abstrakt

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu</b> .....	<b>2</b>
2.1. STRUKTURA PERFRINGOLYSINU O .....	3
2.2. VAZBA NA MEMBRÁNU .....	4
2.3. OLIGOMERIZACE A MECHANISMUS INSERCE DO MEMBRÁNY .....	4
<b>3. <math>\alpha</math>-toxin bakterie <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>6</b>
3.1. STRUKTURA A-TOXINU .....	7
3.2. OLIGOMERIZACE A MECHANISMUS INSERCE DO MEMBRÁNY .....	9
<b>4. Aerolysin bakterie <i>Aeromonas hydrophila</i></b> .....	<b>9</b>
4.1. STRUKTURA AEROLYSINU .....	10
4.2. VAZBA NA MEMBRÁNU .....	11
4.3. OLIGOMERIZACE A INSERCE DO MEMBRÁNY .....	12
<b>5. RTX toxiny</b> .....	<b>13</b>
5.1. A-HEMOLYSIN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	14
5.1.1. Sekrece z buňky .....	15
5.1.2. Struktura proteinu .....	16
5.1.3. Pórotvorná a hemolytická aktivita HlyA .....	16
5.1.4. Interakce HlyA s membránou .....	17
5.2. ADENYLÁT CYKLÁZOVÝ TOXIN BAKTERIE <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i> .....	17
5.2.1. Struktura CyaA .....	18
5.2.2. Vazba na membránu .....	19
5.2.3. Posttranslační aktivace CyaA .....	20
5.2.4. Funkce CyaA .....	20
<b>6. Závěr</b> .....	<b>23</b>
<b>7. Seznam literatury:</b> .....	<b>25</b>

## Seznam použitých zkratek

$\alpha_M\beta_2$	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
Å	Ångström (jednotka délky – 0,1 nm)
ABC transportér	z ang. ATP Binding Casette
AC doména	adenylát cyklázová doména
AC-Hly	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
ACT	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
ATP	adenosin-5'-trifosfát
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CD	cirkulární dichroismus – metoda stanovení sekundární struktury proteinů
CD11a/CD18	integrin; specifický receptor pro HlyA <i>E.coli</i>
CD11b/CD18	integrin; specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
CD8+	cytotoxické T lymfocyty
CDC	cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu (z ang. cholesterol-dependent cytolysin)
CR3	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
CyaA	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
D1, D2, D3, D4	doména 1-4
Da	dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DLY	desulfolysin bakterie <i>Desulfobulbus propionicus</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELY	enterolysin bakterie <i>Enterbacter lignolyticus</i>
ERK	z ang. extracellular regulated kinase – MAP kináza
GPI	glykofosfatidylinositol
HlyA	$\alpha$ -hemolysin
IL-1 $\beta$	interleukin
IL-18	interleukin
IM	z ang. Inner Membrane, vnitřní membrána
JNK	z ang. c-Jun N-terminal kinase – MAP kináza
L1, L2, L3	smyčka 1-3 (z ang. loop)
Mac1	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
MAP kinázy	kinázy aktivované mitogenem (z. ang. Mitogen-Activated Protein Kinases)
MFP	z ang. Membrane Fusion Protein

MHC I	MHC glykoproteiny třídy I.
NALP3	z ang. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
OM	z ang. Outer Membrane; vnější membrána
OMP	z ang. Outer Membrane Protein
p38	p38 MAP kináza
PFO	perfringolysin O
PLY	pneumolysin bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i>
pro-IL-1 $\beta$	prekurzor interleukinu IL-1 $\beta$
RNA	ribonukleová kyselina
RTX	skupina cytolysinů s opakujícími se sekvencemi vážícími vápník (z ang. Repeats in ToXin)
T1SS	z ang. Type I Secretion System
TMH1, TMH2	transmembránové vlásenky (z ang. TransMembrane Hairpins)

### Seznam jednopísmených zkratk aminokyselin

Jednopísmená zkratka	Aminokyselina
A	Alanin
C	Cystein
D	Kyselina asparagová
E	Kyselina glutamová
F	Fenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
R	Arginin
T	Threonin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin
X	nespecifická aminokyselina

## **Abstrakt**

Bakteriální toxiny schopné tvorby transmembránových pórů představují širokou skupinu bakteriálních proteinů. Jsou významnými prvky virulence mnohých pathogenních bakterií. Svoji insercí do lipidové dvojvrstvy a vytvořením transmembránové póru v cytoplasmatické membráně vyvolávají narušení osmotické rovnováhy, která vede k lýzi napadené buňky. Různé skupiny toxinů využívají různé mechanismy napadení hostitelských buněk, přesto existuje několik univerzálních kroků – vazba na membránu, inserce do membrány, oligomerizace a vytvoření transmembránového póru.

Klíčová slova: bakteriální toxiny tvořící póry, mechanismus inserce do membrány, cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu,  $\alpha$ -toxin, aerolysin,  $\alpha$ -hemolysin, adenylát-cyklázový toxin

## **Abstract**

The pore-forming bacterial toxins are crucial virulence factors of pathogenic bacteria. Their essential feature is the capacity to form hydrophilic transmembrane pores in cytoplasmic membrane of target cells. It leads to impairment of osmotic balance which can result in cell lysis. These toxins use different mechanism of cell attack. However, there is few similar steps – membrane binding, insertion into membrane, oligomerization and forming of the transmembrane pore.

Keywords: bacterial pore-forming toxins, mechanism of membrane insertion, cholesterol-dependent cytolysins,  $\alpha$ -toxin, aerolysin,  $\alpha$ -hemolysin, adenylate-cyclase toxin

## 1. Úvod

Bakteriální toxiny schopné tvořit transmembránové póry představují nesourodou skupinu bakteriálních proteinů. Často jsou významnými faktory virulence mnohých gram pozitivních i gram negativních bakterií. Tvorba pórů v membráně hostitele vede k narušení celistvosti cytoplasmatické membrány a iontové rovnováhy, což může vést až k lýzi buněk. Toxiny jsou sekretované do prostředí v podobě rozpustných molekul. Musí tedy projít konformační změnou, aby se mohly podílet na tvorbě transmembránových pórů. I přesto, že jednotlivé toxiny se liší v mechanismu tvorby póru, existuje několik kroků, které mají společné. Těmi jsou vazba na membránu, inserce do membrány, oligomerizace a tvorba transmembránového póru.

Mnohé bakteriální toxiny využívají pro interakci s membránou cholesterol. Cholesterol se vyskytuje pouze v membránách živočichů. Existují dva hlavní způsoby jak cholesterol ovlivňuje aktivitu toxinu. Prvním je přímá vazba. Modelovou skupinou jsou v tomto případě např. cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu. Jak už jejich jméno napovídá, tyto toxiny využívají cholesterol jako specifický receptor v membráně. Druhým způsobem jakým toxiny využívají cholesterol v membráně je využívání vlivu cholesterolu na membránu. Cholesterol ovlivňuje tekutost membrány, má tedy vliv na laterální pohyb proteinů vázaných do membrány pomocí GPI kotvy a podporuje vznik lipidových raftů. Právě výskyt lipidových raftů je důležitý hned pro několik bakteriálních toxinů (Palmer, 2004).

V této práci se zaměřuji na několik významných a nejlépe prozkoumaných skupin bakteriálních toxinů tvořících póry. Mechanismus jejich funkce je často vysvětlen na modelovém zástupci dané skupiny.



## 2. Cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu

Cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu (CDC, z ang. Cholesterol-Dependent Cytolysins) je rodina bakteriálních toxinů tvořená velkým počtem proteinů. Dříve tuto skupinu tvořily pouze proteiny produkované fylogeneticky nepříbuznými rody gram pozitivních bakterií, jmenovitě *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* a *Listeria* (Bernheimer, 1974). V nedávné době byly ale objeveny proteiny, které splňují základní charakteristiky CDC, ale jsou produkovány gramnegativními bakteriemi. Jedná se o desulfolysin (DLY) bakterie *Desulfobulbus propionicus* a enterolysin (ELY) bakterie *Enterobacter lignolyticus*. Jedinou jejich odlišností od typických zástupců CDC je, že tyto proteiny nejsou cytolysiny a nejsou produkovány patogenními bakteriemi (Hotze *et al.*, 2013).

CDC mají několik společných znaků. Jsou si fyzicky podobné - mají obdobnou velikost (50-60 kDa) a náboj (pI 6,5-7,0), mají podobné ale ne úplně stejné antigenní struktury (Cowell a Bernheimer, 1977), jejich aktivita je blokována cholesterolem, případně jinými steroly. Tyto steroly fungují také jako receptory těchto toxinů pro vazbu na membránu (Howard *et al.*, 1953; Prigent a Alouf, 1976).

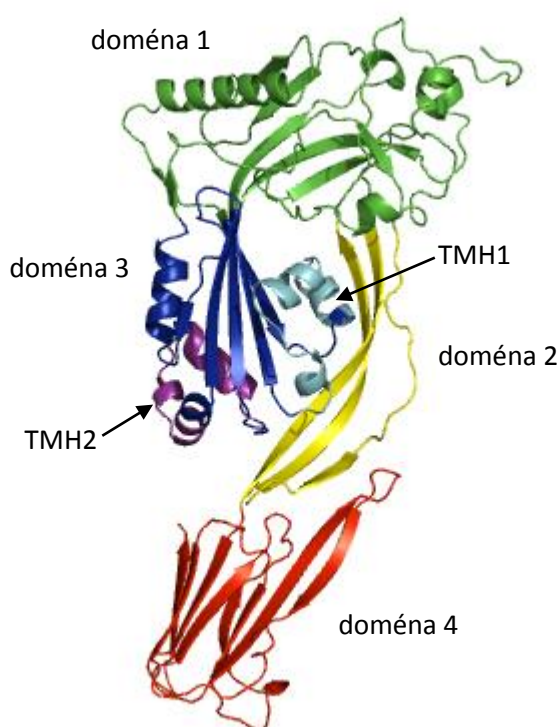
CDC jsou sekretovány jako rozpustné monomery. Sekrece probíhá pomocí obecné sekreční dráhy, ale existuje i výjimka. Sekreční dráha využívaná pneumolysinem (PLY, producent *Streptococcus pneumoniae*) není do dnešní doby známa (Balachandran *et al.*, 2001; Price a Camilli, 2009; Price *et al.*, 2012).

Při studiu inserce CDC do membrány pomocí elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že CDC tvoří kruhové a obloukovité struktury v membráně obsahující cholesterol. Tyto struktury jsou transmembránové póry o průměru 25-50 nm, které jsou tvořeny až 50 monomery (Buckingham a Duncan, 1983; Duncan a Schlegel, 1975; Prigent a Alouf, 1976).

Bylo zjištěno, že CDC sdílejí 40-70% homologních sekvencí. Při bližším zkoumání se také ukázalo, že tyto homologní sekvence tvoří hydrofobní jádra molekul nutná pro oligomerizaci a tvorbu póru (Rossjohn *et al.*, 1997). Proto struktura a mechanismus tvorby póru jednoho typického zástupce se dá aplikovat na téměř všechny členy této skupiny. V dalším popisu se tedy zaměřím především na perfringolysin O (PFO) produkovaný bakterií *Clostridium perfringens*, který je modelovým zástupcem této skupiny bakteriálních toxinů.

## 2.1. Struktura perfringolysinu O

Struktura perfringolysinu O (PFO, nebo také  $\theta$ -toxin) bakterie *Clostridium perfringens* byla zjištěna pomocí rentgenové difrakce (Feil *et al.*, 1996). Monomer PFO se skládá ze čtyř domén – D1, D2, D3 a D4 (obr. 1). V monomerní formě je PFO tvořen převážně z  $\beta$ -vlákny, ale obsahuje i několik  $\alpha$ -šroubovic. Na první pohled není zjevné, kterou částí se protein insertuje do membrány, protože neobsahuje žádné delší hydrofobní úseky (Rossjohn *et al.*, 1997).



Obr. 1: Struktura molekuly perfringolysinu (PFO). Jednotlivé domény jsou barevně rozlišeny (D1 – zelená, D2 – žlutá, D3 – modrá, D4 – červená). V doméně 3 jsou barevně označeny transmembránové vlásenky (TMH1 – azurová, TMH2 – fialová) (převzato a upraveno podle Rossjohn *et al.* 1997).

Doména D3 obsahuje v monomerním stavu šest  $\alpha$ -šroubovic. Tyto šroubovice procházejí značnou změnou sekundární struktury při oligomerizaci - jsou přeměněny na čtyři  $\beta$ -vlákna tvořící dvě transmembránové vlásenky (Hotze *et al.*, 2001; Rossjohn *et al.*, 1997; Shatursky *et al.*, 1999; Shepard *et al.*, 1998).

Doména D4 je na ostatní domény napojena jen pomocí jednoho glycinového zbytku. To umožňuje její značnou flexibilitu vůči ostatním doménám. V doméně D4 se nacházejí čtyři nestrukturované smyčky, které se podílejí na vazbě na membránu (Ramachandran *et al.*, 2002, 2004; Soltani *et al.*, 2007).

## 2.2. Vazba na membránu

CDC využívají cholesterol jako receptor v membráně. Vazba na receptor probíhá stereospecificky přes 3- $\beta$ -OH skupinu cholesterolu. Steroly vhodné pro vazbu CDC musí obsahovat pouze 3- $\beta$ -OH skupinu a alifatický vedlejší řetězec. Další vedlejší skupiny, které by mohly stéricky bránit vazbě sterolu na CDC, se vyskytovat nesmí (Bernheimer, 1974; Harris *et al.*, 1998). Dříve se předpokládalo, že cholesterol slouží jako receptor pro všechny CDC. Zodpovědnost za vazbu na cholesterol se připisovala smyčce v doméně D4 sestávající z 11 aminokyselin (ECTGLAWEWWR) (tzv. UDP smyčka – z ang. undcapeptide). Sekvence UDP smyčky je silně sekvenčně konzervovaná, proto se předpokládalo, že konzervovaná je i její funkce (Kehoe *et al.*, 1987; Mengaud *et al.*, 1988; Tweten, 1988; Walker *et al.*, 1987). Existují ale i CDC, u nichž se sekvence UDP z části liší. Tyto CDC (intermedilysin *Streptococcus intermedius*, vaginolysin *Gardnerella vaginalis* a lectinolysin *Streptococcus mitis*) se váží na membránu pomocí specifického receptoru CD59 (Giddings *et al.*, 2004). Přesto potřebují cholesterol pro svoji pórtočnou aktivitu. Pravděpodobně tedy musí existovat i jiná struktura zodpovědná za vazbu cholesterolu (Giddings *et al.*, 2003).

Doména D4 obsahuje kromě UDP smyčky ještě další tři smyčky (L1, L2, L3), které interagují s membránou (Soltani *et al.*, 2007). Cílenou mutagenézou byly identifikovány dva aminokyselinové zbytky ve smyčce L1, které hrají významnou roli při vazbě cholesterolu (T490 a L491). Také se ukázalo, že tyto aminokyselinové zbytky mají u různých CDC velmi konzervovanou 3D strukturu. Tím se liší od sekvence UDP smyčky, která vykazuje sekvenční konzervovanost, ale její 3D struktura se ale u různých CDC liší (Farrand *et al.*, 2010; Ramachandran *et al.*, 2002). Bylo ukázáno, že na vazbě na membránu se tedy podílejí všechny čtyři smyčky domény D4. L1 je zodpovědná přímo za vazbu cholesterolu, L2 a L3 se zanořují do membrány, kde napomáhají kotvení domény D4. UDP smyčka se také částečně insertuje do membrány (Ramachandran *et al.*, 2002, 2004).

## 2.3. Oligomerizace a mechanismus inserce do membrány

Oligomer PFO se skládá z přibližně 30 monomerů a tvoří velký transmembránový pór o průměru přibližně 300 Å. Předtím než vznikne transmembránový pór zanořený do membrány, je nutné vytvoření prekursoru póru vázaného na membránu (obr. 2). Vytvoření prekursoru póru a jeho přeměna na transmembránový pór je kaskádovitý proces, při kterém dochází k přeměnám sekundární i terciární struktury monomeru. V prvním kroku dochází k iniciaci vazby monomerů na molekuly cholesterolu v membráně. Poté dochází k vazbě

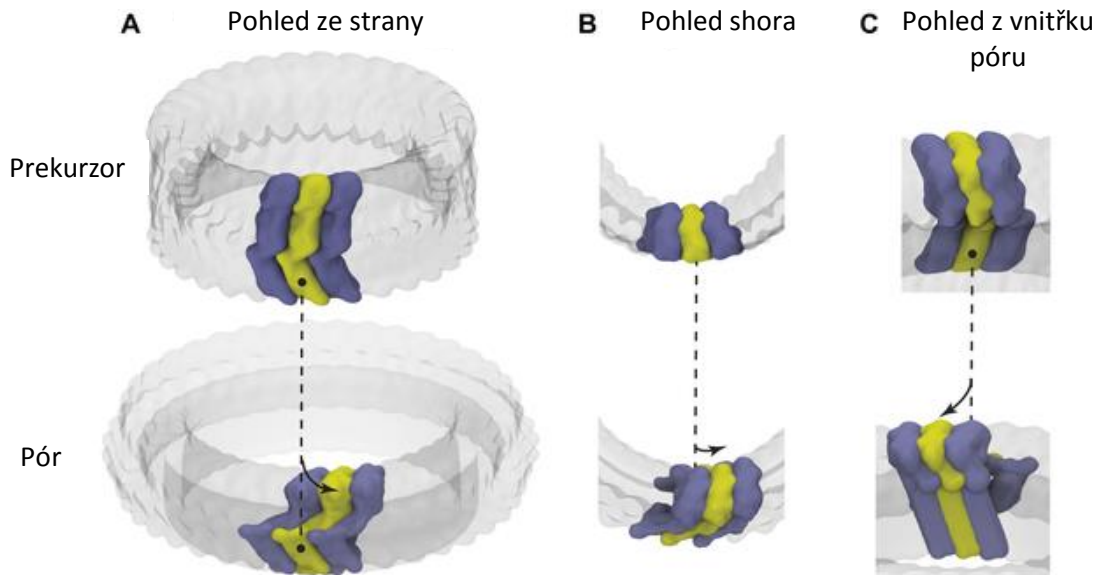
domény D4 na membránu. Vazba je zprostředkovaná čtyřmi smyčkami nacházejícími se v doméně D4, které se zanořují do membrány. Zbytek domény D4 se do membrány nezanořuje a zůstává na vnější straně cytoplasmatické membrány (Heuck *et al.*, 2000).

Pro vytvoření transmembránového póru je nutná konformační změna v doméně D3. Na tu má vliv několik faktorů – konformační změna způsobující oddálení domén D2 a D3 (Rossjohn *et al.*, 2007), vazba D4 na membránu (Heuck *et al.*, 2000) a počínající oligomerizace (Hotze *et al.*, 2012). Všechny tři procesy jsou na sobě navzájem závislé. Interakce mezi doménami D2 a D3 zabraňuje změně konformace domény D3. Proto je nutná jiná konformační změna, která oddaluje doménu D2 od D3. Ta probíhá rotací D3 o 35° kolem osy monomeru a je iniciována D4. Současně musí dojít k vazbě D4 na molekulu cholesterolu v membráně. Bez této vazby D3 nemůže změnit konformaci. Konformace D3 a D4 jsou na sebe velmi úzce vázány. Posledním faktorem ovlivňující konformační změnu D3 je počínající oligomerizace proteinu. Nejprve dochází ke slabým, ale velmi specifickým interakcím mezi jednotlivými monomery. Ty postupně vedou až ke změně konformace D3.

Změna konformace D3 vede k nevratnému vytvoření oligomeru a inserci do membrány. Tímto provázáním jednotlivých kroků se protein pojišťuje proti předčasné inserci do membrány a nespecifické agregaci proteinu. Kdyby totiž došlo k předčasnému natažení transmembránových vlásenek dříve než je toxin navázán na membránu, mohlo by dojít k nespecifické agregaci monomerů (Heuck *et al.*, 2000; Hotze *et al.*, 2012; Rossjohn *et al.*, 2007). Při konformační změně D3 dochází k rozsáhlé změně sekundární struktury domény. Šest  $\alpha$ -šroubovic D3 je přeměněno na čtyři  $\beta$ -vlákna, která tvoří dvě transmembránové vlásenky (TMH). Tyto vlásenky se synchronizovaně zanořují do membrány a tvoří stěny transmembránového póru. K tomuto zanoření dochází ale až po vytvoření oligomerizovaného prekurzoru póru vázaného na membránu (Hotze *et al.*, 2001; Shatursky *et al.*, 1999; Shepard *et al.*, 1998).

Při inserci do membrány dochází k další velmi významné konformační změně. Prekurzor póru a transmembránový pór se od sebe liší svojí výškou asi o 40 Å. Musí tedy docházet k vertikálnímu kolapsu struktury póru. Pokud by k němu nedocházelo, transmembránové vlásenky D3 by byly příliš vzdáleny od membrány a nemohlo by dojít k jejich inserci. Vertikální kolaps jednoznačně umožňuje D2. Ostatní domény při kolapsu výrazně nemění svoji konformaci. Mechanismus kolapsu ale není přesně znám. Jedna z možností je, že dochází k ohnutí  $\beta$ -listů, které tvoří D2. To by vedlo k dostatečnému přiblížení D3 k membráně. Druhou možností je, že D2 rotuje a dostává se z pozice téměř kolmé

k membráně do pozice téměř rovnoběžné s membránou (Czajkowsky *et al.*, 2004; Ramachandran *et al.*, 2005; Reboul *et al.*, 2014).



Obr. 2: Schématické znázornění navrženého pohybu domén při inserci oligomeru do membrány. Horní řada: model prekurzoru póru vázaného na membránu ze tří různých pohledů (A, B, C). Dolní řada: model póru insertovaného do membrány ze tří různých pohledů (A, B, C). Jednotlivé monomery jsou odlišené barevně. Pro přehlednost jsou vyznačeny pouze tři monomery. Zbytek oligomeru je naznačen šedě. Pomocí přerušované čáry jsou spojeny domény 4 v prekurzoru póru a póru (převzato a upraveno podle Reboul *et al.* 2014).

### 3. $\alpha$ -toxin bakterie *Staphylococcus aureus*

$\alpha$ -toxin je prototypem skupiny bakteriálních toxinů tvořících malé  $\beta$ -soudky v membráně. Do této skupiny dále patří např. leukocidiny a  $\gamma$ -hemolysiny produkované bakterií *Staphylococcus aureus*, leukocidiny bakterie *Staphylococcus intermedius*,  $\beta$ -toxin bakterie *Clostridium perfringens* a hemolysin II a cytotoxin K bakterie *Bacillus cereus*. Tyto toxiny tvoří jednu skupinu na základě sekvenčních homologií (Comai *et al.*, 2002; Prévost *et al.*, 2001).

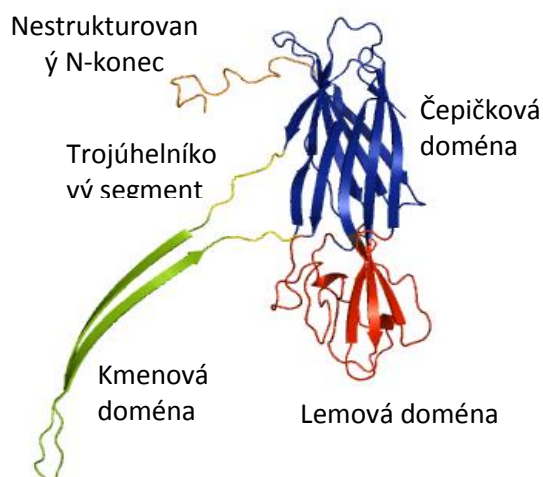
$\alpha$ -toxin je bakteriální toxin produkovaný pathogeními kmeny grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Toxin je sekretován jako rozpustný monomer. Skládá se z 293 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 33,2 kDa. Po vazbě a inserci do membrány dochází k jeho oligomerizaci a vytvoření transmembránového póru tvořeného 7 podjednotkami (Bhakdi a Tranum-Jensen, 1991; Gray a Kehoe, 1984).

Toxin se preferenčně váže do lipidových raftů bohatých na sfingomyelin a cholesterol, které se nacházejí například v membránách červených krvinek (Valeva *et al.*, 2006). Je ale také schopen se vázat na membrány širšího spektra buněk a způsobovat buněčnou lýzi, i když až při použití vyšších koncentrací. Mezi ně patří např. lidské červené krvinky, monocyty, lymfocyty a endoteliální buňky (Bhakdi a Tranum-Jensen, 1991; Hildebrand *et al.*, 1991). Existují ale i buňky, které vykazují vazbu toxinu, ale už u nich nedochází k buněčné lýzi. Například lidské granulocyty mají přirozenou rezistenci vůči působení  $\alpha$ -toxinu (Valeva *et al.*, 1997).

Vliv toxinu na buňky hostitele se liší podle typu buněk, ale také podle koncentrace toxinu. Při působení nízkou koncentrací toxinu dochází nejprve k vytvoření transmembránových porů. To následně vede k průchodu iontů přes membránu a pošení membránového potenciálu. Současně dochází ke snížení vnitrobuněčné hladiny ATP. V pozdější fázi působení toxinu je pozorován i únik větších molekul z buňky, který je způsobený ztrátou integrity membrány. Vyšší koncentrace způsobuje nekrózu a lýzi buněk (Jonas *et al.*, 1994; Menzies a Kourteva, 2000).

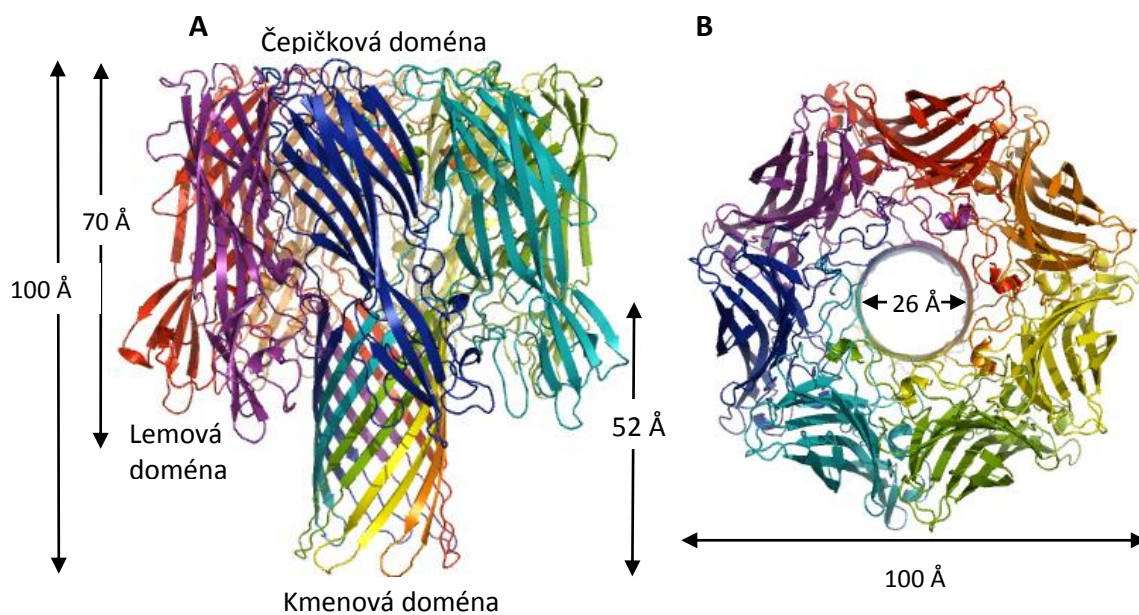
### 3.1. Struktura $\alpha$ -toxinu

Prostorové uspořádání proteinu v membráně bylo vyřešeno pomocí rentgenové krystalografie (Song *et al.*, 1996) (obr. 3). Jednotlivé monomery  $\alpha$ -toxinu v nativní konformaci se skládají z šestnácti  $\beta$ -vláken, čtyř  $\alpha$ -šroubovic a dalších nestrukturovaných segmentů. Významným nestrukturovaným segmentem je N-konec, dále spojovací segment mezi dvěma  $\beta$ -vláknými kmenové domény, a dva krátké segmenty tvořící tzv. trojúhelníkový segment. Trojúhelníkový segment se významně podílí na interakci mezi protomery (Song *et al.*, 1996; Tobkes *et al.*, 1985).



Obr. 3: Monomer  $\alpha$ -toxinu. Jednotlivé domény jsou vyznačeny barevně: nestrukturovaný N-konec - oranžová, čepičková doména - modrá, lemová doména - červená, trojúhelníkový segment - žlutá, kmenová doména - zelená (upraveno a převzato z Song *et al.* 1996)

Transmembránový pór tvoří oligomer hřibovitého tvaru o rozměrech 100 Å na výšku i v průměru. Oligomer je tvořen sedmi monomery, které všechny zaujímají stejnou konformaci. Pór je složen ze tří významných částí – tzv. čepičkovou doménou, sedmi tzv. lemovými doménami a tzv. kmenovou doménou (obr. 4). Čepičková doména je tvořena velkým počtem  $\beta$ -vláken organizovaných do několika  $\beta$ -listů. Lemové domény vyčnívají na spodní straně čepičkové domény. Nepodílejí se na kontaktu jednotlivých monomerů, zato jsou v přímém kontaktu s membránou. Obě tyto části se nacházejí vně membrány a nepodílejí se na přímé tvorbě transmembránového póru. Kmenová doména tvoří transmembránový pór. Skládá se z 14  $\beta$ -vláken uspořádaných do sedmi vlásenek (z každého monomeru jedna). Dohromady tyto vlásenky tvoří pravotočivý  $\beta$ -soudek zanořený do membrány. V prostoru mezi kmenovou a lemovými doménami se nachází segment bohatý na aromatické a kyselé aminokyseliny. Ty slouží k interakci s hlavičkami fosfolipidů a dalšími receptory na povrchu membrány (Song *et al.*, 1996).



Obr. 4: Oligomer  $\alpha$ -toxinu *S.aureus* tvořený sedmi podjednotkami. Každý monomer je vyznačen jinou barvou. A) Pohled kolmo na osu póru. Celý pór má asi 100 Å na výšku i na šířku. Výška kmenové domény tvořící transmembránový pór je 52 Å. Společná výška čepičkové a lemové domény je 72 Å. B) Pohled shora (upraveno a převzato ze Song *et al.* 1996).

Velikost transmembránového póru je v různých částech rozdílná. Transmembránový pór nemá tvar válce, ale spíše zužujícího se kužele. V čepičkové části póru průměr dosahuje až 46 Å. Na druhou stranu, průměr kmenové části je jen okolo 14-24 Å. Z bližšího studia dynamiky oligomerního póru vyplývá, že transmembránová část proteinu má velmi rigidní

strukturu a je velmi stabilní. Na druhou stranu části proteinu vně membrány celkově vykazují větší volnost struktury a jsou náchylné na působení proteáz (Vécsey-Semjén *et al.*, 1999).

Vnitřkem póru mohou procházet molekuly vody (Paula *et al.*, 1999), ale i jiné nenabitě molekuly (Bashford *et al.*, 1996). Průchod molekul pórem závisí na elektrickém poli v jeho okolí, které je způsobeno koncentrací iontů k okolí vstupu. Bylo ukázáno, že póry tvořené  $\alpha$ -toxinem jsou lehce selektivní pro anioty. Za tuto selektivitu jsou zodpovědné tři aminokyselinové zbytky, konkrétně D45, N49 a K51 (Bezrukov a Kasianowicz, 1993; Cescatti *et al.*, 1991; Song *et al.*, 1996). Díky selektivitě pro anionty může póry procházet i DNA. Toho se v dnešní době začíná využívat pro nové metody sekvenace DNA (Bayley, 2006; Kasianowicz *et al.*, 1996; Maglia *et al.*, 2010).

### 3.2. Oligomerizace a mechanismus inserce do membrány

Jelikož je protein v monomerní formě rozpustný, musí docházet k částečné konformační změně při inserci do membrány.  $\beta$ -vlákna kmenové domény jsou přiložena k nepolární části monomeru. Změna konformace proteinu je katalyzována interakcí s membránou (Füssle *et al.*, 1981; Song *et al.*, 1996). K oligomerizaci proteinu dochází po inserci monomerů do membrány. Významnou roli při oligomerizaci hrají N-koncové nestrukturované segmenty, které interagují s  $\beta$ -listy protilehlého monomeru. Odstranění dvou aminokyselin z N-konce vede k odstranění hemolytické aktivity proteinu a inhibici oligomerizace (Walker *et al.*, 1992).

## 4. Aerolysin bakterie *Aeromonas hydrophila*

Aerolysin je modelovým zástupcem skupiny bakteriální toxinů tvořících póry, které jsou sekretované v neaktivní formě. Dále tuto skupinu tvoří aerolysin bakterie *Aeromonas sobria*,  $\alpha$ -toxin bakterie *Clostridium septicum* a mnohé hemolysiny rodu *Vibrio* (Fivaz *et al.*, 2001).

Aerolysin je cytolytický toxin produkovaný kmeny gramnegativní bakterie *Aeromonas hydrophila*. Tvoří transmembránové póry tvořené 7 podjednotkami i přesto, že protein samotný nemá ve struktuře žádný delší hydrofobní segment (Howard *et al.*, 1987; Moniatte *et al.*, 1996). Póry mají průměr 17-23 Å a jsou selektivní pro anionty. Inserce pórů do membrány umožňuje průchod iontů přes membránu. To vede k narušení iontových gradientů a ztrátě membránového potenciálu. Pór také umožňuje vstup  $\text{Ca}^{2+}$  dovnitř buňky. Nárůst koncentrace



Ca<sup>2+</sup> uvnitř buňky vede ke spuštění apoptózy a nekrózy buňky (Abrami *et al.*, 1998a; Krause *et al.*, 1998; Tschödrich-Rotter *et al.*, 1996; Wilmsen *et al.*, 1990; Wilsem *et al.*, 1992).

Jelikož je *Aeromonas hydrophila* gramnegativní bakterie, aerolysin musí řešit problém transportu přes vnější cytoplasmatickou membránu. Toxin je během translace sekretován do periplasmatického prostoru pomocí N-koncové signální sekvence a pak dále přes vnější membránu pomocí sekrečního systému typu II (Howard a Buckley, 1985a).

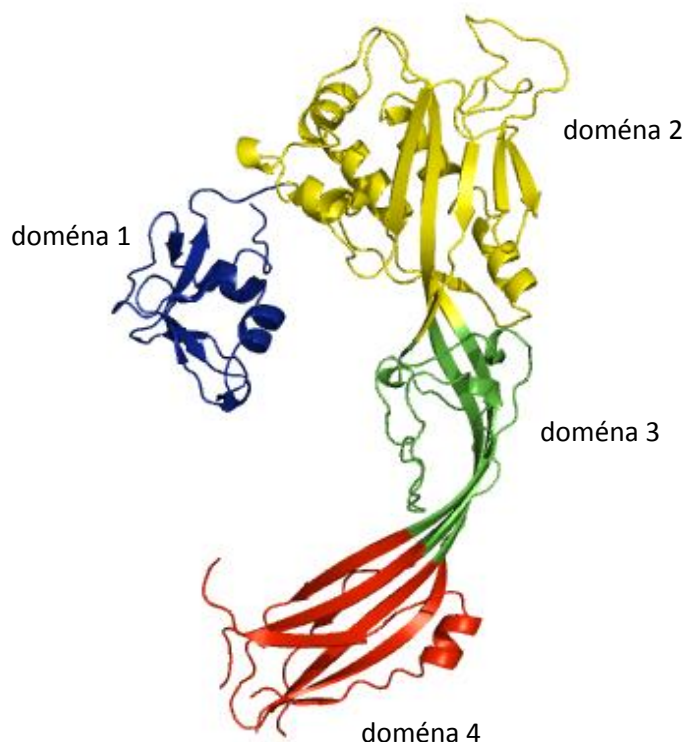
#### 4.1. Struktura aerolysinu

Aerolysin je produkován v neaktivní formě tzv. proaerolysinu. K jeho aktivaci dochází proteolytickým štěpením 25-50 aminokyselin z C-konce proteinu. Štěpení může být způsobeno různými proteázami, pocházejícími jednak z hostitele nebo produkovány samotnou bakterií. Jedinou podmínkou je specifická pro neutrální a bazické aminokyseliny. Příkladem proteáz schopných aktivovat proaerolysin jsou například trypsin, chymotrypsin, clostripain, thermolysin, proteináza K. Stejně tak může být toxin štěpen i savčí endoproteázou furinem (Abrami *et al.*, 1998b; Garland a Buckley, 1988; Howard a Buckley, 1985b).

Sekundární struktura proaerolysinu je stabilizovaná dvěma disulfidickými můstky. Celková stabilita toxinu se dramaticky zvyšuje po vytvoření oligomeru. Oligomerní póry jsou extrémně odolné proti působení proteáz nebo denaturačních činidel. Při působení proteázami po dobu několika dnů nedochází k rozpadu komplexu póru. Hlavní roli v udržení stabilní konformace hrají domény 3 a 4. Obě domény jsou tvořeny výhradně  $\beta$ -vláknky a nestrukturovanými úseky. D1 nehraje žádnou roli při stabilizaci toxinu (Lesieur *et al.*, 1999).

Proaerolysin se skládá ze dvou laloků (obr. 5). Menší lalok je složen pouze z jedné domény (D1), zatímco větší lalok ze tří domén sdílejících několik  $\beta$ -vláken (D2, D3 a D4). Menší lalok se podílí na tvorbě dimerů. Větší lalok tvoří samotnou transmembránovou část póru. K aktivaci proteolytickým štěpením dochází právě v D4. Samotným štěpením ale nedochází k odstranění peptidu ze struktury, především kvůli hydrofobním interakcím a solným můstkům. K tomu dochází až při přiblížení k membráně (Diep *et al.*, 1998a; Lesieur *et al.*, 1999; Parker *et al.*, 1994). Doména D2 je důležitá pro iniciaci oligomerizace (Buckley *et al.*, 1995). D2 obsahuje většinu  $\alpha$ -šroubovic struktury toxinu. D3 hraje roli v interakci mezi monomery (Lesieur *et al.*, 1999) a podílí se na tvorbě póru (Degiacomi *et al.*, 2013). C-koncový peptid má dvojí funkci. Zabraňuje tvorbě nespecifických agregátů během sekrece

a kontroluje skládání monomeru do nativní konformace. Také se podílí na kontrole kvarterní struktury transmembránového komplexu (Iacovache *et al.*, 2011).



Obr. 5: Monomer proaerolysinu. Jednotlivé domény jsou vyznačeny barevně (D1 – modrá, D2 – žlutá, D3 – zelená, D4 – červená) (převzato a upraveno podle Parker *et al.* 1994).

#### 4.2. Vazba na membránu

Aerolysin se specificky váže na různé receptory. Ty se sice liší primární sekvencí, ale všechny jsou vázány GPI kotvou do membrány. Vazby na receptor je toxin schopen jen v podobě monomeru (Fivaz *et al.*, 1999). Afinita k různým receptorům se liší podle struktury GPI kotvy. Polypeptid receptoru se podílí na vazbě toxinu, neboť samotná sacharidová část receptoru není schopna vazby toxinu (Abrami *et al.*, 2002). Aerolysin má dvě vazebná místa pro receptor. Jedno se nachází v doméně D1 a zodpovídá za vazbu cukerné složky receptoru, modifikovaného N-glykanem. K vazbě dochází pomocí aminokyselinových zbytků W45, I47, M57, Y61 a K66 (Hong *et al.*, 2002; MacKenzie *et al.*, 1999). Druhé vazebné místo se nachází v D2. Aminokyselinové zbytky Y162, W324 a H332 zodpovídají za vazbu GPI-kotvy (MacKenzie *et al.*, 1999).

Vazba na receptor kotvený pomocí GPI je pro toxin výhodná. Proteiny kotvené pomocí GPI kotvy mají zvýšenou laterální difúzi, což vede k rychlejšímu nalezení monomerů

pro tvorbu oligomeru. Oligomerizace je také usnadněna posunem receptoru v membráně do lipidových raftů bohatých na cholesterol a sfingomyelin. Lipidové rafty slouží jako místa zakoncentrování toxinu vázaného na membránu (Abrami a van der Goot, 1999; Abrami *et al.*, 2002; Cowell *et al.*, 1997; Diep *et al.*, 1998b; Howard a Buckley, 1982).

### 4.3. Oligomerizace a inserce do membrány

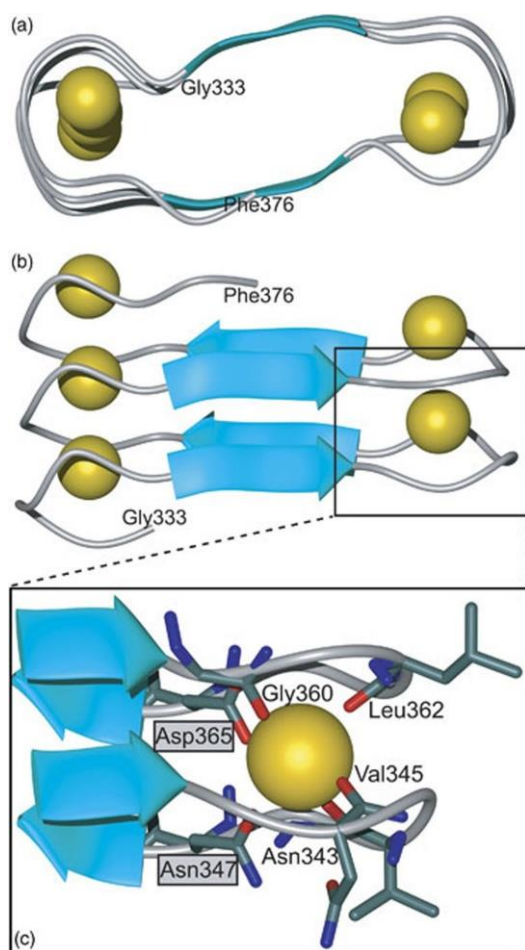
Proaerolysin se skládá v periplasmatickém prostoru, kde tvoří dimery. K tvorbě dimerů dochází z důvodu ochrany proteinu před nechtěným proteolytickým štěpením jak v periplasmatickém prostoru, tak vně buňky. Na tvorbě dimerů se významně podílí menší lalok. Dimer vzniká přiložením menších laloků dvou monomerů k sobě v opačném směru. Tím dochází k stabilizaci struktury obou D1. Štěpení proteázami nevede k zániku dimerů, k oslabení interakce mezi monomery, ani k výraznější konformační změně monomerů samotných (van der Goot *et al.*, 1993).

Tvorba dimerů je stále poněkud kontroverzní téma i přesto, že struktura proaerolysinu byla získána právě z krystalu dimeru. Fivaz a kolegové (1999) tvrdí, že toxin se při nízkých koncentracích, které jsou blízké fyziologickému stavu, vyskytuje pouze v monomerním stavu. Tvorba dimerů podle nich nastává pouze při vysokých koncentracích toxinu. Na druhou stranu Barry a kolegové (2001) ukázali, že k tvorbě dimerů dochází i při nízkých koncentracích toxinu.

Přesný popis vzniku pórů není do dnešní doby znám. Je ale známo, že při tvorbě oligomeru nedochází k zásadním změnám v sekundární struktuře monomerů (Van der Goot *et al.*, 1993). Dochází ale k změně terciární struktury (Cabiaux *et al.*, 1997). Významnou roli při tvorbě oligomeru hraje doména D2, konkrétně H132 a H107, které zprostředkovávají interakci mezi jednotlivými monomery (Green a Buckley, 1990; Wilmsen *et al.*, 1991). Existuje model, podle kterého nejprve dochází k vazbě monomerů na receptory v membráně. Dále se monomery koncentrují v lipidových raftech. Následnou aktivací pomocí proteázy dochází k odhalení hydrofobní plochy D4, která následně interaguje s membránou. Současně s membránou interaguje i hydrofobní plocha D1, která je jinak ve vodném prostředí schovaná dimerizací toxinu. V dimeru jsou k sobě malé laloky domény D1 přiloženy svými hydrofobními plochami (van der Goot *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1994).

## 5. RTX toxiny

Rodina RTX toxinů (z anglického Repeats in ToXin) zahrnuje široké spektrum proteinů produkovaných gramnegativními bakteriemi. Při prvním představení (Welch, 1991) tato rodina proteinů zahrnovala pouze cytolytické a pórotravné toxiny patogenních bakterií. Od té doby byla tato skupina rozšířena i o další proteiny jako např. metaloproteázy a lipázy (Linhartová *et al.*, 2010). RTX toxiny mají podobnou organizaci kódovaných genů. Téměř všechny potřebné geny jsou kódovány v jednom komplexním operonu *rtxCABD* (Lally *et al.*, 1999). RTX toxiny jsou produkovány v neaktivní formě. Pro tvorbu aktivního RTX toxinu je nutná postranlační modifikace mastnou kyselinou. Za tuto modifikaci je zodpovědná acyltransferáza RtxC (Linhartová *et al.*, 2010). Hlavním znakem RTX toxinů jsou opakující se sekvence tvořené devíti aminokyselinovými zbytky bohaté na glycin a aspartát též označované jako tzv. RTX motiv (Obr. 6). Tento motiv má společnou sekvenci X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D (Linhartová *et al.*, 2010). Počet RTX motivů je různý mezi jednotlivými zástupci od šesti po přibližně padesát. RTX motivy váží do své terciární struktury  $Ca^{2+}$  za vzniku  $\beta$ -šroubovice. Tato terciární struktura byla postulována na základě znalosti struktury alkalické proteázy *Pseudomonas aeruginosa*, která obsahuje šest RTX motivů (Baumann *et al.*, 1993). Prvních šest aminokyselinových zbytků RTX motivu tvoří smyčku, která váže jeden vápenatý kation. Zbylé tři aminokyselinové zbytky tvoří krátké  $\beta$ -vlákno. Opakující se RTX motivy dohromady vytvářejí pravotočivou šroubovici. Správné poskládání terciární struktury závisí na poloměru kationtů vázaných v otáčkách. Bylo ukázáno, že pouze vápník umožňuje zaujetí správné terciární struktury. Tento model je podpořen i CD spektry, která naznačují, že vazba  $Ca^{2+}$  nemá vliv na sekundární strukturu proteinu ale jen na terciární (Bakás *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 1993; Ostolaza *et al.*, 1995). Jelikož RTX toxiny zpravidla neobsahují cysteinové zbytky ve své aminokyselinové sekvenci, vazba  $Ca^{2+}$  je dobrou alternativou pro vytvoření stabilní terciární struktury. Vazba  $Ca^{2+}$  do RTX motivů také indukuje konformační změny v ostatních doménách toxinu, které jsou nutné pro interakci s receptorem, případně s cytoplasmatickou membránou (Sanchez-Magraner *et al.*, 2007; Sánchez-Magraner *et al.*, 2010; Schindel *et al.*, 2001).



Obr. 6: 3D model  $\beta$ -šroubovice tvořené RTX motivy alkalické proteázy bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

(a) pohled shora (b) pohled ze strany

Na obrázku jsou znázorněny krátké  $\beta$ -vlákna (modře), nestruturované smyčky (šedivě) a vápenaté kationty vázané ve struktuře (žluté kuličky).

(c) detailní pohled na místo do kterého se váže vápník. Každý  $\text{Ca}^{2+}$  je vázán pomocí šesti aminokyselinových zbytků (převzato a upraveno podle Linhartová *et al.*, 2010)

Dalším charakteristickým znakem je sekrece toxinu z buňky pomocí sekrečního systému typu I. Podrobnějšímu mechanismu sekrece se budu věnovat později, při popisu sekrece  $\alpha$ -hemolysinu *E. coli*. Ten je jedním z nejlépe charakterizovaných RTX toxinů, tudíž je možno ho použít jako modelového zástupce a dále se věnovat hlavně jemu.

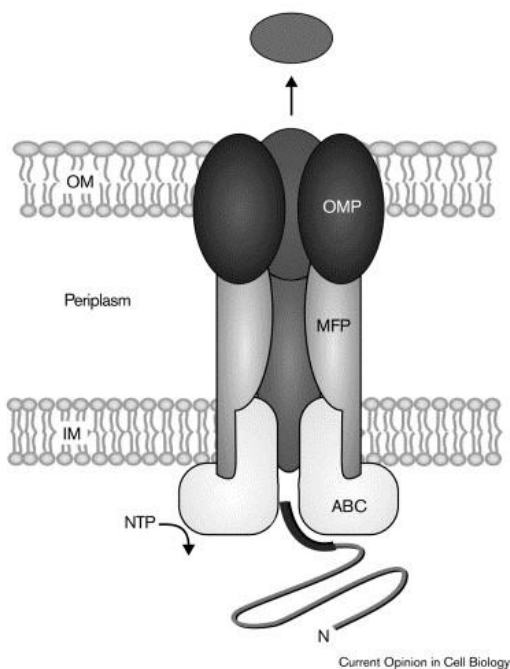
### 5.1. $\alpha$ -hemolysin *Escherichia coli*

$\alpha$ -hemolysin (HlyA) je produkován některými patogenními kmeny *Escherichia coli*. Jeden komplexní operon kóduje čtyři geny - *hlyCABD*. Tyto geny kódují proteiny potřebné pro produkci aktivního toxinu a proteiny potřebné pro jeho sekreci (Goebel *et al.*, 1974; Noegel *et al.*, 1979, 1981). HlyA je produkován ve formě neaktivního proteinu proHlyA. Ten musí být aktivován posttranslační modifikací. Posttranslační modifikace je zajišťována acyltransferázou HlyC, která modifikuje dva lysinové zbytky K594 a K690. Bez modifikace mastnou kyselinou toxin nemá hemolytickou aktivitu (Hardie *et al.*, 1991; Hyland *et al.*, 2001; Issartel *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1994).

### 5.1.1. Sekrece z buňky

HlyA je sekretován z buňky pomocí sekrečního systému typu I (T1SS), který byl právě na  $\alpha$ -hemolysinu *E. coli* poprvé popsán. Toxin je sekretován přes vnitřní i vnější cytoplasmatickou membránu v denaturovaném stavu pomocí jednoho kanálu (obr. 7). Tento kanál je tvořen třemi proteiny. Pro sekreci HlyA jsou jimi proteiny HlyB, HlyD a TolC. TolC není kódován ve stejném operonu jako zbylé dva proteiny, ale samostatně jinde na chromosomu (Wandersman a Delepelaire, 1990). HlyB patří do rodiny tzv. ABC transporterů. Na jeho C-konci se nachází ATP vazebné místo. HlyD patří mezi tzv. MFP (membrane fusion protein). HlyD má jednu transmembránovou doménu a velkou periplasmatickou doménu nacházející se na C-konci. TolC je protein vnější membrány (OMP – z ang. Outer Membrane Protein), který ve vnější membráně tvoří kanál výrazně zasahující do periplasmatického prostoru (Gentschev a Goebel, 1992; Koronakis *et al.*, 2000; Pimenta *et al.*, 1999; Schulein *et al.*, 1994).

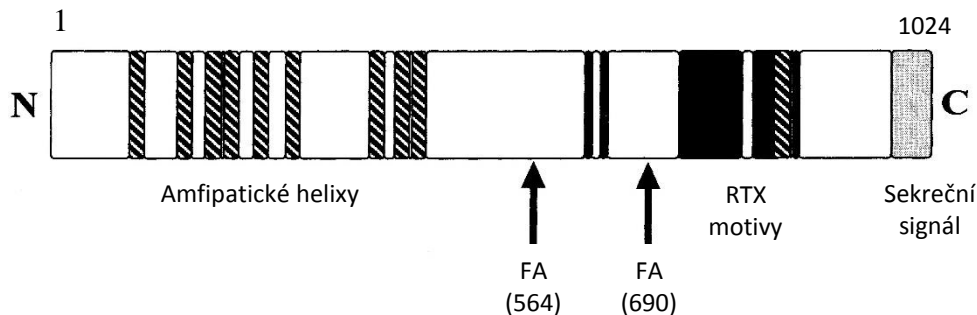
HlyA je sekretován pomocí C-koncové signální sekvence. Při sekreci nejprve dochází k rozpoznání signální sekvence na C-konci HlyA pomocí komplexu HlyB/HlyD, který je zanořen ve vnitřní cytoplasmatické membráně. Informace o vazbě proteinu se přeneše na TolC ve vnější membráně, dojde ke konformační změně a vytvoří se kanál přes obě membrány. Tím pak může projít nesbalený HlyA do vnějšího prostředí, kde dochází k jeho skládání. Po průchodu sekretovaného proteinu dochází k rozpadu kanálu. Energie nutná pro sekreci HlyA je dodávána hydrolýzou ATP, ale také protonovým gradientem na vnitřní membráně (Koronakis *et al.*, 1995, 1991, 1993; Stanley *et al.*, 1991).



Obr. 7: Model sekrečního systému typu I. T1SS rozpoznává C-koncovou signální sekvenci. Během sekrece periplasmatická MFP interaguje jak s ABC transportérem nacházejícím se ve vnitřní membráně, tak s proteinem vnější membrány (OMP). To vede k sekreci proteinu přes obě membrány (IM a OM) bez potřeby periplasmatického intermediátu (upraveno a převzato z Thanassi a Hultgren 2000).

### 5.1.2. Struktura proteinu

Přesná struktura HlyA není doposud známa, nicméně toxin se skládá z několika domén (obr. 8).



Obr. 8: Schématické znázornění primární struktury HlyA *E. coli*. RTX repetice jsou vyznačeny černě, amfipatické šroubovice pruhaně a C-koncový sekreční signál světle šedě. Dále jsou zaznačeny lysiny, kde dochází k posttranslační modifikaci (FA) (převzato a upraveno podle Soloaga *et al.* 1998).

Na N-konci HlyA se nachází hydrofobní doména, která je zodpovědná za tvorbu transmembránových pórů. Přesná struktura této domény není známa, ale je v ní navrženo osm transmembránových amfipatických  $\alpha$ -šroubovic. Podle starší literatury jsou zde pouze  $\alpha$ -šroubovice (Benz *et al.*, 1992), ale v nedávné době byl navržen i výskyt  $\beta$ -vláken (Benz *et al.*, 2014). Tato doména je velmi konzervovaná v toxinech RTX rodiny (Hyland *et al.*, 2001). Je důležitá pro inzerci toxinu do lipidové dvouvrstvy a následnou tvorbu membránových pórů (Hyland *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 1991). V centrálním segmentu se nacházejí dva lysinové zbytky K564 a K690 důležité pro aktivaci neaktivního proteinu (Hardie *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1994). Další doménou je RTX doména vyznačující se 11-13 RTX motivy. Doména je zodpovědná za vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  (Boehm *et al.*, 1990a, 1990b). V RTX doméně se také nachází vazebné místo (aminokyseliny 914-936) pro glykoforin, který může sloužit HlyA jako specifický receptor na červených krvinkách (Cortajarena *et al.*, 2001, 2003). Na C-konci se nachází 50-60 aminokyselin dlouhý sekreční signál. Tato sekvence ve vodném prostředí nezaujímá sekundární strukturu, ale v přítomnosti membrány se skládají dvě  $\alpha$ -šroubovice oddělené krátkým nestrukturovaným úsekem (Stanley *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 1995).

### 5.1.3. Pórotvorná a hemolytická aktivita HlyA

HlyA tvoří v membráně transmembránové póry o velikosti 1-3 nm, které jsou selektivní pro kationty (Benz *et al.*, 1989, 1994a; Bhakdi *et al.*, 1986). Póry vykazují určitou molekulární dynamiku na rozdíl od rigidní struktury póru  $\alpha$ -toxinu *S. aureus* (Benz *et al.*,

1989; Vécsey-Semjén *et al.*, 1999). HlyA je schopen tvořit póry nejen v různých biologických membránách, ale i v umělých lipidových systémech (Benz *et al.*, 1989; Menestrina, 1988). K hemolytické aktivitě je potřeba tvorba oligomerů. HlyA tvoří oligomery na černých lipidových membránách ale i při hemolýze červených krvinek (Benz *et al.*, 1989; Ludwig *et al.*, 1993). Existují ale i starší publikace, které tvrdí, že póry HlyA jsou tvořeny pouze monomery (Bhakdi *et al.*, 1986; Menestrina, 1988).

#### **5.1.4. Interakce HlyA s membránou**

Integrin CD11a/CD18 byl navržen jako receptor pro HlyA, ale bylo ukázáno, že k vazbě na membránu dochází i v jeho nepřítomnosti (Lally *et al.*, 1997; Valeva *et al.*, 2005). Jako specifický receptor pro HlyA může fungovat i glykoforin, protein vyskytující se hojně v membráně červených krvinek (Cortajarena *et al.*, 2001).

HlyA se preferenčně váže do lipidových raftů obsahujících cholesterol a sfingomyelin. Lipidové rafty fungují jako koncentrační místa toxinu (Herlax *et al.*, 2009). Přítomnost cholesterolu v membráně upřednostňuje inserci toxinu do membrány nebo také může umožňovat správné vytvoření oligomeru (Vazquez *et al.*, 2014). HlyA nepotřebuje aktivaci acylací ani vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  do RTX motivů, aby byl schopný vázat se na membránu lipozomového váčku. Pro vazbu na membránu je nezbytná hydrofobní doména toxinu. Na druhou stranu, pro vyvolání hemolytické aktivity toxinu je nutná jak acylace tak vazba  $\text{Ca}^{2+}$  do RTX motivů (Bakás *et al.*, 1998; Boehm *et al.*, 1990a, 1990b; Dobereiner *et al.*, 1996; Ostolaza *et al.*, 1995; Sánchez-Magraner *et al.*, 2006; Schindel *et al.*, 2001).

Model interakce toxinu s membránou byl navržen následovně. Po sekreci z buňky dochází k vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  do RTX domény vedoucí ke změně terciární struktury toxinu. Pokud není v prostředí přítomen vápník, nedochází k zaujmutí nativní konformace RTX domény. Přesto je toxin schopen vazby na membránu. Po vazbě následuje inserce hydrofobní domény do membrány a vytvoření transmembránového póru. To nakonec vyvolává lýzi buňky (Ostolaza a Goni, 1995).

#### **5.2. Adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis***

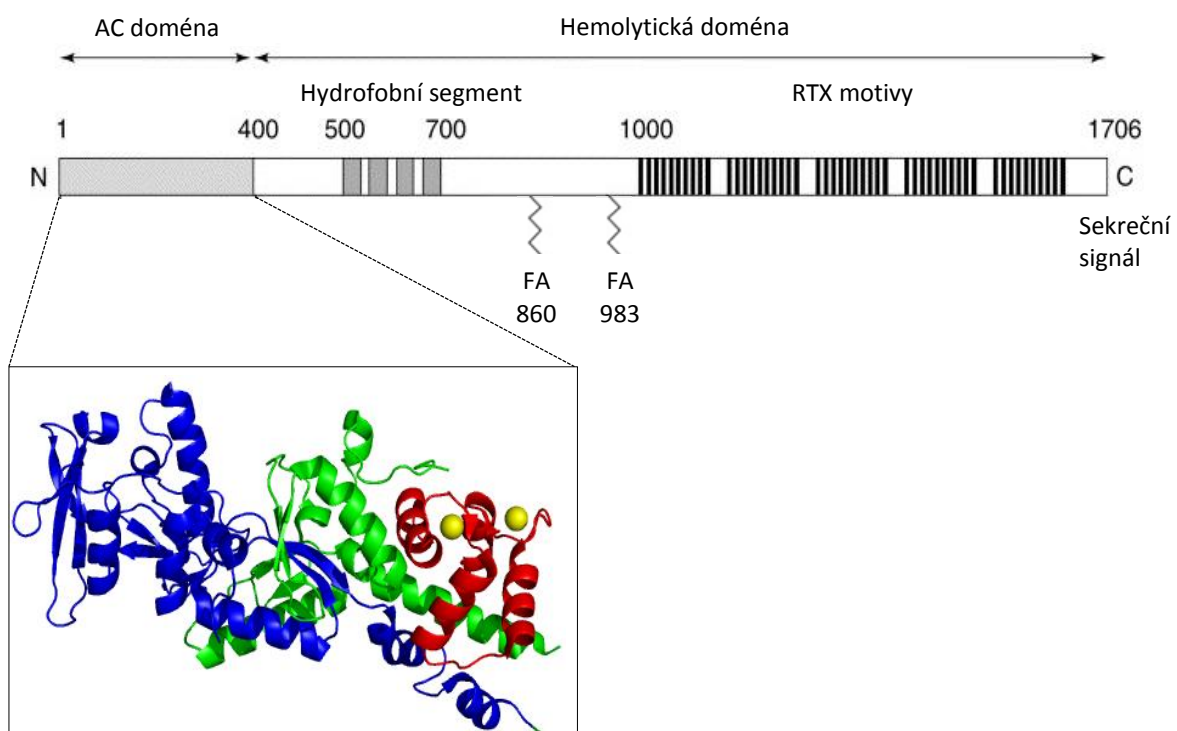
Adenylát cyklázový toxin (ACT, AC-Hly nebo CyaA) je produkován pathogenní bakterií *Bordetella pertussis* ale i bakteriemi *Bordetella bronchiseptica* a *Bordetella parapertussis* (Parkhill *et al.*, 2003). Patří do skupiny RTX toxinů. Molekula CyaA je tvořena 1706 aminokyselinovými zbytky a má molekulovou hmotnost 177 kDa. Krystalová struktura celého



proteinu zatím není známá. Jediná část, jejíž struktura je známa je N-koncová adenylát cyklázová (AC) doména (Guo *et al.*, 2005).

### 5.2.1. Struktura CyaA

V lokusu *cya* je kódováno pět genů (*cyaCABDE*) nutných pro produkci funkčního toxinu. Gen *cyaA* kóduje samotný toxin (Glaser *et al.*, 1988a, 1988b). Dále se v lokusu nacházejí tři geny *cyaB*, *cyaD* a *cyaE*, kódující proteiny nutné pro sekreci toxinu ven z buňky. CyaB a CyaD jsou homologní proteiny k HlyB a HlyD a vykazují i obdobnou funkci. HlyE není homologní k TolC, ale zastává jeho funkci při sekreci CyaA (Glaser *et al.* 1988a). Také se zde nachází gen *cyaC*, který je přepisován v opačném směru než ostatní geny v lokusu. Protein CyaC je acyltransferáza zodpovědná za posttranslační modifikace toxinu (Barry *et al.* 1991). CyaA je produkován v neaktivní formě jako proCyaA, kterou je potřeba aktivovat pomocí CyaC (Hackett *et al.*, 1995).



Obr. 9: Strukturní organizace adenylát cyklázového toxinu (CyaA). CyaA se skládá ze dvou domén – adenylát cyklázové (AC) domény a RTX hemolysinu. Ve struktuře jsou vyznačena místa posttranslační modifikace mastnou kyselinou (FA) (převzato a upraveno podle Ladant a Ullmann, 1999). AC doména se skládá ze dvou částí (T25 – modrá, T18 – zelená). Po translokaci přes membránu dochází k vazbě eukaryotického kalmodulinu na AC doménu. Na obrázku vlevo dole je vidět krystalová struktura AC domény společně s C-koncem kalmodulinu (vyznačen červeně). Žluté kuličky představují vápenaté kationty (převzato a upraveno podle Guo *et al.*, 2005).

Molekula CyaA se skládá ze dvou domén (obr. 9). Na N-konci se nachází adenylát cyklázová (AC) doména, která je tvořena přibližně 400 aminokyselinami. Zbylých 1306 aminokyselin tvoří tzv. RTX hemolysin, který je dále dělen na menší části.

AC doména je tvořena dvěma menšími částmi T25 a T18. T18 je zodpovědná za vazbu kalmodulinu (CaM) (Ladant, 1988), T25 obsahuje katalytické místo, kde dochází k přeměně ATP na cAMP. Obě tyto části jsou důležité pro vysokou enzymatickou aktivitu proteinu (Glaser *et al.*, 1989; Ladant *et al.*, 1989).

Hemolysinová doména je tvořena několika funkčními částmi. Mezi aminokyselinovými zbytky 500-700 se nachází hydrofobní segment umožňující tvorbu transmembránových pórů. V hydrofobním segmentu se nacházejí predikované amfipatické  $\alpha$ -šroubovice (502-522 a 565-591) podílející se na tvorbě póru (Basler *et al.*, 2007; Benz *et al.*, 1994b; Osičková *et al.*, 1999; Rogel a Hanski, 1992). V segmentu 800-1000 dochází k aktivaci proCyaA pomocí posttranslační modifikace mastnou kyselinou. Modifikovány jsou K860 a K983 (Hackett *et al.*, 1994, 1995). Segment 1000-1600 obsahuje okolo 40 RTX motivů. RTX motivy jsou v CyaA organizovány do 5 bloků po 8-10 motivech oddělených segmenty 20-30 aminokyselin. Tato organizace do bloků je mezi RTX proteiny unikátní. RTX motivy váží vápník, což vede ke konformační změně a zaujetí nativní konformace (Rose *et al.*, 1995). Touto konformací je pravděpodobně  $\beta$ -šroubovice, jak už bylo ukázáno na alkalické proteáze *P. aeruginosa* (Baumann *et al.*, 1993). Vazba vápníku do struktury toxinu je nutná pro translokaci AC domény přes membránu a hemolytickou aktivitu toxinu. V RTX segmentu se také nachází vazebné místo pro receptor CD11b/CD18 (segment 1166-1281) (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Vzájemná spolupráce všech částí hemolysinové domény je nutná pro inserci toxinu do membrány a následnou translokaci AC domény do cytosolu buňky (Bellalou *et al.*, 1990). Na úplném C-konci se nachází signální sekvence nutná pro sekreci toxinu pomocí sekrečního systému typu I (Šebo a Ladant, 1993).

### 5.2.2. Vazba na membránu

Dlouho dobu se předpokládalo, že CyaA nevyžaduje specifický receptor pro vazbu na membránu. Tato domněnka vycházela ze schopnosti CyaA intoxikovat široké spektrum buněk. Nicméně byl nalezen receptor, na který se CyaA specificky váže – integrin CD11b/CD18 (také známý jako  $\alpha_M\beta_2$ , CR3, Mac1) (Guermontprez *et al.*, 2001). CD11b/CD18 se nachází na makrofázích, neutrofilech a dendritických buňkách. Vazba na receptor je zcela závislá na vazbě vápníku do struktury proteinu (Guermontprez *et al.*, 2001). Za vazbu na receptor

zodpovídá segment 1166-1281, který se nachází v RTX doméně toxinu (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Pro vazbu toxinu na CD11b/CD18 je nutná modifikace receptoru cukerným zbytkem, tzv. N-glykosylace (Hasan *et al.*, 2015; Morova *et al.*, 2008) a acylace toxinu (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003).

### 5.2.3. Posttranslační aktivace CyaA

CyaA je postranslačně aktivován modifikací na  $\epsilon$ -amino skupině K860 a K983 mastnou kyselinou pomocí acyltransferázy CyaC. Nicméně bylo zjištěno, že některé kmeny *B. pertussis* produkují CyaA toxin s pouze jednou modifikací na K983. Podobný efekt byl pozorován i při expresi rekombinantního toxinu v *E. coli* (Hackett *et al.*, 1994, 1995). To vedlo k bližšímu zkoumání funkce posttranslačních modifikací na CyaA. Ukázalo se, že modifikace na K983 je nezbytná, ale také naprosto dostačující pro celkovou aktivitu CyaA na beraních červených krvinkách (Basar *et al.*, 2001). Pokud ale v toxinu není přítomna modifikace na K983, modifikace na K860 je dostačující pro vazbu na receptor a zajišťuje částečnou aktivitu toxinu v makrofázích (Masin *et al.*, 2005).

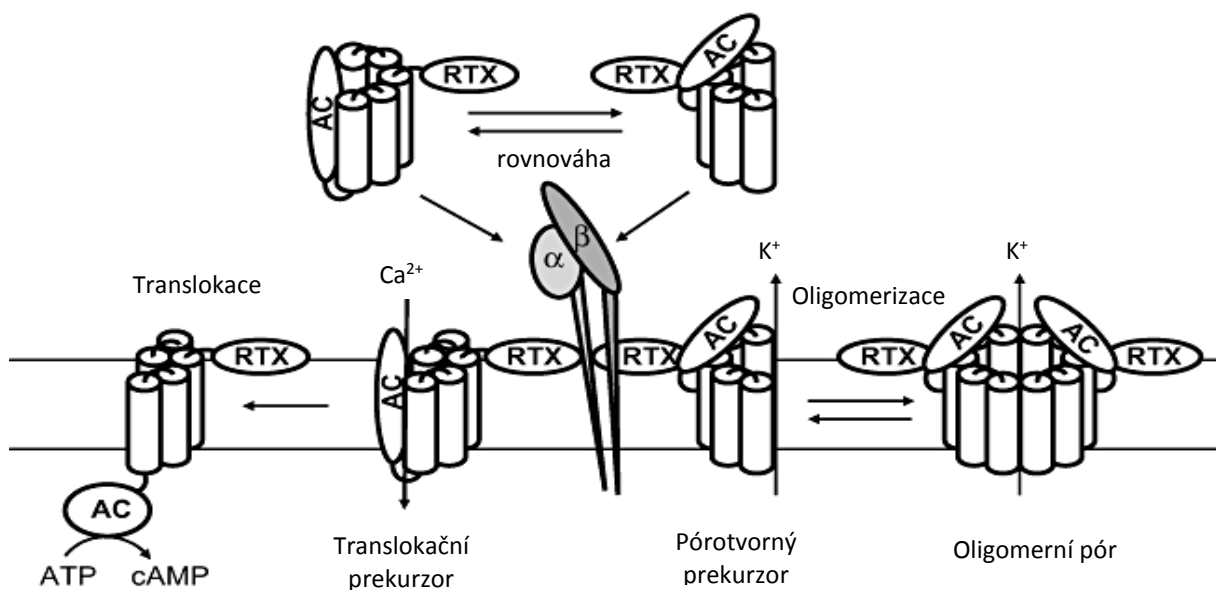
Při pokusech na liposomech bylo ukázáno, že modifikace není nezbytná pro interakci toxinu s čistou lipidovou membránou. Neaktivní toxin proCyaA dokonce vykazoval vyšší vazebnou a lytickou aktivitu na liposomech než aktivní CyaA (Mašín *et al.*, 2004).

### 5.2.4. Funkce CyaA

CyaA tvoří transmembránové póry selektivní pro kationty o velikosti 0,6 – 0,8 nm v průměru (Benz *et al.*, 1994a). Tyto póry jsou tedy příliš malé proto, aby jimi mohla být translokována AC doména, jak bylo v minulosti navrženo Hanskim a Rogelem (1992). Selektivita pórů pro kationty může být vysvětlena přítomností negativně nabitých aminokyselinových zbytků v predikovaných  $\alpha$ -šroubovicích hydrofobního segmentu (Basler *et al.*, 2007; Osičková *et al.*, 1999). Tvorba těchto pórů vede k narušení iontové rovnováhy napadených buněk a způsobuje koloidní lýzi buněk (Bellalou *et al.*, 1990).

CyaA je protein s dvojitou funkcí. Vykazuje jak enzymatickou aktivitu spojenou s AC doménou, tak má pórotvornou aktivitu vyvolávající lýzi buněk. Obě tyto aktivity fungují nezávisle na sobě. V dnešní době existuje model, který předpokládá výskyt dvou prekurzorových stavů lišících se svojí konformací a následnou funkcí (obr.10). Jsou jimi tzv. translokační konformer, který umožňuje translokaci AC domény do cytosolu hostitelské buňky a tzv. pórotvorný konformer, který po inserci do membrány tvoří oligomerní

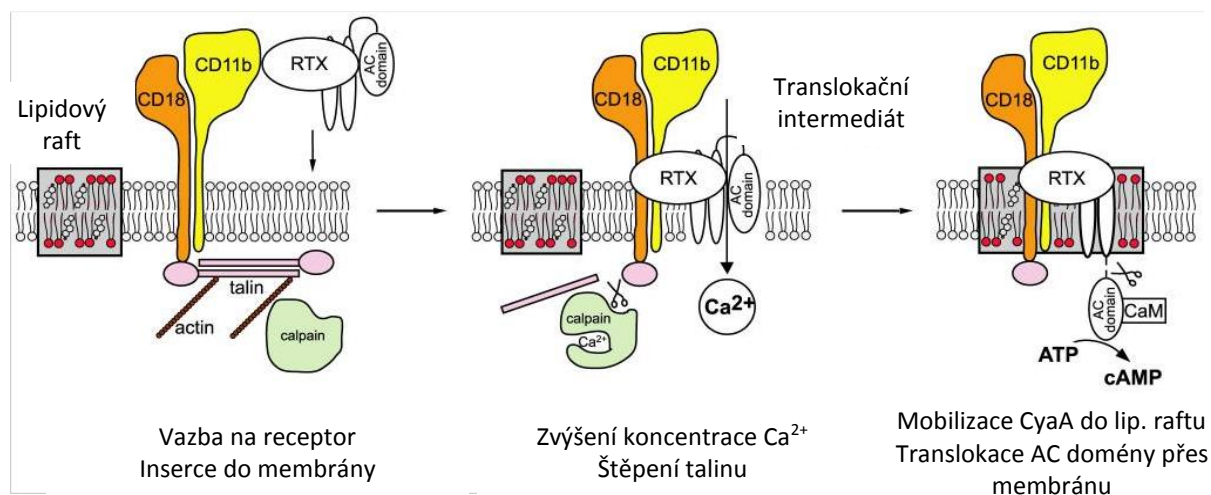
transmembránový pór, kterým unikají draselné ionty ven z buňky (Dunne *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 1998; Osickova *et al.*, 2010; Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009; Wald *et al.*, 2014). Tyto dvě konformace toxinu se vyskytují v rovnováze. Tu lze ale ovlivnit mutacemi v hydrofobní doméně toxinu, vazbou protilátky na AC doménu, přítomností membránového potenciálu nebo teplotou (Basler *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 1998, 2001; Osickova *et al.*, 2010; Osičková *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 1995; Veneziano *et al.*, 2013).



Obr. 10: Model nezávislého působení translokačního a pórotvorného prekurzoru a jejich interakce s membránou (převzato a upraveno podle Osickova *et al.*, 2010)

Bylo ukázáno, že při inzerci tzv. translokačního intermediátu dochází ke vzniku nového typu kanálu, kterým do cytosolu buňky proudí vápenaté ionty z extracelulárního prostředí. Nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu vede k aktivaci cysteinové proteázy kalpain, která štěpí protein talin, který kotví receptor CD11b/CD18 k cytoskeletu buňky (obr. 11). Tím dojde k uvolnění komplexu CyaA-CD11b/CD18 z vazby na cytoskelet. Následně se komplex stává mobilním a putuje do lipidových raftů bohatých na cholesterol. Zde konečně dochází k translokaci AC domény přes membránu do cytosolu buňky (Bumba *et al.*, 2010; Fiser *et al.*, 2007). Vstup vápenatých iontů v kombinaci s únikem draselných iontů vede dále ke zpomalení endocytózy toxinu a k vyšší permeabilizaci buňky působením toxinových pórů (Fiser *et al.*, 2012). Po translokaci AC domény do buňky dochází k vazbě kalmodulinu a k iniciaci přeměny ATP na cAMP (Glaser *et al.*, 1989; Ladant *et al.*, 1989). AC doména může být po translokaci odštěpena proteázou kalpain, což vede k jejímu uvolnění do cytosolu.

AC doména si po odštěpení zachovává enzymatickou aktivitu a může následně putovat do buněčných organel (Uribe *et al.*, 2013).



Obr.11: Model translokace CyaA přes membránu (převzato a opraveno podle Bumba *et al.*, 2010)

Souběžně s aktivitou translokačního prekurzoru se projevuje i aktivita pórtovorného prekurzoru. Po inserci do membrány dochází k oligomerizaci toxinu za vzniku malých transmembránových pórů. K tvorbě póru ale dochází pravděpodobně pouze v případě, že nedochází k translokaci AC domény (Osickova *et al.*, 2010; Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). Pomocí těchto pórů dochází k úniku draslíku z buňky. Pokles koncentrace vnitrobuněčného draslíku vede k vytvoření velkého proteinového komplexu zvaného NALP3 inflammasom, který následně aktivuje kaspázu 1. Aktivní kaspáza 1 katalyzuje štěpení pro-IL-1 $\beta$  na jeho aktivní formu, který je dále uvolňován z buňky. Aktivní IL-1 $\beta$  hraje důležitou roli při infekci a zánětu (Dinarello, 2009; Dunne *et al.*, 2010). Aktivní kaspáza 1 také vyvolává programovanou buněčnou smrt, tzv. pyroptózu. Pyroptóza je úzce spjata se zánětlivou reakcí (Fink a Cookson, 2005).

## 6. Závěr

Pórotvorné toxiny svojí aktivitou narušují celistvost membrány, což vede k poškození buněčné homeostáze. Výsledným efektem působení toxinů je buněčná smrt napadené buňky. Ta nastává při použití vysokých koncentrací toxinů. Nicméně při infekci nejsou toxiny produkovány v dostatečné koncentraci, aby vyvolali okamžitou buněčnou smrt. Při nižších koncentracích toxinů může docházet k programované buněčné smrti např. apoptózou nebo pyroptózou. Napadené buňky jsou ale schopny se nízkým hladinám toxinů bránit. Dochází u nich ke změně metabolismu, zastavení růstu a k aktivaci autofágie (Bischofberger *et al.*, 2012)

Pokles koncentrace draslíku uvnitř buňky způsobený pórotvornou aktivitou toxinů vede k zastavení anabolické aktivity buňky vedoucí k zastavení translace proteinů. Společně se zastavením translace dochází i k vytváření zásobních látek v podobě lipidových kapének (Gonzalez *et al.*, 2011). Pokles vnitrobuněčné koncentrace draslík dále vede k aktivaci inflamazomu, velkého komplexu který aktivuje kaspázu 1 (Dunne *et al.*, 2010; Gurcel *et al.*, 2006; Walev *et al.*, 1995). Ta následně může aktivovat interleukiny IL-1 $\beta$  a IL-18, které se podílejí na programované buněčné smrti (Soong *et al.*, 2012). Také aktivace kaspázy 2 je způsobna únikem draslíku z buňky (Imre *et al.*, 2012). Dále pórotvorné toxiny způsobují aktivaci tří MAP kináz – p38, JNK a ERK. Pokusy s aerolysinem a  $\alpha$ -toxinem naznačují, že MAP kinázy se podílejí na obnově celistvosti membrány (Gonzalez *et al.*, 2011; Huffman *et al.*, 2004; Kloft *et al.*, 2009; Porta *et al.*, 2011).

Se stoupající znalostí mechanismů působení jednotlivých toxinů se toxiny mohou využívat i v medicíně a biotechnologiích. Například vakcíny založené na bázi inaktivovaných bakteriálních toxinů jsou běžně používané pro léčení a prevenci bakteriálních onemocnění (Gurnev a Nestorovich, 2014; Hu *et al.*, 2013; Sebo *et al.*, 2014). Využití geneticky modifikovaného CyaA jako nástroje pro dopravu cizorodých antigenů do buněk vystavujících na svém povrchu cizorodé antigeny je ve druhém kole klinických testů na pacientech trpících kožními melanomy a pacientkách trpících karcinomem děložního čípku. Využívá se schopnosti CyaA toxoidu přenést modifikovanou AC doménu s antigenním peptidem do cytoplasmy buněk, které na svém povrchu dokáží vystavovat cizorodé antigeny. Po přenosu antigenu do cytosolu dochází k jeho štěpení pomocí proteazomu. Antigenní peptidy jsou poté transportovány do endoplasmatického retikula. Následně dochází k jejich navázání na molekuly MHC glykoproteinů třídy I a vystavení na buněčném povrchu. Proti těmto

cizorodým antigenům je pak vedena odpověď cytotoxických T-lymfocytů (tzv. CD8+ T lymfocytů) (Linhartová *et al.*, 2010; Sebo *et al.*, 2014).

Dalším významným využitím bakteriálního toxinu tvořícího póry je použití  $\alpha$ -toxinu bakterie *S. aureus* pro sekvenaci nukleových kyselin. Jak už bylo řečeno, toxin tvoří velmi stabilní póry, které jsou lehce selektivní pro anioty. Díky tomu je lze využívat pro průchod DNA i RNA. Při tzv. sekvenování pomocí nanopórů dochází k protahování jednoho vlákna nukleové kyseliny pórem zatímco je zaznamenáván elektrický proud procházející pórem ve stejnou dobu. Ze záznamu o procházejícím elektrickém proudu se tedy dá odvodit sekvence procházejících nukleotidů, neboť každý typ nukleotidu ovlivňuje průchod elektrického proudu jiným způsobem. Sekvenování pomocí nanopórů má v dnešní době ještě problémy, které je potřeba vyřešit. Nicméně jejich vyřešením se získá dostupná a levná metoda sekvenování nukleových kyselin (Bayley, 2006; Kasianowicz *et al.*, 1996; Maglia *et al.*, 2010).

## 7. Seznam literatury:

Přehledové články jsou označeny \*

Abrami, L., a van der Goot, F.G. (1999). Plasma Membrane Microdomains Act as Concentration Platforms to Facilitate Intoxication by Aerolysin. *J. Cell Biol.* 147, 175–184.

Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.-E., Parton, R.G., a van der Goot, F.G. (1998a). A Pore-forming Toxin Interacts with a GPI-anchored Protein and Causes Vacuolation of the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.* 140, 525–540.

Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J., a van der Goot, F.G. (1998b). The Pore-forming Toxin Proaerolysin Is Activated by Furin. *J. Biol. Chem.* 273, 32656–32661.

Abrami, L., Velluz, M.-C., Hong, Y., Ohishi, K., Mehlert, A., Ferguson, M., Kinoshita, T., a van der Goot, F.G. (2002). The glycan core of GPI-anchored proteins modulates aerolysin binding but is not sufficient: the polypeptide moiety is required for the toxin–receptor interaction. *FEBS Lett.* 512, 249–254.

Bakás, L., Veiga, M.P., Soloaga, A., Ostolaza, H., a Goñi, F.M. (1998). Calcium-dependent conformation of *E. coli*  $\alpha$ -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 225–234.

Balachandran, P., Hollingshead, S.K., Paton, J.C., a Briles, D.E. (2001). The Autolytic Enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin. *J. Bacteriol.* 183, 3108–3116.

Barry, R., Moore, S., Alonso, A., Ausio, J., a Buckley, J.T. (2001). The Channel-forming Protein Proaerolysin Remains a Dimer at Low Concentrations in Solution. *J. Biol. Chem.* 276, 551–554.

Basar, T., Havlíček, V., Bezousková, S., Hackett, M., a Sebo, P. (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. *J. Biol. Chem.* 276, 348–354.

Bashford, C.L., Alder, G.M., Fulford, L.G., Korchev, Y.E., Kovacs, E., MacKinnon, A., Pederzoli, C., a Pasternak, C.A. (1996). Pore Formation by *S. aureus*  $\alpha$ -toxin in Liposomes and Planar Lipid Bilayers: Effects of Nonelectrolytes. *J. Membr. Biol.* 150, 37–45.

Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P., a Osicka, R. (2007). Segments Crucial for Membrane Translocation and Pore-forming Activity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 12419–12429.

Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., a McKay, D.B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12, 3357–3364.

Bayley, H. (2006). Sequencing single molecules of DNA. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 628–637.

Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., a Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect. Immun.* 58, 3242–3247.



- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W., a Goebel, W. (1989). Pore Formation by the Escherichia coli Hemolysin: Evidence for an Association-Dissociation Equilibrium of the Pore-Forming Aggregates. *Infect. Immun.* 57, 887–895.
- Benz, R., Döbereiner, A., Ludwig, A., a Goebel, W. (1992). Haemolysin of Escherichia coli: Comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol. Immunology* 105, 55–62.
- Benz, R., Hardie, K.R., a Hughes, C. (1994a). Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Eur. J. Biochem.* 220, 339–347.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., a Sebo, P. (1994b). Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 27231–27239.
- Benz, R., Maier, E., Bauer, S., a Ludwig, A. (2014). The Deletion of Several Amino Acid Stretches of *Escherichia coli* Alpha- Hemolysin ( HlyA ) Suggests That the Channel-Forming Domain Contains. *PLoS One* 9, 1–26.
- Bernheimer, A.W. (1974). Interactions between membranes and cytolytic bacterial toxins. *Biochim. Biophys. Acta* 344, 27–50.
- Bezrukov, S.M., a Kasianowicz, J.J. (1993). Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* 70, 2352–2355.
- Bhakdi, S., a Trantum-Jensen, J. (1991). Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55, 733–751.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.-M., a Holland, I.B. (1986). *Escherichia coli* Hemolysin May Damage Target Cell Membranes by Generating Transmembrane Pores. *Infect. Immun.* 52, 63–69.
- Bischofberger, M., Iacovache, I., a van der Goot, F.G. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe* 12, 266–275.
- Boehm, D.F., Welch, R.A., a Snyder, I.S. (1990a). Domains of *Escherichia coli* Hemolysin (HlyA) Involved in Binding of Calcium and Erythrocyte Membranes. *Infect. Immun.* 58, 1959–1964.
- Boehm, D.F., Welch, R.A., a Snyder, I.S. (1990b). Calcium Is Required for Binding of *Escherichia coli* Hemolysin (HlyA) to Erythrocyte Membranes. *Infect. Immun.* 58, 1951–1958.
- Buckingham, L., a Duncan, J.L. (1983). Approximate dimensions of membrane lesions produced by streptolysin S and streptolysin O. *Biochim. Biophys. Acta* 729, 115–122.
- Buckley, J.T., Wilmsen, U., Lesieur, C., Schulze, A., Pattus, F., Parker, M.W., a van der Goot, F.G. (1995). Protonation of Histidine-132 Promotes Oligomerization of the Channel-Forming Toxin Aerolysin. *Biochemistry* 34, 16450–16455.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., a Sebo, P. (2010). *Bordetella* adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog.* 6, e1000901.

- Cabiaux, V., Buckley, J.T., Wattiez, R., Ruyschaert, J.M., Parker, M.W., a van der Goot, F.G. (1997). Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry* 36, 15224–15232.
- Cescatti, L., Pederzoli, C., a Menestrina, G. (1991). Modification of lysine residues of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: Effects on its channel-forming properties. *J. Membr. Biol.* 119, 53–64.
- Comai, M., Serra, M.D., Coraiola, M., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., Prévost, G., a Menestrina, G. (2002). Protein engineering modulates the transport properties and ion selectivity of the pores formed by staphylococcal  $\gamma$ -haemolysins in lipid membranes. *Mol. Microbiol.* 44, 1251–1267.
- Cortajarena, A.L., Goñi, F.M., a Ostolaza, H. (2001). Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 12513–12519.
- Cortajarena, A.L., Goni, F.M., a Ostolaza, H. (2003). A receptor-binding region in *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *J. Biol. Chem.* 278, 19159–19163.
- Cowell, J.L., a Bernheimer, A.W. (1977). Antigenic Relationships Among thiol-Activated cytolysins. *Infect. Immun.* 16, 397–399.
- Cowell, S., Aschauer, W., Gruber, H.J., Nelson, K.L., a Buckley, J.T. (1997). The erythrocyte receptor for the channel-forming toxin aerolysin is a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Microbiol.* 25, 343–350.
- Czajkowsky, D.M., Hotze, E.M., Shao, Z., a Tweten, R.K. (2004). Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *EMBO J.* 23, 3206–3215.
- Degiacomi, M.T., Iacovache, I., Pernot, L., Chami, M., Kudryashev, M., Stahlberg, H., van der Goot, F.G., a Dal Peraro, M. (2013). Molecular assembly of the aerolysin pore reveals a swirling membrane-insertion mechanism. *Nat. Chem. Biol.* 9, 623–629.
- Diep, D.B., Lawrence, T.S., Ausio, J., Howard, S.P., a Buckley, J.T. (1998a). Secretion and properties of the large and small lobes of the channel-forming toxin aerolysin. *Mol. Microbiol.* 30, 341–352.
- Diep, D.B., Nelson, K.L., Raja, S.M., Pleshak, E.N., a Buckley, J.T. (1998b). Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Membrane Glycoproteins Are Binding Determinants for the Channel-forming Toxin Aerolysin. *J. Biol. Chem.* 273, 2355–2360.
- Dinareello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519–550.
- Dobereiner, A., Schmid, A., Ludwig, A., Goebel, W., a Benz, R. (1996). The Effects of Calcium and Other Polyvalent Cations on Channel Formation by *Escherichia coli* alpha-Hemolysin in Red Blood Cells and Lipid Bilayer Membranes. *Eur. J. Biochem.* 240, 454–460.
- Duncan, J.L., a Schlegel, R. (1975). Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J. Cell Biol.* 67, 160–174.
- Dunne, A., Ross, P.J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C.E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P., a Mills, K.H.G. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* 185, 1711–1719.

- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., a Leclerc, C. (2003). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278, 38514–38521.
- Farrand, A.J., LaChapelle, S., Hotze, E.M., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (2010). Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4341–4346.
- Feil, S.C., Rossjohn, J., Rohde, K., Tweten, R.K., a Parker, M.W. (1996). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a thiol-activated cytolysin. *FEBS Lett.* 397, 290–292.
- Fink, S.L., a Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916.
- Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spuláková, V., Konopásek, I., a Sebo, P. (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. *J. Biol. Chem.* 282, 2808–2820.
- Fiser, R., Masin, J., Bumba, L., Pospisilova, E., Fayolle, C., Basler, M., Sadilkova, L., Adkins, I., Kamanova, J., Cerny, J., et al. (2012). Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. *PLoS Pathog.* 8, e1002580.
- Fivaz, M., Velluz, M.-C., a van der Goot, F.G. (1999). Dimer Dissociation of the Pore-forming Toxin Aerolysin Precedes Receptor Binding. *J. Biol. Chem.* 274, 37705–37708.
- Fivaz, M., Abrami, L., Tsitrin, Y., a van der Goot, F.G. (2001). Aerolysin from *Aeromonas hydrophila* and related toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257, 35–52.
- Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Traunum-Jensen, J., Kranz, T., a Wellensiek, H.-J. (1981). On the Mechanism of Membrane Damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J. Cell Biol.* 91, 83–94.
- Garland, W.J., a Buckley, J.T. (1988). The Cytolytic Toxin Aerolysin Must Aggregate To Disrupt Erythrocytes, and Aggregation Is Stimulated by Human Glycophorin. *Infect. Immun.* 56, 1249–1253.
- Gentschev, I., a Goebel, W. (1992). Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 232, 40–48.
- Giddings, K.S., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (2003). Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11315–11320.
- Giddings, K.S., Zhao, J., Sims, P.J., a Tweten, R.K. (2004). Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1173–1178.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., a Danchin, A. (1988a). The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2, 19–30.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., a Danchin, A. (1988b). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 7, 3997–4004.

- Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Bârzu, O., a Danchin, A. (1989). Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* *8*, 967–972.
- Goebel, W., Royer-Pokora, B., Lindenmaier, W., a Bujard, H. (1974). Plasmids Controlling Synthesis of Hemolysin in *Escherichia coli*: Molecular Properties. *J. Bacteriol.* *118*, 964–973.
- Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G., a van der Goot, F.G. (2011). Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell. Microbiol.* *13*, 1026–1043.
- Van der Goot, F.G., Ausio, J., Wong, K.R., Pattus, F., a Buckley, J.T. (1993). Dimerization Stabilizes the Pore-forming Toxin Aerolysin in Solution. *J. Biol. Chem.* *268*, 18272–18279.
- Van der Goot, F.G., Pattus, F., Wong, K.R., a Buckley, J.T. (1993). Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. *Biochemistry* *32*, 2636–2642.
- Gray, G.S., a Kehoe, M.A. (1984). Primary Sequence of the alpha-toxin Gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. *Infect. Immun.* *46*, 615–618.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L., a Hewlett, E. (1998). Distinct Mechanisms for K<sup>+</sup> Efflux, Intoxication, and Hemolysis by *Bordetella pertussis* AC Toxin. *J. Biol. Chem.* *273*, 18260–18267.
- Gray, M.C., Lee, S.J., Gray, L.S., Zaretsky, F.R., Otero, a S., Szabo, G., a Hewlett, E.L. (2001). Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J. Bacteriol.* *183*, 5904–5910.
- Green, M.J., a Buckley, J.T. (1990). Site-directed mutagenesis of the hole-forming toxin aerolysin: studies on the roles of histidines in receptor binding and oligomerization of the monomer. *Biochemistry* *29*, 2177–2180.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., a Leclerc, C. (2001). The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the M<sub>2</sub> Integrin (Cd11b/Cd18). *J. Exp. Med.* *193*, 1035–1044.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., a Tang, W.-J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* *24*, 3190–3201.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., a van der Goot, F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* *126*, 1135–1145.
- Gurnev, P.A., a Nestorovich, E.M. (2014). Channel-forming bacterial toxins in biosensing and macromolecule delivery. *Toxins (Basel)*. *6*, 2483–2540.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D., a Hewlett, E. (1994). Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science (80- )*. *266*, 433–435.
- Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., a Sebo, P. (1995). Hemolytic, but Not Cell-invasive Activity, of Adenylate Cyclase Toxin Is Selectively Affected by Differential Fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *270*, 20250–20253.

- Hardie, K.R., Issartel, J.-P., Koronakis, E., Hughes, C., a Koronakis, V. (1991). In vitro activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol. Microbiol.* 5, 1669–1679.
- Harris, J., Adrian, M., Bhakdi, S., a Palmer, M. (1998). Cholesterol-Streptolysin O Interaction: An EM Study of Wild-Type and Mutant Streptolysin O. *J. Struct. Biol.* 121, 343–355.
- Hasan, S., Osickova, A., Bumba, L., Novák, P., Sebo, P., a Osicka, R. (2015). Interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin with complement receptor 3 involves multivalent glycan binding. *FEBS Lett.* 589, 374–379.
- Herlax, V., Maté, S., Rimoldi, O., a Bakás, L. (2009). Relevance of fatty acid covalently bound to Escherichia coli alpha-hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process. *J. Biol. Chem.* 284, 25199–25210.
- Heuck, A.P., Hotze, E.M., Tweten, R.K., a Johnson, A.E. (2000). Mechanism of Membrane Insertion of a Multimeric  $\beta$ -Barrel Protein: Perfringolysin O Creates a Pore Using Ordered and Cupled Conformational Changes. *Mol. Cell* 6, 1233–1242.
- Hildebrand, A., Pohl, M., a Bhakdi, S. (1991). Staphylococcus aureus alpha-toxin: Dual Mechanism of Binding to Target Cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17195–17200.
- Hong, Y., Ohishi, K., Inoue, N., Kang, J.Y., Shime, H., Horiguchi, Y., van der Goot, F.G., Sugimoto, N., a Kinoshita, T. (2002). Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not Clostridium septicum  $\alpha$ -toxin. *EMBO J.* 21, 5047–5056.
- Hotze, E.M., Wilson-Kubalek, E.M., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (2001). Arresting pore formation of a cholesterol-dependent cytolysin by disulfide trapping synchronizes the insertion of the transmembrane beta-sheet from a prepore intermediate. *J. Biol. Chem.* 276, 8261–8268.
- Hotze, E.M., Wilson-Kubalek, E., Farrand, A.J., Bentsen, L., Parker, M.W., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (2012). Monomer-monomer interactions propagate structural transitions necessary for pore formation by the cholesterol-dependent cytolysins. *J. Biol. Chem.* 287, 24534–24543.
- Hotze, E.M., Le, H.M., Sieber, J.R., Bruxvoort, C., McInerney, M.J., a Tweten, R.K. (2013). Identification and characterization of the first cholesterol-dependent cytolysins from Gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 81, 216–225.
- Howard, S.P., a Buckley, J.T. (1982). Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry* 21, 1662–1667.
- Howard, S.P., a Buckley, J.T. (1985a). Protein Export by a Gram-negative Bacterium: Production of Aerolysin by Aeromonas hydrophila. *J. Bacteriol.* 161, 1118–1124.
- Howard, S.P., a Buckley, J.T. (1985b). Activation of the Hole-Forming Toxin Aerolysin by Extracellular Processing. *J. Bacteriol.* 163, 336–340.
- Howard, J.G., Wallace, K.R., a Wright, G.P. (1953). The inhibitory effects of cholesterol and related sterols on haemolysis by streptolysin O. *Br. J. Exp. Pathol.* 34, 174–180.
- Howard, S.P., Garland, W.J., Green, M.J., a Buckley, J.T. (1987). Nucleotide Sequence of the Gene for the Hole-Forming Toxin Aerolysin of Aeromonas hydrophila. *J. Bacteriol.* 169, 2869–2871.

- Hu, C.-M.J., Fang, R.H., Luk, B.T., a Zhang, L. (2013). Nanoparticle-detained toxins for safe and effective vaccination. *Nat. Nanotechnol.* 8, 933–938.
- Huffman, D.L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F.G., a Aroian, R. V (2004). Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10995–11000.
- Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C., a Koronakis, V. (2001). Membrane Interaction of Escherichia coli Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles. *J. Bacteriol.* 183, 5364–5370.
- Iacovache, I., Degiacomi, M.T., Pernot, L., Ho, S., Schiltz, M., Dal Peraro, M., a van der Goot, F.G. (2011). Dual chaperone role of the C-terminal propeptide in folding and oligomerization of the pore-forming toxin aerolysin. *PLoS Pathog.* 7, e1002135.
- Imre, G., Heering, J., Takeda, A.-N., Husmann, M., Thiede, B., zu Heringdorf, D.M., Green, D.R., van der Goot, F.G., Sinha, B., Dötsch, V., et al. (2012). Caspase-2 is an initiator caspase responsible for pore-forming toxin-mediated apoptosis. *EMBO J.* 31, 2615–2628.
- Issartel, J.P., Koronakis, V., a Hughes, C. (1991). Activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 351, 759–761.
- Jonas, D., Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M., a Bhakdi, S. (1994). Novel Path to Apoptosis: Small Transmembrane Pores Created by Staphylococcal Alpha-Toxin in T Lymphocytes Evoke Internucleosomal DNA Degradation. *Infect. Immun.* 62, 1304–1312.
- Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., a Deamer, D.W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13770–13773.
- Kehoe, M.A., Miller, L., Walker, J.A., a Boulnois, G.J. (1987). Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infect. Immun.* 55, 3228–3232.
- Kloft, N., Busch, T., Neukirch, C., Weis, S., Boukhallouk, F., Bobkiewicz, W., Cibis, I., Bhakdi, S., a Husmann, M. (2009). Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 503–506.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I., a Koronakis, V. (1995). Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol. Microbiol.* 16, 87–96.
- Koronakis, V., Hughes, C., a Koronakis, E. (1991). Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both Escherichia coli membranes. *EMBO J.* 10, 3263–3272.
- Koronakis, V., Hughes, C., a Koronakis, E. (1993). ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol. Microbiol.* 8, 1163–1175.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., a Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
- Krause, K.-H., Fivaz, M., Monod, A., a van der Goot, F.G. (1998). Aerolysin Induces G-protein Activation and Ca<sup>2+</sup> Release from Intracellular Stores in Human Granulocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 18122–18129.

- Ladant, D. (1988). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J. Biol. Chem.* *263*, 2612–2618.
- Ladant, D., a Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* *7*, 172–176.
- Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A.M., Predeleanu, R., a Barzu, O. (1989). Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* *264*, 4015–4020.
- Lally, E.T., Kieba, I.R., Sato, A., Green, C.L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J.F., Shenker, B.J., Ortlepp, S., Robinson, M.K., et al. (1997). RTX Toxins Recognize a beta2 Integrin on the Surface of Human Target Cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 30463–30469.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., a Korostoff, J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* *7*, 356–361.
- Lesieur, C., Frutiger, S., Hughes, G., Kellner, R., Pattus, F., a van der Goot, F.G. (1999). Increased Stability upon Heptamerization of the Pore-forming Toxin Aerolysin. *J. Biol. Chem.* *274*, 36722–36728.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., HejnováHolubová, J., Sadílková, L., et al. (2010). RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* *34*, 1076–1112.
- Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R., a Goebel, W. (1991). Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *MGG Mol. Gen. Genet.* *226-226*, 198–208.
- Ludwig, A., Benz, R., a Goebel, W. (1993). Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *MGG Mol. Gen. Genet.* *241-241*, 89–96.
- MacKenzie, C.R., Hiram, T., a Buckley, J.T. (1999). Analysis of Receptor Binding by the Channel-forming Toxin Aerolysin Using Surface Plasmon Resonance. *J. Biol. Chem.* *274*, 22604–22609.
- Maglia, G., Heron, A.J., Stoddart, D., Japrun, D., a Bayley, H. (2010). Analysis of single nucleic acid molecules with protein nanopores. *Methods Enzymol.* *475*, 591–623.
- Masín, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopásek, I., Benz, R., Leclerc, C., a Sebo, P. (2005). Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* *44*, 12759–12766.
- Mašín, J., Konopásek, I., Svobodová, J., a Šebo, P. (2004). Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1660*, 144–154.
- Menestrina, G. (1988). *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.* *232*, 217–220.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., a Cossart, P. (1988). Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* *56*, 766–772.

- Menzies, B.E., a Kourteva, I. (2000). Staphylococcus aureus alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29, 39–45.
- Moniatte, M., van der Goot, F.G., Buckley, J.T., Pattus, F., a van Dorsselaer, A. (1996). Characterisation of the heptameric pore-forming complex of the Aeromonas toxin aerolysin using MALDI-TOF mass spectrometry. *FEBS Lett.* 384, 269–272.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., a Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5355–5360.
- Noegel, A., Rdest, U., Springer, W., a Goebel, W. (1979). Plasmid cistrons controlling synthesis and excretion of the exotoxin alpha-haemolysin of Escherichia coli. *Mol. Gen. Genet.* 175, 343–350.
- Noegel, A., Rdest, U., a Goebel, W. (1981). Determination of the Function of Hemolytic Plasmid pHly152 of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 145, 233–247.
- Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R., a Sebo, P. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol. Microbiol.* 75, 1550–1562.
- Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R., a Šebo, P. (1999). An amphipathic  $\alpha$ -helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J. Biol. Chem.* 274, 37644–37650.
- Ostolaza, H., a Goni, F.M. (1995). Interaction of the bacterial protein toxin  $\alpha$ -haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. *FEBS Lett.* 371, 303–306.
- Ostolaza, H., Soloaga, A., a Goni, F.M. (1995). The Binding of Divalent Cations to Escherichia coli alpha-Haemolysin. *Eur. J. Biochem.* 228, 39–44.
- Otero, A.S., Xiao, Y.B., Gray, M.C., Szabo, G., a Hewlett, E.L. (1995). Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* 270, 9695–9697.
- Palmer, M. (2004). Cholesterol and the activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 281–289.
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., a Tsernoglou, D. (1994). Structure of the Aeromonas toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367, 292–295.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., et al. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nat. Genet.* 35, 32–40.
- Paula, S., Akeson, M., a Deamer, D. (1999). Water transport by the bacterial channel  $\alpha$ -hemolysin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1418, 117–126.
- Pimenta, A., Young, J., Holland, I., a Blight, M. (1999). Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the E. coli haemolysin translocator. *Mol. Gen. Genet.* 261, 122–132.



- Porta, H., Cancino-Rodezno, A., Soberón, M., a Bravo, A. (2011). Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* 32, 601–606.
- Prévost, G., Mourey, L., Colin, D.A., a Menestrina, G. (2001). Staphylococcal pore-forming toxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257, 53–83.
- Price, K.E., a Camilli, A. (2009). Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 191, 2163–2168.
- Price, K.E., Greene, N.G., a Camilli, A. (2012). Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 194, 3651–3660.
- Prigent, D., a Alouf, J.E. (1976). Interaction of streptolysin O with sterols. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 443, 288–300.
- Ramachandran, R., Heuck, A.P., Tweten, R.K., a Johnson, A.E. (2002). Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat. Struct. Biol.* 9, 823–827.
- Ramachandran, R., Tweten, R.K., a Johnson, A.E. (2004). Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 697–705.
- Ramachandran, R., Tweten, R.K., a Johnson, A.E. (2005). The domains of a cholesterol-dependent cytolysin undergo a major FRET-detected rearrangement during pore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7139–7144.
- Reboul, C.F., Whisstock, J.C., a Dunstone, M.A. (2014). A new model for pore formation by cholesterol-dependent cytolysins. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003791.
- Rogel, A., a 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.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., a Ladant, D. (1995). Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin: Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270, 26370–26376.
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K., a Parker, M.W. (1997). Structure of a Cholesterol-Binding, Thiol-Activated Cytolysin and a Model of Its Membrane Form. *Cell* 89, 685–692.
- Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S.C., Morton, C.J., Tweten, R.K., a Parker, M.W. (2007). Structures of perfringolysin O suggest a pathway for activation of cholesterol-dependent cytolysins. *J. Mol. Biol.* 367, 1227–1236.
- Sanchez-Magraner, L., Viguera, A.R., Garcia-Pacios, M., Garcillan, M.P., Arrondo, J.-L.R., de la Cruz, F., Goni, F.M., a Ostolaza, H. (2007). The Calcium-binding C-terminal Domain of *Escherichia coli* -Hemolysin Is a Major Determinant in the Surface-active Properties of the Protein. *J. Biol. Chem.* 282, 11827–11835.
- Sánchez-Magraner, L., Cortajarena, A.L., Goñi, F.M., a Ostolaza, H. (2006). Membrane insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is independent from membrane lysis. *J. Biol. Chem.* 281, 5461–5467.

- Sánchez-Magraner, L., Cortajarena, A.L., García-Pacios, M., Arrondo, J.-L.R., Agirre, J., Guérin, D.M.A., Goñi, F.M., a Ostolaza, H. (2010). Interdomain Ca(2+) effects in Escherichia coli alpha-haemolysin: Ca(2+) binding to the C-terminal domain stabilizes both C- and N-terminal domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1225–1233.
- Sebo, P., Osicka, R., a Masin, J. (2014). Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 13, 1215–1227.
- Shatursky, O., Heuck, A.P., Shepard, L.A., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (1999). The Mechanism of Membrane Insertion for a Cholesterol-Dependent Cytolysin. *Cell* 99, 293–299.
- Shepard, L.A., Heuck, A.P., Hamman, B.D., Rossjohn, J., Parker, M.W., Ryan, K.R., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (1998). Identification of a Membrane-Spanning Domain of the Thiol-Activated Pore-Forming Toxin Clostridium perfringens Perfringolysin O: An  $\alpha$ -Helical to  $\beta$ -Sheet Transition Identified by Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* 37, 14563–14574.
- Schindel, C., Zitzer, A., Schulte, B., Gerhards, A., Stanley, P., Hughes, C., Koronakis, V., Bhakdi, S., a Palmer, M. (2001). Interaction of Escherichia coli hemolysin with biological membranes. *Eur. J. Biochem.* 268, 800–808.
- Schulein, R., Gentschev, I., Schlor, S., Gross, R., a Goebel, W. (1994). Identification and characterization of 2 functional domains of the hemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* 245, 203–211.
- Soloaga, A., Ramírez, J.M., a Goñi, F.M. (1998). Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of Escherichia coli alpha-hemolysin, a protein stable in 6 M urea. *Biochemistry* 37, 6387–6393.
- Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., a Tweten, R.K. (2007). Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20226–20231.
- Song, L., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., a Gouaux, J.E. (1996). Structure of Staphylococcal alpha-Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* (80-. ). 274, 1859–1865.
- Soong, G., Chun, J., Parker, D., a Prince, A. (2012). Staphylococcus aureus activation of caspase 1/calpain signaling mediates invasion through human keratinocytes. *J. Infect. Dis.* 205, 1571–1579.
- Stanley, P., Koronakis, V., a Hughes, C. (1991). Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of Escherichia coli haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5, 2391–2403.
- Stanley, P., Packman, L., Koronakis, V., a Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin. *Science* (80-. ). 266, 1992–1996.
- Šebo, P., a Ladant, D. (1993). Repeat sequences in the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the Escherichia coli alpha-haemolysin translocator. *Mol. Microbiol.* 9, 999–1009.
- Thanassi, D.G., a Hultgren, S.J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 420–430.

- Tobkes, N., Wallace, B.A., a Bayley, H. (1985). Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein. *Biochemistry* 24, 1915–1920.
- Tschödrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., Ugochukwu, G., Buckley, J.T., a Peters, R. (1996). Optical single-channel analysis of the aerolysin pore in erythrocyte membranes. *Biophys. J.* 70, 723–732.
- Tweten, R.K. (1988). Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin. *Infect. Immun.* 56, 3235–3240.
- Uribe, K.B., Etxebarria, A., Martín, C., a 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., a Bhakdi, S. (1997). Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11607–11611.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Chavakis, T., a Bhakdi, S. (2005). Binding of *Escherichia coli* hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent. *J. Biol. Chem.* 280, 36657–36663.
- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H., a Bhakdi, S. (2006). Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J. Biol. Chem.* 281, 26014–26021.
- Vazquez, R.F., Maté, S.M., Bakás, L.S., Fernández, M.M., Malchiodi, E.L., a Herlax, V.S. (2014). Novel evidence for the specific interaction between cholesterol and  $\alpha$ -haemolysin of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 458, 481–489.
- Vécsey-Semjén, B., Knapp, S., Möllby, R., a van der Goot, F.G. (1999). The staphylococcal alpha-toxin pore has a flexible conformation. *Biochemistry* 38, 4296–4302.
- Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J.-M., Ladant, D., a Chopineau, J. (2013). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20473–20478.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., a Sebo, P. (2009). Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *FASEB J.* 23, 2831–2843.
- Wald, T., Petry-Podgorska, I., Fiser, R., Matousek, T., Dedina, J., Osicka, R., Sebo, P., a Masin, J. (2014). Quantification of potassium levels in cells treated with Bordetella adenylate cyclase toxin. *Anal. Biochem.* 450, 57–62.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A., a Bhakdi, S. (1995). Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J.* 14, 1607–1614.
- Walker, B., Krishnasastri, M., Zorn, L., a Bayley, H. (1992). Assembly of the Oligomeric Membrane Pore Formed by Staphylococcal alpha-hemolysin Examined by Truncation Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 21782–21786.

- Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K., a Boulnois, G.J. (1987). Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 55, 1184–1189.
- Wandersman, C., a Delepelaire, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4776–4780.
- Welch, R.A. (1991). Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521–528.
- Wilmsen, H.U., Pattus, F., a Buckley, J.T. (1990). Aerolysin, a hemolysin from *Aeromonas hydrophila*, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 115, 71–81.
- Wilmsen, H.U., Buckley, J.T., a Pattus, F. (1991). Site-directed mutagenesis at histidines of aerolysin from *Aeromonas hydrophila*: a lipid planar bilayer study. *Mol. Microbiol.* 5, 2745–2751.
- Wilsem, H., Leonard, K., Tichelaar, W., Buckley, J., a Pattus, F. (1992). The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO J.* 11, 2457–2463.
- Yin, Y., Zhang, F., Ling, V., a Arrowsmith, C.H. (1995). Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysin A and leukotoxin A. *FEBS Lett.* 366, 1–5.