

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie



Jan Poledňák

Bakteriální toxiny translokující přes plazmatickou membránu eukaryotických buněk

Bacterial toxins translocating across the membrane of eucaryotic cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 22.8.2014

Podpis:

Poděkování

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

Abstrakt

Bakteriální proteinové toxiny schopné translokace přes plazmatickou membránu jsou důležitými prvky virulence bakterií způsobujících onemocnění eukaryotickým organismům. Toxiny translokují své vlastní domény s toxickou aktivitou nebo vytvoří pór, kterým mohou procházet další molekuly od iontů až po DNA, RNA nebo proteiny. Pozorováním přenosu těchto a dalších uměle připravených látek na molekulární úrovni je možné zkoumat vlastnosti pórotvorných toxinů. Některé z těchto toxinů byly natolik podrobně charakterizovány, že mohou být po cílené mutagenezi naopak využity pro výzkum přenášených molekul. Jednou z takových aplikací je měření průchodu nukleotidů i celých vláken nukleových kyselin přes membránový kanál vytvářený α -hemolysinem *S. aureus*. Tato metoda si v současné době našla uplatnění při sekvenaci DNA.

Klíčová slova: toxiny, translokace, adenylát-cykláza, shiga toxin, diphtheria toxin, antrax toxin, α -hemolysin, nanopórové sekvenování

Abstract

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

Keywords: toxins, translocation, adenylate-cyclase, shiga toxin, diphtheria toxin, anthrax toxin, α -hemolysine, nanopore sequencing

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
Úvod	6
Jednomolekulový systém translokace toxinu	6
Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů	8
Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha	9
Shiga toxin	9
Diphtheriový toxin	12
Botulotoxin	13
In vitro systémy pro výzkum translokace	15
α -hemolysin	15
Nanopore sequencing	18
Biologické nanopóry	18
Nanopóry v pevné membráně (Solid-state nanopore)	19
Hybridní nanopóry	19
Detekce a záznam signálu	20
Anthrax toxin	22
Závěr	25
Použitá literatura	26

Úvod

Bakteriální toxiny schopné translokace přes eukaryotickou membránu jsou důležitým virulentním faktorem. V laboratoři, kde byla zadána má bakalářská práce, se výzkum věnuje pórtočvorným toxinům jako jsou adenylát cyklázový toxin (CyaA), hemolysin A (HlyA), α -hemolysin (α -HL), exotoxin ApxIA a kolicin U. Proto bych se v této práci chtěl věnovat různým typům translokace a dalšímu aplikovanému využití translokace. V poslední době se podobných toxinů využívá pro dopravu antigenů do buněk imunitního systému, pro citlivé snímání (sítě kapiček a hydrogelu) a dokonce i pro sekvenování DNA a RNA.

Práce má za cíl stručně shrnout vědomosti o toxinech schopných dopravovat různé makromolekulární látky (jakou jsou proteiny, nukleové kyseliny či oligosacharidy) přes membránu. Podobné systémy in vitro jsou použitelné i pro charakterizaci přenášených molekul a objasnění mechanismu působení použitých toxinů na úrovni základního výzkumu.

Jednomolekulový systém translokace toxinu

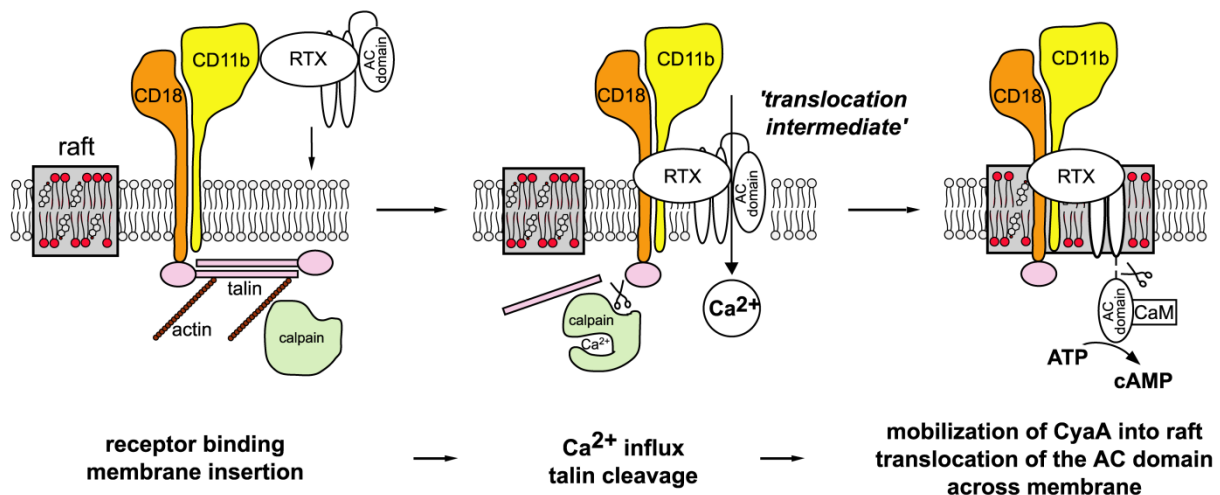
Do této skupiny se dají zařadit toxiny, které se skládají pouze z jednoho komponentu, který má vazebnou, translokační i enzymatickou aktivitu na jednom řetězci.

Nejvýznamnějším členem této skupiny je adenylát-cyklázový toxin.

Adenylát-cyklázový (CyaA) toxin je významným faktorem virulence bakterie *Bordetella pertusis* jako původce černého kašle. Protein je složen z 1706 aminokyselin. Adenyl-cyklázová doména (AC) se nachází na N-konci a je dlouhá 400 aminokyselin a na C-konci je 1306 aminokyselin dlouhá hemolysinová doména. Mezi residui 500 a 750 se nachází hydrofobní segmenty, které zaujímají alfa-helikální strukturu, aby se vnořily do membrány a přitom vytvořili kationt selektivní póry, odpovědné za hemolytickou aktivitu toxinu. C-konec (aminokyseliny 1000 až 1706) je zodpovědný za vazbu toxinu na specifický receptor cílové buňky – $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18) (Guermontprez et al. 2001). V této oblasti (residua 1014 – 1613) se také nachází přibližně 40 kopií vazebných míst pro vápenaté ionty, které jsou rozděleny do 5 bloků nanopeptidových repeticí, které jsou charakteristické pro RTX toxiny. CyaA toxin je exprimován ve formě neaktivního prekurzoru, který je aktivován specifickou acylací dvou lysinů – Lys⁸⁶⁰ a Lys⁹⁸³ (Barry et al. 1991). Následně je sekretován systémem T1SS přes plasmatickou a vnější membránu bakterie. Toxin se v hostiteli váže na myeloidní fagocytické buňky exprimující $\alpha_M\beta_2$ integrin CD11b/CD18. Ale tento toxin je unikátní tím, že je schopen invaze i přes to, že integrin není přítomen v buňce, i když s asi 100x menší účinností (Eby et al. 2010). Proces translokace enzymatické domény je závislý na přítomnost

vápenatých iontů a negativním membránovým potenciálu (Rogel and Hanski 1992; Otero et al. 1995; Veneziano et al. 2013).

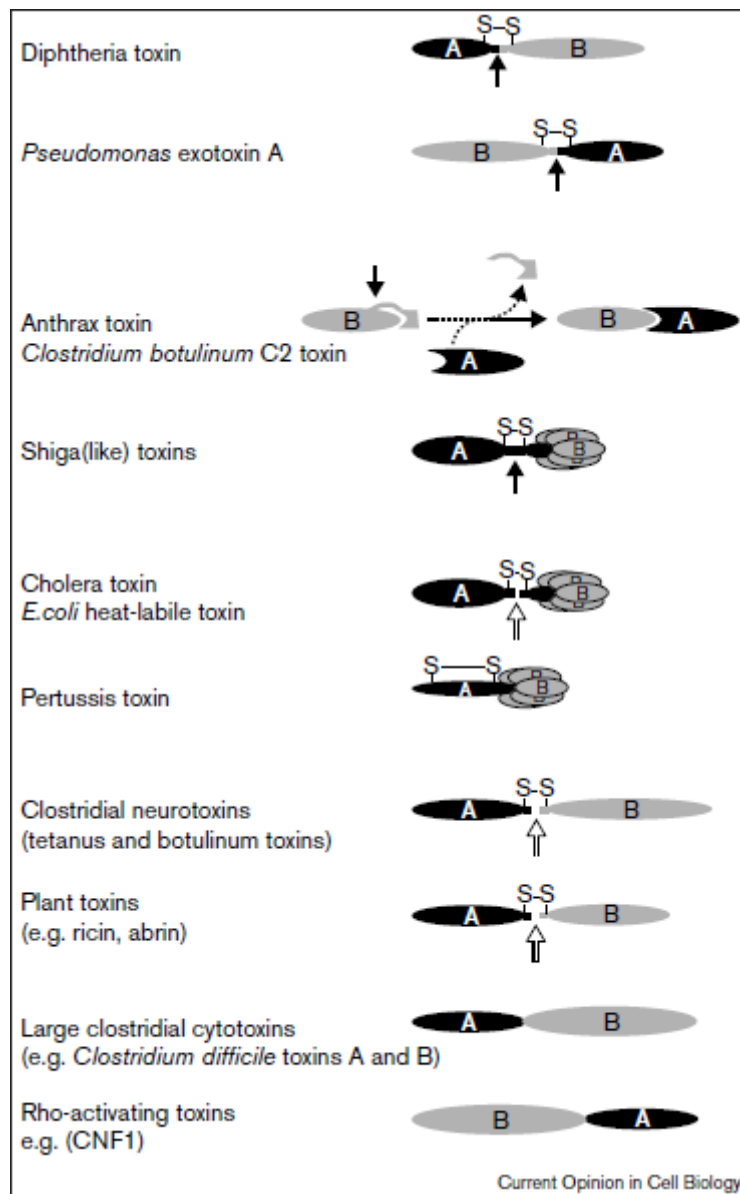
CyaA toxin se váže na integrinový receptor CD11b/CD18 v cytoplasmatické membráně makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk, který je rozptýlen v membráně mimo lipidické rafty a má cytoplasmatický konec podjednotky CD18 navázaný na aktinové řetězce přes propojující protein talin. Po vazbě na receptor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



Obrázek 1 zobrazuje translokaci CyaA přes buněčnou membránu. Prvním krokem je vazba na integrinový receptor CD11b/CD18, který se nachází mimo lipidický raft a CD18 je navázaná na aktinový cytoskelet pomocí linker proteinu talin. Poté dojde k zasunutí translokačního intermediátu do membrány, následný přísun externích Ca^{2+} dojde k aktivaci kalpaku, který odštěpí komplex CyaA-CD11b/CD18 od aktinového vlákna. Po odštěpení se tento komplex přemístí do cholesterol bohatého lipidového raftu, ve kterém je dokončena translokace AC domény. Po navázání CaM je spuštěna enzymatická aktivita AC domény (Bumba et al. 2010).

Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů

AB toxiny se skládají ze dvou komponentů (obrázek 2). Komponent A má na starosti toxickou aktivitu, která vede ke změně fyziologických podmínek v buňce nebo až k její smrti. Komponent B má na starosti vazbu k receptoru na plazmatické membráně a může hrát roli i při translokaci komponentu A do cytosolu cílové buňky. Mezi vnitrobuněčné cíle těchto toxinů se patří například aktin, ribozomy, nebo malé GTP-vazebné proteiny jako Rho nebo G-proteiny. Ve své práci se nevěnuji všem toxinům této skupiny, pouze těm, u kterých máme prozkoumány mechanismy nejpodrobněji.



Obrázek 2 zobrazuje schémata jednotlivých dvoukomponentových AB toxinů.

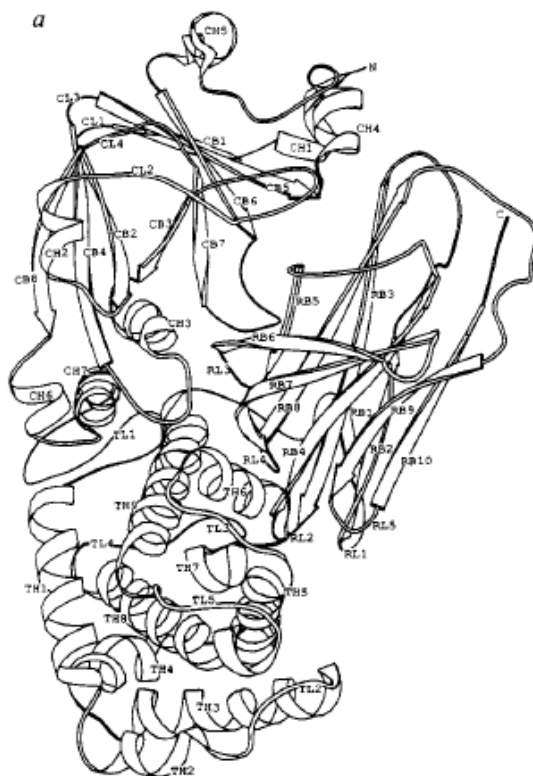
Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha

AB toxiny mají ve většině případů specifický receptor na povrchu cílové buňky. Třeba receptorem pro diphtheria toxin je nerozštěpený prekurzor pro heparin-vazebný růstový faktor EGF (ProHB-EGF) (Naglich et al. 1992), pro Shiga toxin je receptorem globotriaosylceramid (Gb3) (Lindberg et al. 1987) a pro cholera toxin to je monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) (Holmgren et al. 1975). Kromě vazby toxinu mohou mít receptory i další úlohy. Za prvé mohou mít přímou úlohu při penetraci toxinu skrz membránu – pro diphtheria toxin je to nezbytná vlastnost a pokud zaměníme transmembránovou nebo cytoplasmatickou doménu receptoru za GPI-kotvu, dojde ke snížení nebo zablokování pórtvorné aktivity, čímž se potvrzuje, že receptor hraje nezbytnou roli při translokaci toxinu (Lanzrein, Sand, and Olsnes 1996). Za druhé receptory určují cílovou organelu pro toxin ještě před jeho vlastním vstupem do cytosolu, např. lipidické složení receptoru pro Shiga toxin je esenciální pro retrográdní transport toxinu (Arab and Lingwood 1998). A za třetí, když je receptor umístěn v klathrinové jamce, toxin je endocytován mnohem rychleji, než kdyby se nacházel v planární membráně.

Shiga toxin

Oproti toxinům, které jsou dopravovány skrze membránu přímo (*Bordetella pertussis* –adenylát-cyklázový toxin), je většina toxinů nejprve endocytována. Mezi takové patří Shiga toxin, který bude příkladem pro vysvětlení procesu endocytózy a retrográdního transportu.

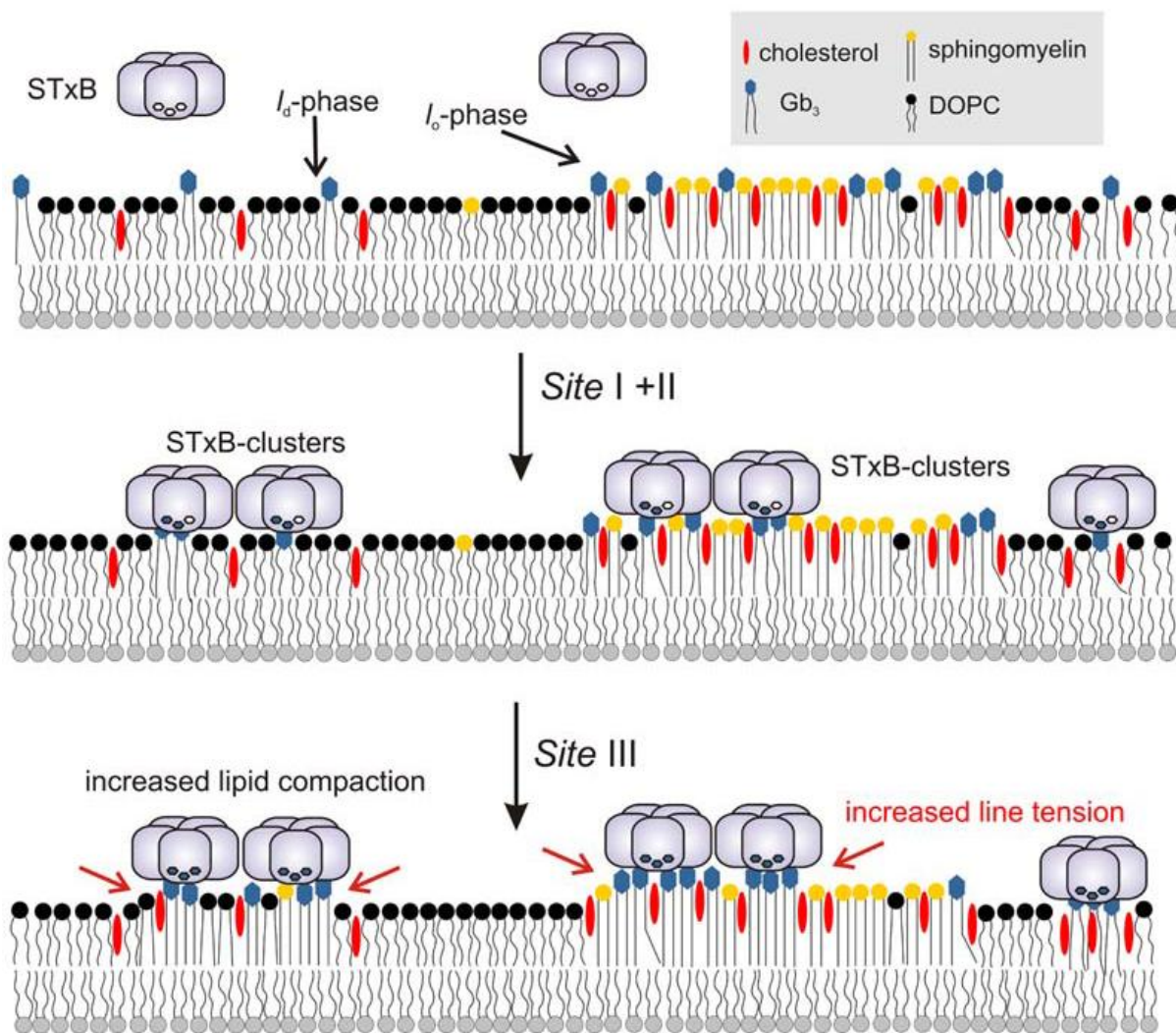
Shiga toxin (*Shigella dysenteriae*) je tvořen ze dvou komponentů, kde komponent A je tvořen dvěma doménami A1 a A2, které nejsou kovalentně vázané s komponentem B, který je tvořen pentametrem z B podjednotek, z nichž je každá schopná navázat tři globotriaosylceramidy (Gb3) molekuly. Protein je dlouhý 931 aminokyselin. Toxin ve sbaleném stavu má tvar písmene Y (obrázek 3) (Choe et al. 1992). Základnu tvaru Y tvoří transmembránová podjednotka a jedno rameno tvoří receptor vazebná podjednotka komponentu B a druhé rameno je tvořeno komponentem A. Komponent A má enzymatickou aktivitu, je proto nezbytné translokovat jeho doménu A1 přes membránu. Komponent A obsahuje sekvenci Arg248-Val-Ala-Arg251, kterou rozeznává furin a v tomto místě způsobí rozštěpení komponentu A na domény A1 a A2, které ale stále zůstanou spojeny disulfidickou vazbou. Tento proces je nezbytný pro aktivaci toxinu v napadené buňce (Garred, Vandeurs, and Sandvig 1995).



Obrázek 3 zobrazuje terciární strukturu Shiga toxinu. Protein má tvar písmene Y. Základnu tvoří transmembránová podjednotka (T) a jedno rameno vazebná podjednotka (R) komponentu B, druhé rameno tvoří komponent A (C) (Choe et al. 1992)

Navázání toxinu na receptor se jeví jako komplexní systém, protože každý z pěti fragmentů komponentu B Shiga toxinu má tři vazebná místa pro receptor Gb3. Z nich pouze dvě mají vysokou afinitu k receptoru, zatímco třetí vazebné místo slouží k nahromadění Gb3 v dostatečném množství, aby se mohl na membráně vytvořit cholesterol bohatý „cluster“.

Tyto clustery se spojují dohromady a vytváří větší těsně navázané domény, které zvyšují pnutí membrány a způsobují její prohnutí dovnitř, tento stres na lipidické membráně může být hnací silou k endocytóze nezávislé na klathrinu (obrázek 4) (Windschiegl et al. 2009).



Obrázek 4 schematicky zobrazuje vazbu Shiga toxinu na membránu. Vazebné místo I a II slouží k navázání toxinu k receptoru Gb₃ a vazebné místo III zajišťuje dostatečné množství Gb₃ pro vytvoření clusteru a zvýšení pnutí membrány (Windschiegl et al. 2009).

Při vazbě toxinu hraje důležitou roli nejen komponent B, ale především komponent A, který sám o sobě stimuluje přenos přes cytoplazmatickou membránu závislý na klathrinu. Toxin samotný se preferenčně váže na receptory Gb₃ v klathrinových jamkách. Komponent A interaguje s membránovými proteiny, především se Spleen tyrosin-kinázou (Syk), která fosforyluje klathrin a zvyšuje množství klathrinových jamek. Endocytóza závislá na klathrinu je podstatně důležitější než endocytóza nezávislá na klathrinu, neboť funguje s vyšší účinností (Torgersen, Lauvrak, and Sandvig 2005).

Dalším krokem je přesun Shiga toxinu časným endosomem, popř. pozdním endosomem do Golgiho aparátu. Jeho cesta endosomy a interakce s membránami Golgiho aparátu je překvapivě rychlá, pohybuje se v řádu jednotek minut. Po transportu do Golgiho aparátu se toxin už nehromadí v organelách pozdní endosomální dráhy po vlastním přenosu

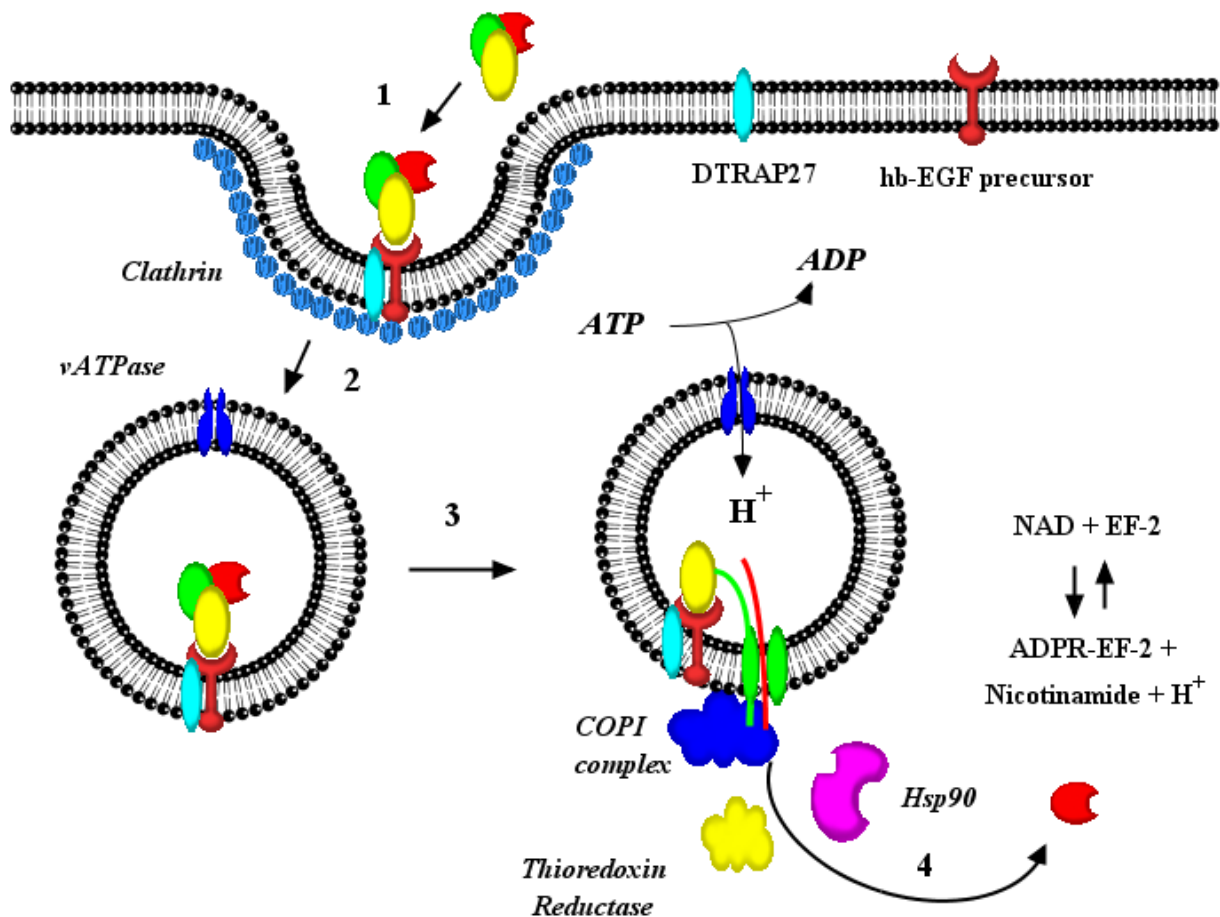
z časného, popř. pozdního endosomu (Mallard et al. 1998). Zpomalením této dráhy by mohla být inhibice enzymů PKC δ , p38 a cPLA₂ α , které využívá toxin pro transport endosomu do Golgiho aparátu. Nejsilnějším inhibítozem transportu je látka ONO-RS-082, inaktivující PLA₂. Na transport toxinu má též vliv pH, snížením hladiny lysosomální V-ATPázy zodpovědné za abdikaci endosomů, nebo přidání bafilomycinu, který je inhibítozem V-ATPázy. Naopak chloroquin, který také ovlivňuje pH endosomu, neblokuje transport toxinu do Golgiho aparátu. Dalším inhibítozem je molekula Retro-2 a její deriváty, které inhibují transport endosomů, ale nemají vliv na jejich morfologii a neblokují tak transport endogenních markerů jako TGN46 nebo CI-M6PR (Noel et al. 2013).

Po retrográdním transportu Golgiho aparátem do endoplasmatického retikula dochází k disociaci komponentů A a B pomocí protein disulfid isomerázy (PDI), která působí v hydrofobní oblasti mezi podjednotkou A1 a komponentem B. Disulfidická vazba mezi podjednotkami A1 a A2 (residua 248 – 251) je redukována vnitřním prostředím. Následně spontánně rozbalená A1 podjednotka interaguje se chaperony Hsp40 ERdj3, který spolu se Sec61 translokuje A1 podjednotku přes membránu endoplasmatického retikula (Yu and Haslam 2005). Translokaci toxinu z endosomu podrobně vysvětlím na příkladu diphtheria toxinu, protože je zde detailněji prozkoumaná.

Diphtheriový toxin

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

disulfidický můstek spojující tyto dvě části je redukován vlivem prostředím uvnitř cílové buňky. Posledním krokem je dokončení translokace zbylé části A komponentu za asistence thioredoxin reduktázy, a následné sbalení chaperonem Hsp90 (obrázek 5) (Falnes et al. 1994; Silverman et al. 1994).

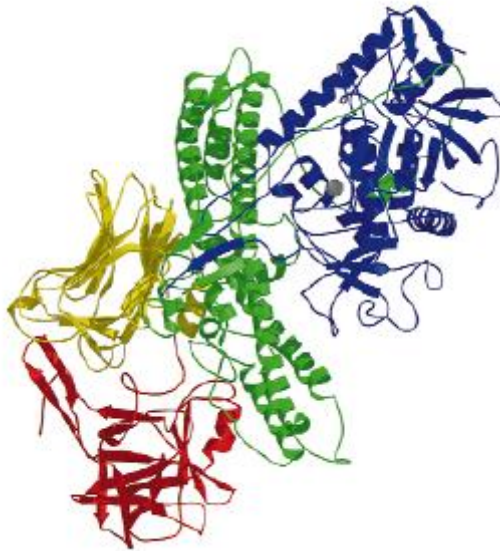


Obrázek 5 zobrazuje schéma mechanismu translokace diphtheria toxinu do cytosolu eukaryotické buňky. 1) Toxin se váže na receptor na povrchu cytoplazmatické membrány a 2) je vtažen do klathrinové jamky, která vytvoří časný endosom. 3) Vlivem vnitřního pH lumenu, které reorganizuje celý toxin a spustí inserci translokační domény B komponentu, který vytvoří pór v membráně, kterým 4) se translokují katalytická doména za účasti COPI komplexu, thioredoxin reduktasy a Hsp90. Po opětovném sbalení do aktivní konformace provádí toxin ADP-ribosylaci elongačního faktoru 2 (EF2). Diphtheria toxin je označen: červená pro katalytickou doménu, zelená pro transmembránovou doménu a žlutá pro receptor vazebnou doménu.

Botulotoxin

Botulotoxin, další významný člen AB toxinů, ale liší svojí translokační doménou, která svým sbalením indikuje odlišný způsob translokace, proto je botulotoxin velmi studovaným toxinem. Je to toxin produkovaný bakteriemi *Clostridium botulinum*. Botulotoxin je považován za nejúčinnější jed, který známe. Smrtelná dávka je 1,3 – 2,1 ng/kg nitrožilně a

10 – 13 ng/kg inhalací, nejčastější intoxikace ovšem nastává při pozření spor *C. botulinum*, které jsou obsaženy ve špatně konzervovaných pokrmích. Toxin způsobuje onemocnění zvané botulismus. Protein je tvořen dvěma řetězci – lehkým a těžkým, které jsou spojeny disulfidickým můstkem a tvoří tři funkční domény proteinu. Jsou to protein vazebná; katalytická; pórotvorná a translokační doména.



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

Receptor vazebná doména je tvořena ze dvou zhruba stejně velkých sub-domén, které jsou tvořeny především β -listy a jsou navzájem spojené jedním α -helixem. Receptor vazebná doména se nachází daleko od α -helixů translokační domény a vůbec se ji nedotýká, a proto se všechny smyčky na povrchu mohou účastnit vazby na receptor. Translokační doména má ve své střední části dva centrální α -helixy dlouhé 105 Å a kolem nich se balí katalytická doména a to ještě předtím než se zformuje hlavní tělo cylindrického tvaru. α -helixy se točí kolem sebe do spirály a tato podobná struktura se nachází i u kolicinu Ia a u chaperonu GrpE. α -helixy jsou antiparalelní a amfipatické. Katalytická doména je tvořena α -helixy i β -listy. Aktivní místo domény je zanořeno 20-24 Å dovnitř proteinu, má negativní náboj a je zpřístupněno kanálem, který je chráněn před rozpouštědly jak hlavní částí domény, tak i jejím opaskem, který se vine kolem translokační domény (obrázek 6) (Lacy et al. 1998; Kumaran et al. 2009).

Botulotoxin B je aktivní, pokud je v heterodimerní formě a je redukován disulfidický můstek mezi dvěma řetězci. Těžký řetězec je zodpovědný za vazbu proteinu k receptoru

v klathrinové jamce neurální buňky, poté je toxin endocytován. Inzerci lehkého řetězce do membrány endosomu obstarává těžký řetězec a následně je spuštěna jeho enzymatická aktivita. Proteázová aktivita je lokalizována na lehkém řetězci a je specifická pouze na SNARE proteiny, proteiny malých synaptických vezikulů. Jejich štěpením se redukuje uvolňování neurotransmiteru (Schiavo et al. 1992).

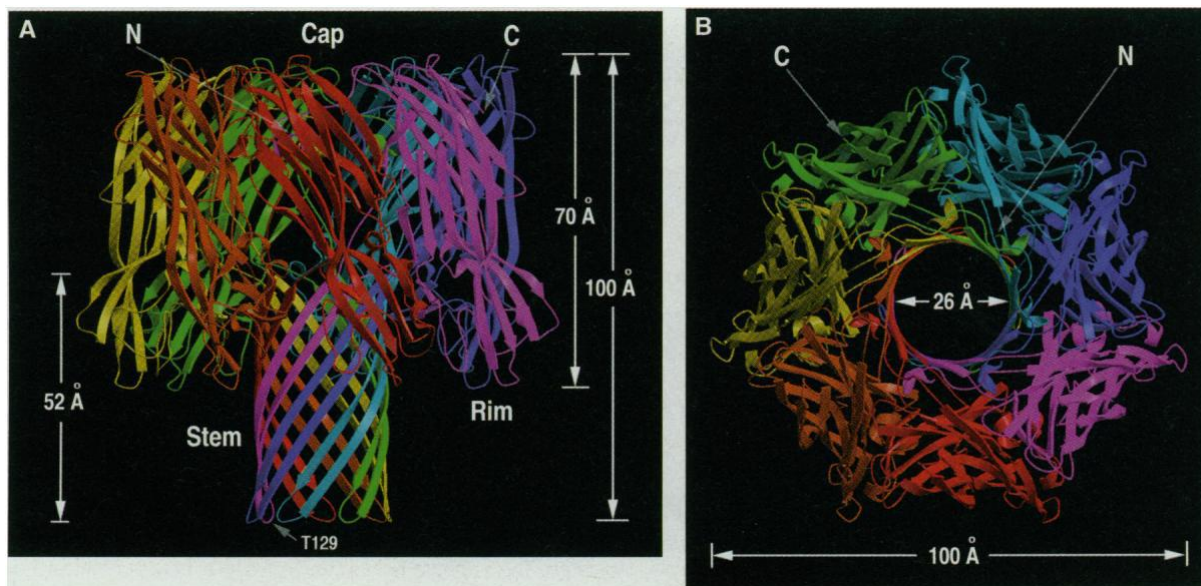
In vitro systémy pro výzkum translokace

α -hemolysin

α -hemolysin (α -HL) sekretovaný bakterií *Staphylococcus aureus* způsobuje lyzi buněk. Napadá především krev a její krevní elementy - krvinky, monocyty, krevní destičky, lymfocyty; a endoteliální buňky (Bhakdi and Tranum-Jensen 1991). Není to člen skupiny AB toxinů, tedy netranslokuje žádnou svoji část, ale vytváří póry, kterými mohou procházet jiné molekuly. Z tohoto důvodu tady popisují translokaci skrze α -HL, stejně tak i detailní popis struktury, protože se mu budu ještě více věnovat kvůli použití při sekvenaci a je to nutné pro pochopení jeho úlohy.

α -HL tvoří membránový pór, který má hřibovitý tvar, jehož rozměry jsou 100 Å na výšku a 100 Å na šířku. Pór je tvořen sedmi monomery. Protein je rozdělen na tři základní části, kterými jsou čepička (cap), kmen (stem) a lem (rim) (obrázek 7). Protein je umístěn na membránové dvojvrstvě tak, že čepička a lem jsou na povrchu fosfolipidické membrány a kmen je zanořen do membrány a tvoří transmembránový kanál. Čepička je tvořena sedmi „ β sandwich“ strukturami, β skládané listy proti sobě a v podstatě vytvoří β -barel. Lem vyčnívá ze spodní části čepičky a je v těsné blízkosti, nikoli v přímém kontaktu s fosfolipidickou membránou. Mezi kmenem a lemem se nachází trhlina, která vymezuje oblast bohatou na aminokyseliny, které se podílejí na interakci mezi proteinovým lemem a hlavičkami fosfolipidů nebo receptorů na povrchu fosfolipidické membrány. Rozsáhlé plochy povrchu kontaktu hydrofobních a hydrofilních částí na povrchu jednotlivých protomerů způsobují pevnost a stabilitu celého heptameru. Protomery jsou spojeny do sebe zapadlými aminokyselinami. Je s podivem, že delece pouhých dvou $-NH_2$ skupin vede k inaktivaci hemolytické aktivity, přestože jednotlivé aminokyseliny v této oblasti nemají esenciální roli v proteinu. Konzervativní substituce na pozici 35 vede ke snížení oligomerizační, lytické, a letální aktivity, zatímco nekonzervativní substituce všechny tyto aktivity zcela ruší (Song et al. 1996).

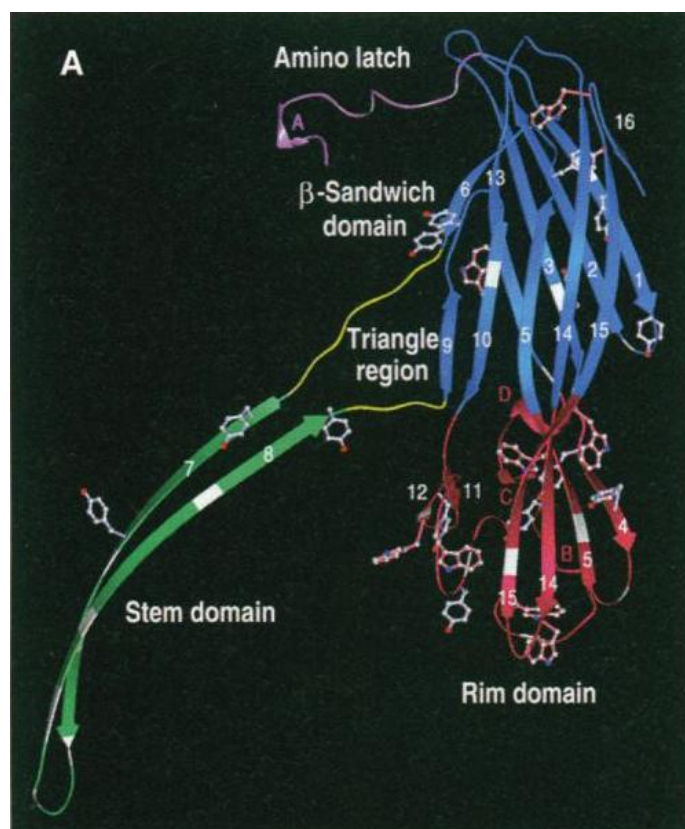
Protomerové jádro je tvořeno asi 80% všech aminokyselin. Jádro je elipsoidového tvaru o rozměrech 70 x 45 x 20 Å. Struktura protomerů se podle krystalografie liší jen o 0,24 Å. Každý protomer obsahuje 16 β skládaných listů, 3 krátké úseky α helixů, dlouhý náhodně spletený úsek Asp¹⁸³ až Lys²⁰⁵ a značnou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



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

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

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



Obrázek 8: Protomer α -hemolysinu zobrazen pomocí stuh. Modrou barvu má doména v čepičce, červená zobrazuje doménu v lemu, zelená v beta barelu a žlutá pro trojúhelníkovou oblast oddělující kmenovou doménu od čepičkové domény a šedě označené aminokyseliny jsou Tyr, Trp a Gly (Song et al. 1996).

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

Vazba na membránu má nejdůležitější roli, pravděpodobně je zprostředkována přes receptor, ale ten se ještě nepodařilo identifikovat. Toxin se neváže na buňku, jejíž membrána obsahuje fosfatidylethanolamin a fosfatidylglycerol, protože v takových membránách toxin nedokáže integrovat pórtvornou doménu. Oligomerizace vede k tvorbě dostatečně velké hydrofobní struktury k udržení stabilní polohy uvnitř dvojvrstvy. Oligomerizace se zdá být upřednostňována před laterální difuzí jednotlivých již zanořených monomerů. Nejméně známým jevem v celkovém působení α -HL je inserce kmenové domény do dvojvrstvy (Galdiero, Galdiero, and Pedone 2007).

V membráně se po vnoření pórotvorné domény vytvoří neselektivní kanál, který je schopen přenášet molekuly do M_r 4000, kterou má například Dextran 4, který už neprojde skrze pór a tím se zablokuje hemolýza (Bhakdi, Muhly, and Fussle 1984). Vzhledem k jeho všestrannosti se s ním začalo pracovat jako snímač translokovaných částic pro ionty kovů (Braha et al. 2000), malé organické molekuly (Gu et al. 1999), RNA (Japrun et al. 2010), DNA (Howorka, Cheley, and Bayley 2001) a proteiny (Movileanu et al. 2000).

Nanopore sequencing

Po popisu struktury α -HL bych se rád zaměřil na jeho momentálně nejrozšířenější a už i komerčně vyžívanou aplikaci – sekvenování pomocí nanopórů. Tato bakalářská práce byla zadána ještě před tím, než tato metoda sekvenování byla uvedena na trh a tehdy mě to velice zaujalo a nadchla mě myšlenka 1000\$ genomu. Sekvenovat se dají DNA, RNA, při sekvenování DNA a RNA je nutné, aby nukleové kyseliny byly jednovláknové.

Je to metoda sekvenování založena na identifikaci každé báze, která prochází skrz pór. Aby bylo dosaženo dobrých výsledků při čtení vlákna, je nutné dodržet několik podmínek. Vlákno musí být schopno se přiblížit k detekčnímu systému, tak aby bylo zachyceno a následně prošlo pórem. Základními předpoklady pro správné zpracování vlákna a jeho přečtení jsou následující: (I) každý nukleotid procházející skrz pór musí vytvořit zaznamatelnou jedinečnou krátkodobou překážku pro elektrický proud; (II) vnitřní prostor póru musí mít takovou velikost, aby se v něm držel pouze jeden nukleotid v určeném čase; (III) čas měření musí být tak krátký, aby dokázal zachytit hodnotu iontového proudu probíhajícího kolem nukleotidu v okamžiku jeho vazby s přenašečem; (IV) je nezbytně nutné zamezit zpětnému chodu vlákna skrze pór; (V) membrána i kanál, ve kterých probíhá měření, musí být dostatečně odolné, aby vydržely chemické a teplotní změny prostředí nutné pro odstranění sekundární struktury analyzovaného vlákna (Thompson and Oliver 2012).

Biologické nanopóry

Jako biologické nanopóry se používají pórotvorné toxiny, které jsou použity v divoké formě anebo s mutacemi. Jako nejvhodnější se osvědčil α -HL (Kasianowicz et al. 1996), protože tvoří transmembránový kanál, který propouští jednovláknovou DNA (ssDNA) ale nikoliv dvouvláknovou DNA (dsDNA). Není ovšem použit v divoké formě, ale je upraven mutacemi, aby se upravil vnitřní rozměr póru. Tento protein se za normálních podmínek váže na lipidickou dvojvrstvu, která ale má omezenou životnost, je s ním náročná manuální práce,

není odolný vůči chemickým a teplotním výkyvům, proto musel být pro komerční využití nahrazen odolnější alternativou (viz níže) (Howorka, Cheley, and Bayley 2001).

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

Nanopóry v pevné membráně (Solid-state nanopore)

Jako základní materiál pro tvorbu membrány se používají deriváty křemíku, především nitrid křemičitý. Rychlost translokace vlákna DNA (93 kpb) přes nanopór v pevné membráně je cca 10 kb/ms (rychlost vlákna, které je volně přenášeno nanopórem za pomoci elektroforézy), což je ale příliš vysoká rychlost, tak bylo nutné ji zpomalit použitím biologických pórů a změnou podmínek. Ale na rozdíl od lipidické dvojvrstvy jsou tyto silikonové membrány odolnější vůči potřebným podmínkám pro kvalitní sběr dat (Healy, Schiedt, and Morrison 2007).

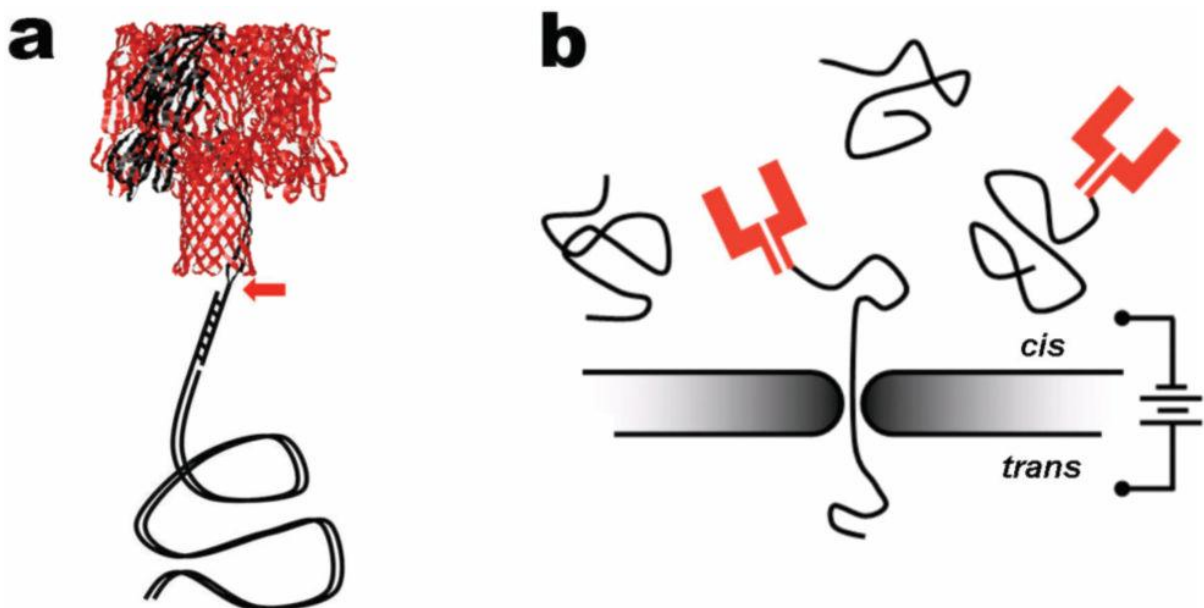
Hybridní nanopóry

Hybridní nanopóry vznikají vložením jednotlivých, předem sestavených alfa-hemolysinů do nanopóru vyrobeného do pevné membrány. Monomer α -hemolysinu je modifikován přidáním 11 aminokyselin dlouhou smyčkou (loopem) na výběžek beta-barelu. Smyčka obsahuje cystein vazebné místo, kde se disulfidickým můstkem váže 12 bází dlouhý DNA oligomer, který tvoří vazebný bod pro 3 kbp dlouhou dsDNA molekulu s komplementárním jednovláknovým koncem. Tato navázaná dsDNA je nezbytná pro zavedení α -HL do membrány, dsDNA je elektroforézou translokována skrze pór v pevné membráně a ta za sebou táhne i α -HL, který se po translokování celého vlákna navázané dsDNA zastaví přímo na membráně, protože jeho čepička proteinu neprojde úzkým nanopórem. Nezbytné je dodržet velikost nanopóru v membráně a to v rozmezí 2,4-3,6 nm, která je dostatečně velká, aby jím prošla molekula dsDNA a kmen α -HL, a přitom dostatečně malá, aby jím už nedokázala projít čepička proteinu. Tímto způsobem se dá docílit, aby čepička směřovala na cis stranu (strana s molekulami určených k translokaci) membrány a beta-barel ústil na trans straně (strana, kam jsou molekuly translokovány) membrány (obrázek 9). Tomuto jevu napomáhá i to, že alfa-hemolysin je velká hydrodynamická brzda vzhledem k obrovské velikosti proteinu a tudíž se k póru přiblíží vždycky, až když translokována celá

molekula dsDNA. Následná sekvenace už pracuje s ssDNA, které se přidají na cis stranu (Hall et al. 2010).

Mutace α -hemolysinu pro import do křemíkové membrány

Monomer α -hemolysinu je produkován se 11 aminokyselin dlouhou smyčkou obsahující cystein (GGSSGCGSSGG), která nahrazuje residuum 129 a na C-konec je přidáno 8 molekul aspartátu. Tyto monomery jsou smíchány s monomery mutanty α -hemolysinu M113N, a vytvoří heteroheptamerní proteinový pór na buněčných membránách králičích červených krvinek. Proteiny navázané na membránu jsou poté separovány SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou, aby se získali póry s podjednotkami v poměru 1:6 (α -hemolysinCys: α -hemolysinM113N), které jsou extrahovány přímo z gelu (Bayley and Jayasinghe 2004; Howorka, Cheley, and Bayley 2001).

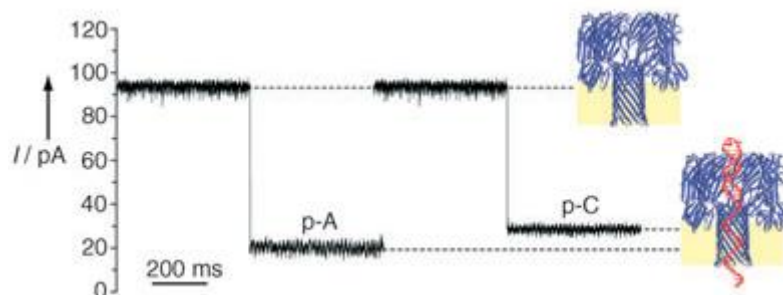


Obrázek 9 zobrazuje konstrukci hybridních nanopórů. (a) α -HL heteroheptamer s navázaným 12 bází dlouhým oligomerem, na který je navázaná dsDNA, která (b) navede α -HL do póru v pevné membráně a protein se v něm zastaví, protože jeho čepička neprojde pórem (Hall et al. 2010).

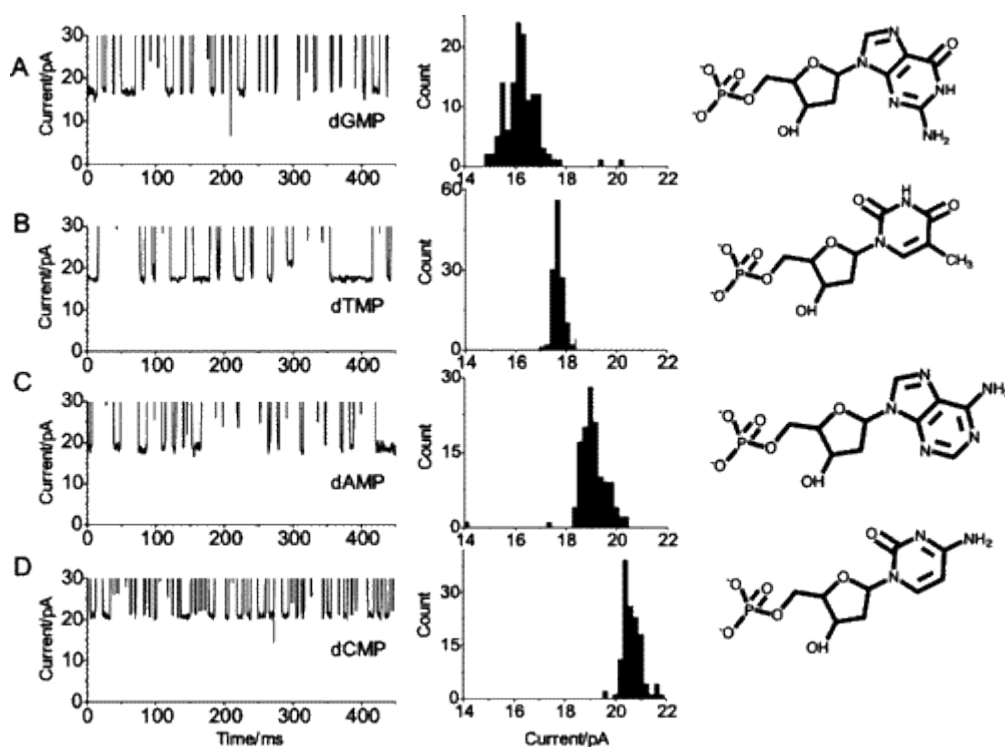
Detekce a záznam signálu

Detekce signálu během sekvenace probíhá měřením elektrického proudu vyvolaného tokem monovalentních iontů přes pórtvorný protein. Měření proudu probíhá s frekvencí 10 kHz, aby byly zachyceny všechny báze translokované ssDNA. Při této detekci se sledují pouze dva stavy proteinu. Otevřený a zavřený. (obrázek 10) Při otevřeném stavu dochází

k proudu iontů limitovaným pouze vlastnostmi aparatury a prostředí. Při zavřeném stavu dochází k blokaci proudu iontů (Gu et al. 1999). Tento rozdíl se detekuje a slouží jako poznávací znak pro jednotlivé molekuly (obrázek 11). Měřením v konkrétních podmínkách se zjistilo, že hodnota elektrického proudu pro báze je následující: guanin má v záznamu hodnotu 16.2 ± 0.5 pA, thymin 17.6 ± 0.6 pA, adenin 18.6 ± 0.6 pA a cytosin 20.2 ± 0.5 pA (Ashkenasy et al. 2005; Astier, Braha, and Bayley 2006).



Obrázek 10 ukazuje otevřený stav a zavřený stav a jeho projev na záznamu elektrického proudu (Ashkenasy et al. 2005).

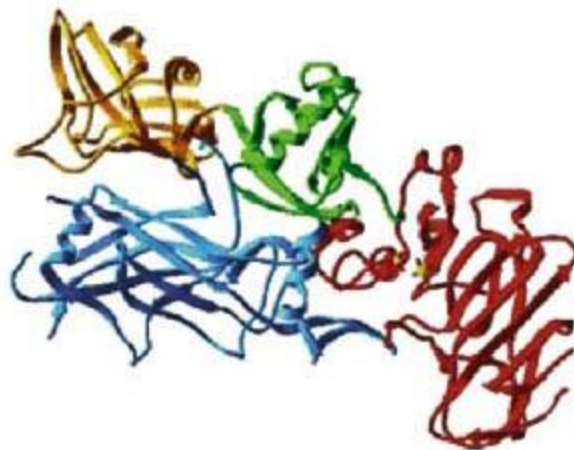


Obrázek 11 zobrazuje hodnotu elektrického proudu procházející pórem. Při translokaci bází dochází k blokaci elektrického proudu a zjišťují se dva stavy – otevřeno a zavřeno. Při otevřeném stavu je pór volně průchozí pro proud a při zavřeném stavu je v póru navázaná báze. V grafech v levém sloupci jsou zobrazeny zavřené stavy, které snižují hodnotu proudu. V prostředním sloupci jsou histogramy četnosti hodnoty blokace a z nich se odvodila hodnota blokace proudu pro všechny báze (Astier, Braha, and Bayley 2006).

Anthrax toxin

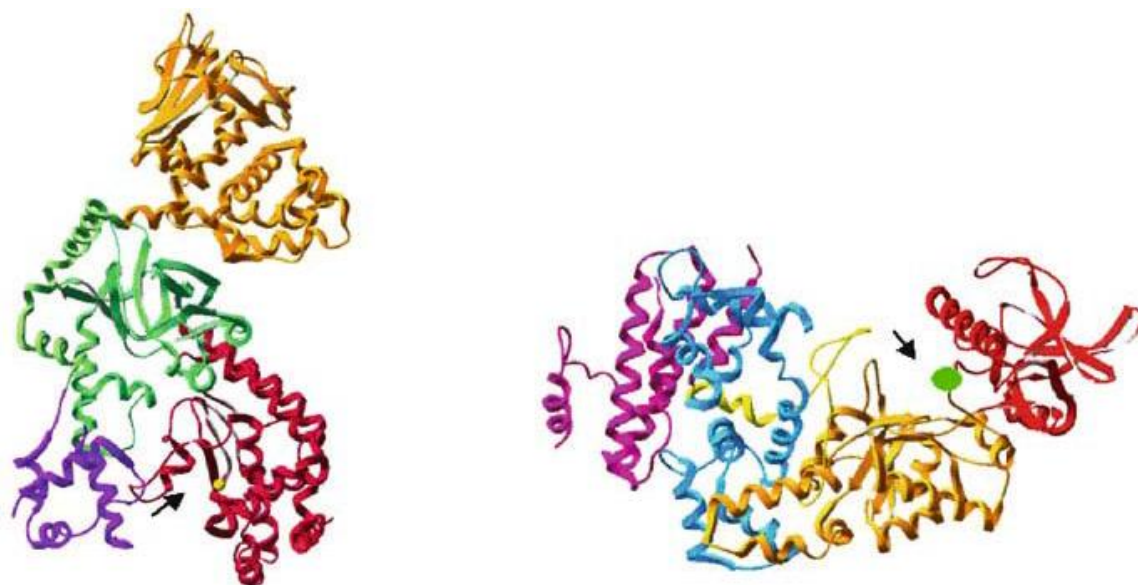
Toxin je produkovaný bakterií *Bacillus anthracis* a je to hlavní agens onemocnění antrax. Toxin je složený ze tří proteinů: protektivní antigen (PA), smrtící faktor (lethal factor – LF) a edémový faktor (edema factor – EF). LF a EF mají enzymatickou aktivitu a PA se váže na cílovou buňku. EF je kalmodulin dependentní adenylát cykláza, která se pro aktivaci musí dostat do cytosolu napadené buňky, LF je zinek dependentní proteáza, která štěpí kinázu kinázy aktivované mitogenem. Tyto tři části jsou kódovány na plasmidech a jsou syntetizovány a sekretovány každá zvlášť (Brossier et al. 2000).

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



Obrázek 12 zobrazuje PA a jeho čtyři domény: doména 1 (červená) má aktivní místo pro proteolytickou aktivaci; doména 2 (modrá) zprostředkovává heptamerizaci a podílí se na inzerci do membrány; doména 3 (zelená) má neznámou funkci a doména 4 (žlutá) je receptor vazebná doména (Petosa et al. 1997).

EF a LF tvoří v kombinaci s PA toxiny – smrtelný (PA+LF) a edémový (PA+EF). V obou komplexech PA funguje jako receptor vazebná a pórtvorná doména, zatímco LF a EF jsou doménami s toxickou aktivitou (Brossier et al. 2000). Virulenní faktory se do cílové buňky dostávají přes vazbu na PA, který už je proteolyticky aktivovaný, navázaný na receptor a

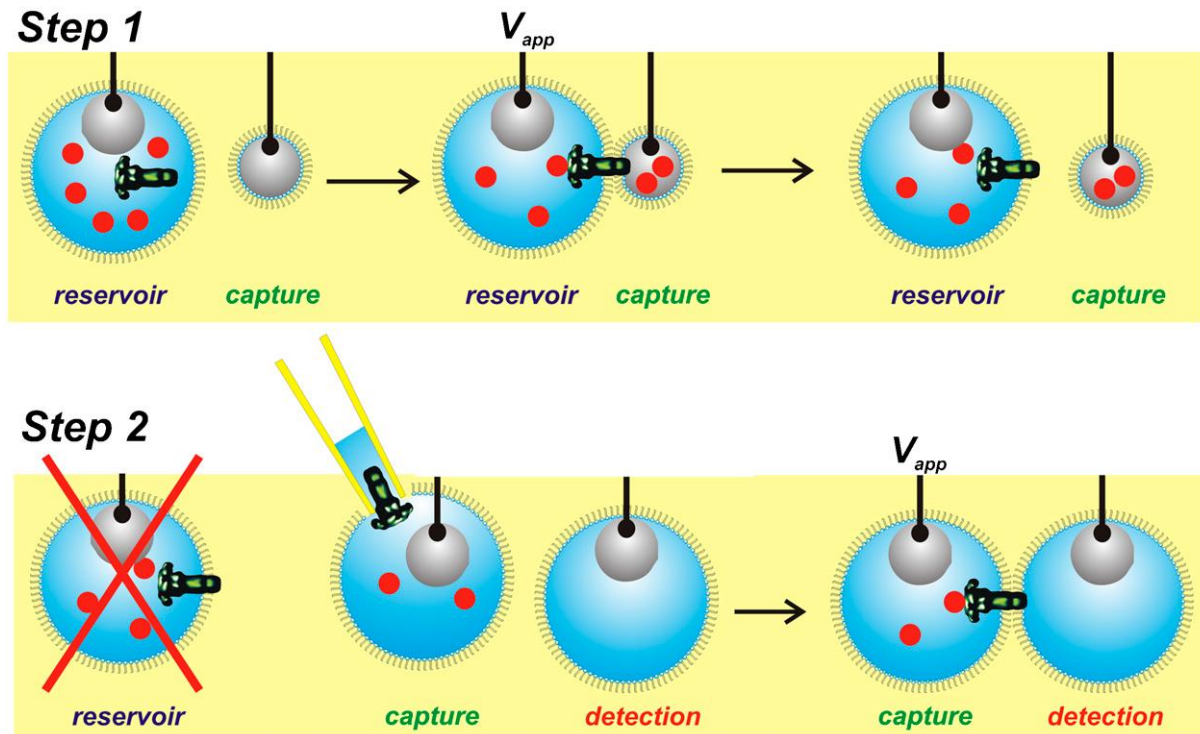


Obrázek 13: Vpravo je struktura LF a jeho čtyř domén: doména 1 (žlutá) váže translokační doménu PA; doména 2 (zelená) se podobá ADP-rybosilačnímu toxinu *Bacillus cereus*; doména 3 (fialová) je vsunuta do doména 2 jako strukturální duplikát její části; doména 4 (červená) je podobná zinek dependentní proteáze (navázaný zinek je označen šipkou) a obsahuje aktivní katalytické místo. (Pannifer et al. 2001) Vlevo je struktura EF se třemi globulárními doménami (žlutá, červená a žlutá), které tvoří katalytické centrum; mezi doménami (červená a žlutá) na jejich styku se nachází aktivní místo označené šipkou; helikální doména (fialová) je CaM vazebná doména s navázaným Cam (modrá) (Drum et al. 2002).

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

PA se díky svým vlastnostem přenašeče heteromerních molekul využívá při výzkumu translokace in vitro. Využívá se při výzkumu na černých lipidických membránách (BLM) anebo na dvojvrstvě na rozhraní kapičky (DIB). Obě tyto metody spočívají ve vytvoření umělé lipidické membrány mezi dvěma prostředími, do kterých jsou zavedeny elektrody, které elektroforeticky přenáší látky ze strany cis do strany trans. V membráně je třeba vytvořit pór, kterým by molekuly procházeli a my mohli měřit četnost, vlastnosti anebo rychlost přenosu. BLM je systém, kde jsou dva oddíly spojeny malým otvorem, ve kterém vytvoříme lipidickou membránu, jejíž složení si navolíme podle experimentu. DIB je systém využívající vzniku monovrstvy lipidů na povrchu kapičky, která po kontaktu s druhou kapičkou vytvoří

dvojvrstvy na jejich rozhraní (obrázek 14). Pórotvorné toxiny se využívají pro přenos molekul póry ze strany cis do strany trans. Mezi nejčastěji využívané toxiny se používají PA, CyaA a α -HL (Fischer et al. 2011).



Obrázek 14: Zobrazuje, jak vypadá experiment na DIB s antrax toxinem. Krok 1: dvě elektrody jsou zabalené v 2% agarose (šedá) a jsou ponořeny do lipidového hexadekanového roztoku (žlutá), zásoba obsahuje PA (černá) a LF (červená), po kontaktu se zachytávací kapičkou se vytvoří dvojvrstva do které se zanoří PA. Následuje translokace LF poháněná membránovým potenciálem a poté jsou kapičky zase odděleny. Krok 2: zásobní kapička je úplně odstraněna a do zachytávací kapičky je přidán buffer, vytvoří se nová kapička, do které je přidán PA a je přiložena k detekční kapičce, vytvoří se dvojvrstva, inkorpuluje se PA a proběhne translokace LF, která je monitorována na jednopórové úrovni (Fischer et al. 2011).

Závěr

Studiu bakteriálních toxinů se věda věnuje už desítky let a stále slaví úspěchy s objevováním nových mechanismů jejich působení. Tyto mechanismy je nutné studovat a odhalovat, protože díky jejich znalosti můžeme například zajistit cílenou dopravu cizorodých antigenů do buněk imunitního systému. Organismus se pak může účinněji bránit proti virovým a nádorovým onemocněním, na které doposud neexistovala žádná metoda léčby.

Kromě toxického působení způsobující poškození buněk se toxiny dají využít i jinak. Po jejich detoxikaci vzniknou tzv. toxoidy, které slouží jako mocné nástroje buněčné biologie pro výzkum buněčného transportu, selektivní inhibice, buněčných dějů apod.

Ve své práci jsem se pokusil shrnout nejprozkoumanější toxiny a jejich mechanismy působení. V případě dvou toxinů (α -HL a antrax toxin) jsem nastínil možnosti jejich využití v dalším výzkumu především *in vitro*.

Použitá literatura

- Ashkenasy, N., J. Sanchez-Quesada, H. Bayley, and M. R. Ghadiri. 2005. "Recognizing a Single Base in an Individual DNA Strand: A Step toward DNA Sequencing in Nanopores." *Angewandte Chemie-International Edition* 44 (9): 1401–4. doi:10.1002/anie.200462114.
- Astier, Y., O. Braha, and H. Bayley. 2006. "Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter." *Journal of the American Chemical Society* 128 (5): 1705–10. doi:10.1021/ja057123+.
- Barry, Em, Aa Weiss, Ie Ehrmann, Mc Gray, El Hewlett, and Ms Goodwin. 1991. "Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin and Hemolytic Activities Require a 2nd Gene, *Cyc*, for Activation." *Journal of Bacteriology* 173 (2): 720–26.
- Bayley, H., and L. Jayasinghe. 2004. "Functional Engineered Channels and Pores - (Review)." *Molecular Membrane Biology* 21 (4): 209–20. doi:10.1080/09687680410001716853.
- Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen. 1991. "Alpha-Toxin of *Staphylococcus Aureus*." *Microbiological Reviews* 55 (4): 733–51.
- Bhakdi, S., M. Muhly, and R. Füssle. 1984. "Correlation Between Toxin Binding and Hemolytic-Activity in Membrane Damage by Staphylococcal Alpha-Toxin." *Infection and Immunity* 46 (2): 318–23.
- Bradley, K. A., J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier, and J. a. T. Young. 2001. "Identification of the Cellular Receptor for Anthrax Toxin." *Nature* 414 (6860): 225–29. doi:10.1038/n35101999.
- Braha, O., L. Q. Gu, L. Zhou, X. F. Lu, S. Cheley, and H. Bayley. 2000. "Simultaneous Stochastic Sensing of Divalent Metal Ions." *Nature Biotechnology* 18 (9): 1005–7. doi:10.1038/79275.
- Brossier, F., M. Weber-Levy, M. Mock, and J. C. Sirard. 2000. "Role of Toxin Functional Domains in Anthrax Pathogenesis." *Infection and Immunity* 68 (4): 1781–86. doi:10.1128/IAI.68.4.1781-1786.2000.
- Bumba, Ladislav, Jiri Masin, Radovan Fiser, and Peter Sebo. 2010. "Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its β 2 Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps." *PLoS Pathog* 6 (5): e1000901. doi:10.1371/journal.ppat.1000901.
- Choe, S., Mj Bennett, G. Fujii, Pmg Curmi, Ka Kantardjieff, Rj Collier, and D. Eisenberg. 1992. "The Crystal-Structure of Diphtheria-Toxin." *Nature* 357 (6375): 216–22. doi:10.1038/357216a0.
- Collier, R. J. 1999. "Mechanism of Membrane Translocation by Anthrax Toxin: Insertion and Pore Formation by Protective Antigen." *Journal of Applied Microbiology* 87 (2): 283–283. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00889.x.
- Drum, C. L., S. Z. Yan, J. Bard, Y. Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, and W. J. Tang. 2002. "Structural Basis for the Activation of Anthrax Adenyl Cyclase Exotoxin by Calmodulin." *Nature* 415 (6870): 396–402. doi:10.1038/415396a.
- Eby, Joshua C., William P. Ciesla, Wendy Hamman, Gina M. Donato, Raymond J. Pickles, Erik L. Hewlett, and Wayne I. Lencer. 2010. "Selective Translocation of the Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10662–70. doi:10.1074/jbc.M109.089219.
- Falnes, Po, S. Choe, Ih Madshus, Ba Wilson, and S. Olsnes. 1994. "Inhibition of Membrane Translocation of Diphtheria-Toxin-a Fragment by Internal Disulfide Bridges." *Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8402–7.
- Fischer, Audrey, Matthew A. Holden, Brad L. Pentelute, and R. John Collier. 2011. "Ultrasensitive Detection of Protein Translocated through Toxin Pores in Droplet-Interface Bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40): 16577–81. doi:10.1073/pnas.1113074108.

- Galdiero, Stefania, Massimiliano Galdiero, and Carlo Pedone. 2007. "Beta-Barrel Membrane Bacterial Proteins: Structure, Function, Assembly and Interaction with Lipids." *Current Protein & Peptide Science* 8 (1): 63–82. doi:10.2174/138920307779941541.
- Garred, O., B. Vandeurs, and K. Sandvig. 1995. "Furin-Induced Cleavage and Activation of Shiga Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 270 (18): 10817–21.
- Gu, L. Q., O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley. 1999. "Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter." *Nature* 398 (6729): 686–90.
- Guermontprez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 2001. "The Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella Pertussis Binds to Target Cells via the alpha(M)beta(2) Integrin (CD11b/CD18)." *Journal of Experimental Medicine* 193 (9): 1035–44. doi:10.1084/jem.193.9.1035.
- Hall, Adam R., Andrew Scott, Dvir Rotem, Kunal K. Mehta, Hagan Bayley, and Cees Dekker. 2010. "Hybrid Pore Formation by Directed Insertion of Alpha-Haemolysin into Solid-State Nanopores." *Nature Nanotechnology* 5 (12): 874–77. doi:10.1038/NNANO.2010.237.
- Healy, Ken, Birgitta Schiedt, and Alan P. Morrison. 2007. "Solid-State Nanopore Technologies for Nanopore-Based DNA Analysis." *Nanomedicine* 2 (6): 875–97. doi:10.2217/17435889.2.6.875.
- Holmgren, J., I. Lonnroth, Je Mansson, and L. Svennerholm. 1975. "Interaction of Cholera Toxin and Membrane Gm1 Ganglioside of Small-Intestine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (7): 2520–24. doi:10.1073/pnas.72.7.2520.
- Howorka, S., S. Cheley, and H. Bayley. 2001. "Sequence-Specific Detection of Individual DNA Strands Using Engineered Nanopores." *Nature Biotechnology* 19 (7): 636–39. doi:10.1038/90236.
- Japrun, Deanpen, Marsiyana Henricus, Qihong Li, Giovanni Maglia, and Hagan Bayley. 2010. "Urea Facilitates the Translocation of Single-Stranded DNA and RNA Through the Alpha-Hemolysin Nanopore." *Biophysical Journal* 98 (9): 1856–63. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4333.
- Kasianowicz, J. J., E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. 1996. "Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13770–73. doi:10.1073/pnas.93.24.13770.
- Klimpel, Kr, Ss Molloy, G. Thomas, and Sh Leppla. 1992. "Anthrax Toxin Protective Antigen Is Activated by a Cell-Surface Protease with the Sequence Specificity and Catalytic Properties of Furin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10277–81. doi:10.1073/pnas.89.21.10277.
- Kumaran, Desigan, Subramaniam Eswaramoorthy, William Furey, Jorge Navaza, Martin Sax, and Subramanyam Swaminathan. 2009. "Domain Organization in Clostridium Botulinum Neurotoxin Type E Is Unique: Its Implication in Faster Translocation." *Journal of Molecular Biology* 386 (1): 233–45. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.027.
- Lacy, D. B., W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, and R. C. Stevens. 1998. "Crystal Structure of Botulinum Neuro-Toxin Type A and Implications for Toxicity." *Nature Structural Biology* 5 (10): 898–902. doi:10.1038/2338.
- Lanzrein, M., O. Sand, and S. Olsnes. 1996. "GPI-Anchored Diphtheria Toxin Receptor Allows Membrane Translocation of the Toxin without Detectable Ion Channel Activity." *Embo Journal* 15 (4): 725–34.
- Lindberg, Aa, Je Brown, N. Stromberg, M. Westlingryd, Je Schultz, and Ka Karlsson. 1987. "Identification of the Carbohydrate Receptor for Shiga Toxin Produced by Shigella-Dysenteriae Type-1." *Journal of Biological Chemistry* 262 (4): 1779–85.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. "Direct Pathway from Early/recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-Fragment Transport." *Journal of Cell Biology* 143 (4): 973–90. doi:10.1083/jcb.143.4.973.
- Movileanu, L., S. Howorka, O. Braha, and H. Bayley. 2000. "Detecting Protein Analytes That Modulate Transmembrane Movement of a Polymer Chain within a Single Protein Pore." *Nature Biotechnology* 18 (10): 1091–95.

- Naglich, Jg, Je Metherall, Dw Russell, and L. Eidels. 1992. "Expression Cloning of a Diphtheria-Toxin Receptor - Identity with a Heparin-Binding Egf-Like Growth-Factor Precursor." *Cell* 69 (6): 1051–61. doi:10.1016/0092-8674(92)90623-K.
- Noel, Romain, Neetu Gupta, Valerie Pons, Amelie Goudet, Maria Daniela Garcia-Castillo, Aurelien Michau, Jennifer Martinez, et al. 2013. "N-Methylidihydroquinazolinone Derivatives of Retro-2 with Enhanced Efficacy against Shiga Toxin." *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (8): 3404–13. doi:10.1021/jm4002346.
- Otero, As, Xb Yi, Mc Gray, G. Szabo, and El Hewlett. 1995. "Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 270 (17): 9695–97.
- Pannifer, A. D., T. Y. Wong, R. Schwarzenbacher, M. Renuis, C. Petosa, J. Bienkowska, D. B. Lacy, et al. 2001. "Crystal Structure of the Anthrax Lethal Factor." *Nature* 414 (6860): 229–33. doi:10.1038/n35101998.
- Petosa, C., R. J. Collier, K. R. Klimpel, S. H. Leppla, and R. C. Liddington. 1997. "Crystal Structure of the Anthrax Toxin Protective Antigen." *Nature* 385 (6619): 833–38. doi:10.1038/385833a0.
- Rogel, A., and E. Hanski. 1992. "Distinct Steps in the Penetration of Adenylate-Cyclase Toxin of Bordetella-Pertussis into Sheep Erythrocytes - Translocation of the Toxin Across the Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 267 (31): 22599–605.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, Pp Delaureto, Br Dasgupta, and C. Montecucco. 1992. "Tetanus and Botulinum-B Neurotoxins Block Neurotransmitter Release by Proteolytic Cleavage of Synaptobrevin." *Nature* 359 (6398): 832–35. doi:10.1038/359832a0.
- Silverman, Ja, Ja Mindell, H. Zhan, A. Finkelstein, and Rj Collier. 1994. "Structure-Function-Relationships in Diphtheria-Toxin Channels .1. Determining a Minimal Channel-Forming Domain." *Journal of Membrane Biology* 137 (1): 17–28.
- Song, L. Z., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. "Structure of Staphylococcal Alpha-Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore." *Science* 274 (5294): 1859–66. doi:10.1126/science.274.5294.1859.
- Thelestam, M., and L. Blomqvist. 1988. "Staphylococcal-Alpha Toxin - Recent Advances." *Toxicon* 26 (1): 51–65. doi:10.1016/0041-0101(88)90137-7.
- Thompson, John F., and John S. Oliver. 2012. "Mapping and Sequencing DNA Using Nanopores and Nanodetectors." *Electrophoresis* 33 (23): 3429–36. doi:10.1002/elps.201200136.
- Torgersen, M. L., S. U. Lauvrak, and K. Sandvig. 2005. "The A-Subunit of Surface-Bound Shiga Toxin Stimulates Clathrin-Dependent Uptake of the Toxin." *Febs Journal* 272 (16): 4103–13. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04835.x.
- Uribe, Kepa B., Aitor Etxebarria, Cesar Martin, and Helena Ostolaza. 2013. "Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain." *Plos One* 8 (6): e67648. doi:10.1371/journal.pone.0067648.
- Valeva, A., I. Walev, M. Pinkernell, B. Walker, H. Bayley, M. Palmer, and S. Bhakdi. 1997. "Transmembrane Beta-Barrel of Staphylococcal Alpha-Toxin Forms in Sensitive but Not in Resistant Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11607–11. doi:10.1073/pnas.94.21.11607.
- Veneziano, Remi, Claire Rossi, Alexandre Chenal, Jean-Marie Devoisselle, Daniel Ladant, and Joel Chopineau. 2013. "Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin Translocation across a Tethered Lipid Bilayer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20473–78. doi:10.1073/pnas.1312975110.
- Windschiegl, Barbara, Alexander Orth, Winfried Roemer, Ludwig Berland, Bahne Stechmann, Patricia Bassereau, Ludger Johannes, and Claudia Steinem. 2009. "Lipid Reorganization Induced by Shiga Toxin Clustering on Planar Membranes." *Plos One* 4 (7): e6238. doi:10.1371/journal.pone.0006238.
- Yu, Min, and David B. Haslam. 2005. "Shiga Toxin Is Transported from the Endoplasmic Reticulum Following Interaction with the Luminal Chaperone HEDJ/ERdj3." *Infection and Immunity* 73 (4): 2524–32. doi:10.1128/IAI.73.4.2524-2532.2005.

