



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Marcela Šišić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Mehanizam djelovanja toksina difterije i kolere

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. lipnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2019.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	9
1.1. Bakterijski toksini.....	9
1.1.1. Egzotoksini.....	10
1.1.2. Endotoksini.....	13
§ 2. TOKSIN DIFTERIJE.....	14
2.1. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	14
2.2. Struktura toksina difterije	16
2.3. Mehanizam djelovanja toksina	17
2.3.1. <i>Vežanje toksina difterije za specifični receptor.....</i>	<i>17</i>
2.3.2. <i>Translokacija domene C</i>	<i>21</i>
2.3.3. <i>Enzimatska aktivnost domene C.....</i>	<i>22</i>
§ 3. TOKSIN KOLERE.....	24
3.1. <i>Vibrio Cholerae</i>	24
3.2. Struktura toksina kolere	26
3.3. Mehanizam djelovanja toksina	28
3.3.1. <i>Vežanje toksina kolere za specifični receptor</i>	<i>28</i>
3.3.2. <i>Retrogradni transport u ER te translokacija preko ER membrane.....</i>	<i>31</i>
3.3.3. <i>Enzimatska aktivnost fragmenta A1</i>	<i>32</i>
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	XXXIII

§ Sažetak

Bakterijski toksini važni su čimbenici virulencije mnogih mikroorganizama i sam koncept da bakterijski toksini uzrokuju bolesti izuzetno je važan u razumijevanju i kontroli infektivnih bolesti. Najveću skupinu egzotoksina čine toksini AB koji pokazuju dvokomponentnu strukturu, s tim da podjedinica A (od engl. *active*) posjeduje biološku (toksičnu) aktivnost dok podjedinica B (od engl. *binding*) posreduje vezanje na specifične receptore na membrani stanice. Kako bi toksin AB došao do ciljne unutarstanične mete mora proći kroz staničnu membranu, jedan od načina je da toksin AB, nakon vezanja na specifični receptor na membrani stanice, pomoću endocitoze uđe u stanicu. Primjer takvog toksina je toksin difterije. Drugačiji način ulaska u stanicu koristi primjerice toksin kolere, ovaj toksin ovisi o retrogradnom transportu kako bi došao do endoplazmatskog retikuluma, a nakon toga slijedi translokacija u citosol. Iako toksini kolere i difterije upotrebljavaju različite načine internalizacije u stanicu, zajednički im je način djelovanja na unutarstaničnu metu. Aktivni fragmenti obaju toksina imaju ADP-ribozilacijsku aktivnost. Međutim, osim što su bakterijski toksini uzročnici mnogobrojnih bolesti, u zadnje su vrijeme poznati kao patogeni agensi s pozitivnim primjenama kao što su proučavanje mehanizma bolesti, ali i mehanizama nekih dosad neistraženih, staničnih procesa. Upotrebljavaju se i u razvoju lijekova, sintezi cjepiva i antibiotika.

§ 1. UVOD

1.1. Bakterijski toksini

Za izrazito visoku virulentnost određenih bakterijskih sojeva odgovorna je proizvodnja toksina koji izazivaju teške posljedice povezane s različitim bolestima. Općenita podjela bakterijskih toksina temeljena je na kemijskom sastavu i načinu djelovanja. S obzirom na to razlikujemo egzotoksine, koji se nalaze u bakterijskoj citoplazmi ili rjeđe u periplazmatskom prostoru koji se zatim ili izlučuju ili oslobađaju tijekom lize ili uništenja bakterijske stanice, i endotoksine, koji su dio stanične stijenke Gram-negativnih bakterija. Glavne razlike između endotoksina i egzotoksina očituju se u nekoliko svojstava koja su navedena u tablici 1.

Tablica 1. Usporedba glavnih svojstava endotoksina i egzotoksina

Svojstvo	Endotoksin	Egzotoksin
Vrsta bakterije koja ih proizvodi	Gram-negativne	Gram-pozitivne ili Gram-negativne
Lokacija u bakteriji	komponenta vanjske membrane stanične stijenke	sintetizira se u citoplazmi, a izlučuje se izvan bakterijske stanice
Sastav	lipopolisaharid	polipeptid
Toksičnost	relativno niska	visoka
Mogućnost priprave toksoida*	ne	da
Temperaturna stabilnost	stabilan i pri povišenju temperature	inaktivira se povišenjem temperature

* Toksoid je imunogenični pripravak dobiven inaktivacijom određenog toksina s pomoću formaldehida, joda i drugih kemijskih tvari. Ciljno je djelovanje toksoida induciranje proizvodnje specifičnih antitijela koja se vežu na određeni toksin i time ga neutraliziraju.

1.1.1. Egzotoksini

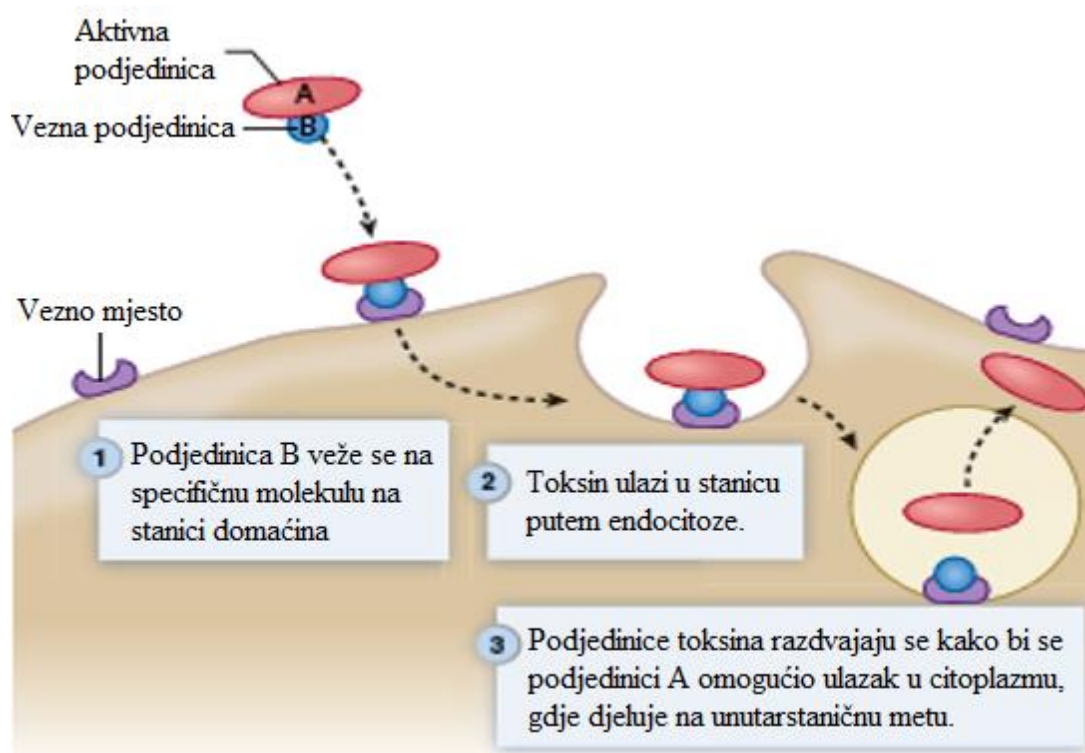
Mnogobrojni Gram-pozitivni i Gram-negativni patogeni stvaraju egzotoksine koji su po kemijskom sastavu polipeptidi, a njihovi geni često se nalaze na plazmidima ili se prenose s pomoću bakteriofaga (kao u slučaju toksina difterije i kolere). Općeniti mehanizam djelovanja bakterijskih egzotoksina obuhvaća njihovo vezanje na specifični receptor na staničnoj membrani podložne stanice, ulazak kroz staničnu membranu i na kraju interakciju s unutarstaničnom metom. Patogeneza mnogih bakterijskih infekcija započinje kolonizacijom površine tijela ili tkiva kako bi se proizvela dovoljna količina toksina, koji uzrokuju oštećenje. Egzotoksin napušta bakterijsku stanicu s pomoću specijaliziranih struktura koje se nazivaju sekrecijski sustavi ili se može otpustiti u okolnu tekućinu nakon lize bakterijske stanice. Neki sekrecijski sustavi izlučuju egzotoksine u izvanstanični prostor, dok ih drugi izlučuju izravno u stanicu domaćina. Međutim, ako egzotoksini nisu izravno izlučeni u stanicu domaćina, oni moraju ući u stanicu kako bi došli do specifične mete, bilo kao cjelovite molekule ili kao biološki aktivne podjedinice. Prije nego što mogu ući u stanicu moraju se vezati za specifične receptore na površini stanice domaćina, a kako bi se otklonio problem ulaska u stanicu, razvili su se različiti mehanizmi internalizacije. U nekim slučajevima postoje indikacije koje upućuju na endocitozu, dok kod drugih ulazak u stanicu podrazumijeva izravan prijenos kroz membranu. Nakon ulaska u stanicu mnogi bakterijski toksini djeluju na specifični supstrat, a sama priroda njihova djelovanja u većini je slučajeva enzimska.

Bakterijski egzotoksini ubrajaju se među najtoksičnije poznate supstancije čije smrtonosne doze za ljude mogu biti manje od 1 µg. Njihovo djelovanje može biti lokalno ili se mogu nositi krvotokom po cijelom tijelu uzrokujući sustavne učinke. Međutim, budući da su bakterijski egzotoksini po sastavu polipeptidi, oni su dobri antigeni, pa iniciraju odgovor imunološkog sustava koji zatim dovodi do sinteze antitijela. Protutijela nastala kao odgovor na egzotoksin nazivaju se antitoksini i primjenjuju se u prevenciji i liječenju bolesti kao što su primjerice tetanus ili botulizam. U prevenciji bolesti izazvanih egzotoksinima veliku ulogu igraju i toksoidi (imunogenični pripravci dobiveni inaktivacijom toksina s pomoću formaldehida, joda i drugih kemijskih tvari). Priprema toksoida uključuje uklanjanje toksičnog dijela molekule toksina i zadržavanje antigenskih epitopa, što znači da će toksoid inducirati proizvodnju specifičnih antitijela koja se poslije, ako se nađu u blizini toksina, odmah vežu na njega i neutraliziraju ga jer se toksin obložen antitijelima ne može vezati za stanicu, a zbog toga ne može ni ući u nju. Aktivna imunizacija jako je važna u borbi protiv bolesti uzrokovanih

egzotoksinima jer su mnogi egzotoksini toliko snažni da se fatalna oštećenja događaju prije nego što dođe do odgovarajućeg imunološkog odgovora.

Jedna od podjela egzotoksina zasniva se na mjestu djelovanja određenog egzotoksina, pa tako razlikujemo neurotoksine (oštećuju živčani sustav) od enterotoksina (uzrokuju simptome povezane s crijevnim poremećajima) i citotoksina (oštećuju različite tipove stanica i imaju mogućnost interferiranja s esencijalnim staničnim mehanizmima ili liziranjem stanica). No neki egzotoksini ne spadaju ni u jednu od navedenih skupina, već uzrokuju simptome povezane s pretjeranim i posljedično štetnim imunološkim odgovorom. Moguća je i podjela na tri glavne vrste s obzirom na strukturu toksina i opći mehanizam djelovanja, a to su: toksini AB, toksini koji oštećuju membranu stanice i superantigeni.

Mnogi egzotoksini pokazuju dvokomponentnu strukturu. S tim da podjedinica A (od engl. *active*) posjeduje biološku (toksičnu) aktivnost dok podjedinica B (od engl. *binding*) posreduje vezanje na specifične receptore na membrani stanice i zbog toga se nazivaju toksinima AB. Općeniti mehanizam djelovanja toksina AB prikazan je na slici 1.



Slika 1. Općeniti mehanizam djelovanja toksina AB. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: D. Anderson, S. Salm, D. Allen, *Nester's MICROBIOLOGY: A Human Perspective*, McGraw-Hill, New York, 2015, str. 428.

Glavni je cilj toksina AB modifikacija određenih supstrata unutar citosola stanica domaćina. Kako bi došao do citosola, a time i ciljnog supstrata, egzotoksin se prvo mora vezati na specifični receptor na površini stanice te zatim putem endocitoze ući u stanicu. Kako bi to bilo ostvarivo, egzotoksini sadrže, već spomenute, dvije funkcionalno različite podjedinice. Podjedinica B veže se na stanični receptor i posreduje unos enzimske aktivne podjedinice A u citosol, gdje podjedinica A modificira svoj specifični supstrat. Zbog jako velike selektivnosti prema određenim tipovima stanica i njihove specifičnosti za stanične molekule supstrata, toksini tipa AB mogu se uvelike razlikovati u pogledu sastava podjedinica i enzimske aktivnosti. Dakle, tri važna svojstva karakteriziraju način djelovanja bilo kojeg toksina AB, a to su: selektivnost, specifičnost i potentnost. Za sam unos bakterijskih toksina AB u citosol, potrebna je precizno usklađena serija sljedećih koraka: aktivacija toksina, vezanje na receptor, endocitoza posredovana receptorom, prijenos vezikula i translokacija podjedinice A iz vezikularnih odjeljaka u citosol. Poznato je da se mnogi bakterijski toksini, uključujući i toksin difterije (TD) i toksin kolere (TK), sintetiziraju u obliku inaktivnih, proenzimskih formi i moraju se proteolitički pocijepati kako bi se postigla potpuna biološka aktivnost toksina.² *In vivo*, proteaze domaćina koje se prirodno nalaze u gastrointestinalnom traktu vjerojatno aktiviraju ove egzotoksine. Poznatiiji egzotoksini koji su građeni na ovom principu primjerice su toksin difterije, toksin kolere, toksin tetanusa, toksin botulinum i enterotoksin bakterije *Escherichia coli*.³

Osim toksina koji modificiraju specifične supstratne molekule u citosolu, postoje i toksini koji napadaju staničnu membranu i time oštećuju stanice. Ti toksini mogu imati aktivnost fosfolipaze, odnosno oni ugrožavaju stanice tako što hidroliziraju membranske fosfolipide, što dovodi do slabljenja stanične membrane i konačno liziranja stanica. Osim enzimske hidrolize membranskih fosfolipida, stvaranje pora još je jedan učinkovit mehanizam kojim se koriste određeni egzotoksini da izravno oštete membranu stanice tako što omogućuju izlazak, tj. ulazak tvari i tekućina u stanicu i iz nje. Općeniti mehanizam toksina koji stvaraju pore je da se proteini prvo vežu na staničnu membranu kao monomeri, a prilikom stvaranja pora dolazi do oligomerizacije nekoliko amfifilnih i hidrofobnih α -zavojnica u N-terminalnoj regiji toksina što dovodi do smrti stanice.

Za razliku od prve dvije skupine, neki bakterijski toksini mogu stimulirati veliki udio T-limfocita putem interakcije s varijabilnom domenom β -lanca T-staničnog receptora (TCR-V β) i nazivaju se superantigeni (SAGs). Superantigeni su molekule slične proteinskim antigenima

koje proizvode različiti bakterijski patogeni, uključujući *S. aureus* i *S. pyogenes*. Prilično su jedinstveni u načinu djelovanja u odnosu na prethodno spomenute skupine egzotoksina. Superantigenski toksini tipično su lišeni enzimske aktivnosti i nisu internalizirani niti uklopljeni u membranu stanice domaćina. Oni uzrokuju štetne učinke na domaćinu hiperstimuliranjem imunološkog sustava putem interakcija s antigen-prezentirajućim stanicama i T-stanicama što može dovesti do smrtonosnog šoka zbog abnormalno visokih razina protuupalnih citokina.⁴

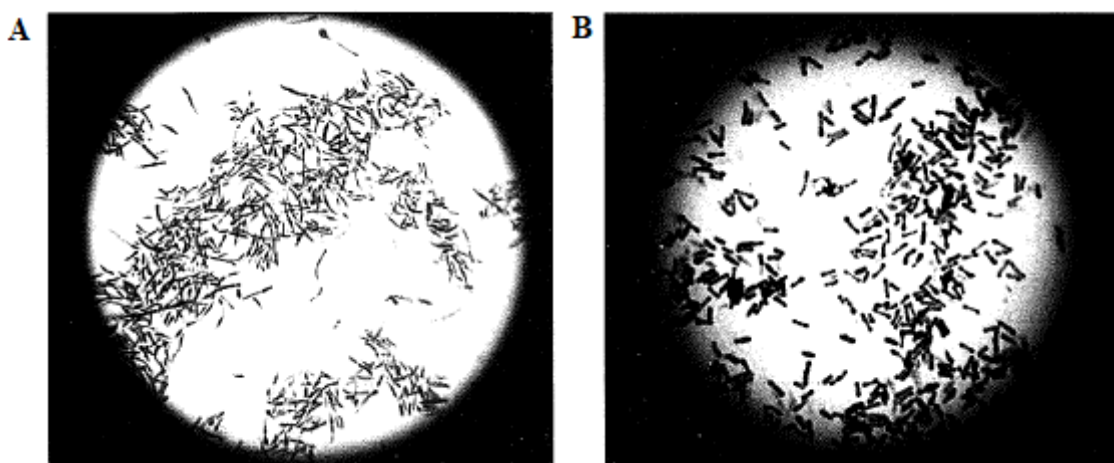
1.1.2. Endotoksini

Za razliku od egzotoksina, endotoksini su integralni dio stanične stijenke Gram-negativnih bakterija, a po sastavu su lipopolisaharidi (LPS). U mnogim je slučajevima otkriveno da se LPS sastoji od triju kovalentno vezanih područja: lipida A, oligosaharidne jezgre i O-specifičnog polisaharida. Oligosaharidna jezgra nalazi se na površini bakterijske stanice i istog je sastava za sve pripadnike nekog roda, dok se na nju nastavlja O-polisaharidni lanac koji je karakterističan za svaku bakterijsku vrstu, a često je karakterističan za pojedini soj unutar vrste i određuje serološke specifičnosti bakterijskog soja. Primjerice, LPS je vrlo važan antigen enterobakterija, a varijabilnost tog polisaharidnog lanca toliko je velika da se na primjer salmonele dijele na više od 2000 antigenih tipova. Toksični dio LPS-a čini lipid A. On je ujedno i najmanje varijabilan dio molekule LPS-a. Jednom kad se endotoksin oslobodi iz bakterijske stanice, molekule LPS-a mogu aktivirati urođenu i adaptivnu obranu različitim mehanizmima. Međutim, endotoksin se ne oslobađa samo pri raspadu bakterijske stanice, nego je za sve veći broj patogenih Gram-negativnih bakterija poznato da stvaraju i oslobađaju sa svoje površine vezikule načinjene od vanjske membrane.⁵

§ 2. TOKSIN DIFTERIJE

2.1. *Corynebacterium diphtheriae*

Rod *Corynebacterium* čine nepokretni, nesporogeni, nepravilni (pleomorfni), uglavnom aerobni Gram-pozitivni štapići, specifičnog mikroskopskog oblika. Najpoznatija je vrsta *Corynebacterium diphtheriae*, štapić zadebljanih krajeva, koji se nakon diobe ne razdvaja potpuno, nego se stanice zaokrenu naglim kratkim trzajem te sa susjednim štapićima poprimaju oblike slova X, Y i V, a u mikroskopskom preparatu slične razbacanim žigicama, što se vidi na slici 2.¹



Slika 2. *Corynebacterium diphtheriae* pod mikroskopom (uvećano 1000 puta) (A – bojen po Gramu, B – bojen po Lubinskom). Prikaz preuzet i prilagođen iz: S. Kalenić, i suradnici, *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 154.

Patogenost *C. diphtheriae* temelji se na dvije primarne determinante: sposobnost određenog soja da kolonizira sluznicu gornjeg dišnog sustava i/ili kožu i sposobnost da proizvede toksin difterije. Samo oni sojevi *C. diphtheriae* koje je lizirao specifičan corynebacteriophage beta sintetiziraju toksin difterije. Transkripcija ovog gena aktivira se nedostatkom željeza. Toksin koji proizvodi toksigeni soj *C. diphtheriae* spada u skupinu egzotoksina, a građen je po principu toksina AB. Podjedinica A ovog toksina katalizira prijenos adenzin-difosfat-ribozne jedinice nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) na dušik modificiranog histidinskog ostatka,

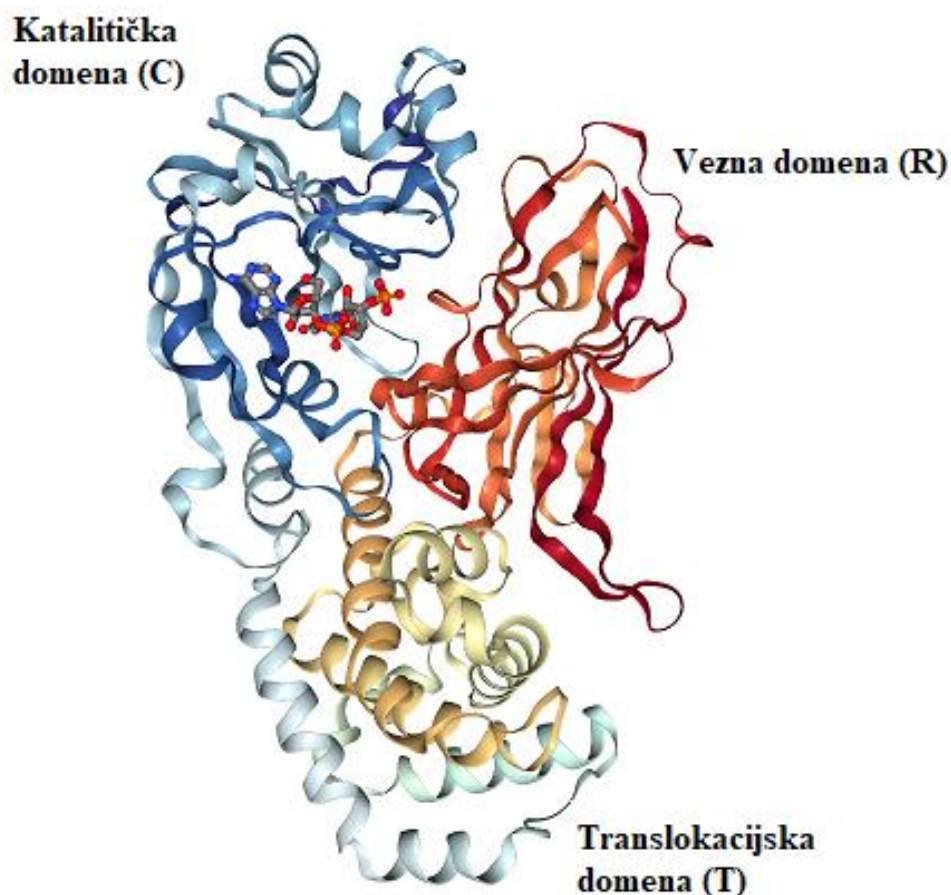
diftamida, eukariotskog elongacijskog faktora 2 (eEF-2) što uzrokuje njegovu inaktivaciju čime se inhibira translacija i samim se time uzrokuje smrt stanice. Netoksigeni sojevi *C. diphtheriae* mogu postati visoko virulentni nakon lizogene konverzije u toksigeni soj.

C. diphtheriae širi se kapljičnim putem, izlučevinama ili izravnim kontaktom, a u organizam ulazi putem sluznica, najčešće gornjeg dišnog sustava (nos, ždrijelo, grkljan), a rjeđe kroz oštećenu kožu. Na mjestu kolonizacije bakterija, zbog produkcije toksina difterije, dolazi do lokalne upalne reakcije i stvaranja karakterističnih sivo-zelenih pseudomembrana koje se sastoje od naslaga fibrina, bakterija, staničnog detritusa (nekrotične stanice, epitela, eritrociti) i upalnih stanica. Pseudomembrane se čvrsto drže uz podlogu, a katkad mogu biti toliko zadebljane da mehanički dovode do opstrukcije dišnog puta što rezultira gušenjem. Osim lokalno, toksin se može apsorbirati u krvotok što mu omogućuje oštećenje tkiva srca, živaca i bubrega. Toksin difterije (TD) je izvanredno snažan toksin. Za čovjeka je količina od 100 do 150 ng po kilogramu tjelesne težine smrtonosna. Bakterije *C. diphtheriae* osjetljive su na razne antibiotike, uključujući eritromicin i penicilin, ali takav tretman samo zaustavlja prijenos bolesti, odnosno nema utjecaja na toksin koji je već apsorbiran. U odgovoru domaćina na difteriju važna je imunost koja potječe od odgovora B–stanica koje proizvode antitijela, a kako je toksin difterije presudan čimbenik virulencije *C. diphtheriae*, imunost ponajprije ovisi o antitoksičnim protutijelima koja imaju sposobnost neutralizacije toksina. Difterija se liječi ubrizgavanjem antiseruma protiv TD-a pacijentu što je prije moguće, odnosno odmah nakon sumnje na bolest jer je toksin izrazito potentan. Čak i ako se liječe, otprilike 1 od 10 pacijenata s difterijom umre. Međutim, budući da je difterija rezultat proizvodnje toksina, a ne mikrobiološke invazije, može se učinkovito spriječiti imunizacijom s toksoidom. Toksoid, pripremljen formalinskim tretmanom difterijskog toksina, stimulira organizam da proizvodi antitijela koja specifično neutraliziraju toksin. Cjepivo koje se najčešće upotrebljava kao prevencija difterije je cjepivo DTaP, koje se sastoji od toksoida difterije i tetanusa zajedno s komponentama bakterije *Bordetella pertussis* (bakterija koja uzrokuje pertusis (hripavac)).

Međutim, čak i u odsustvu proizvodnje toksina, *C. diphtheriae* razvila je impresivnu sposobnost da izazove invazivne infekcije krvotoka. Patogeneza za infekcije uzrokovane netoksigenim sojevima *C. diphtheriae* ostaje nepoznata. Pretpostavlja se da je zbog velike učinkovitosti cjepiva protiv difterije u sprječavanju bolesti posredovane toksinom, *C. diphtheriae* morala eksprimirati ili razviti neke druge čimbenike virulencije.⁶

2.2. Struktura toksina difterije

Toksin difterije sintetizira se u obliku cjelovitog polipeptidnog lanca od 560 aminokiselina. Nakon lučenja preko plazma membrane uklanja se signalni peptid od 25 aminokiselina što rezultira proteinskim toksinom od 535 aminokiselina (Slika 3.).



Slika 3. Kristalna struktura toksina difterije s prikazom različitih domena na rezoluciji od 1,55 Å. U aktivnom mjestu domene C nalazi se dinukleotid ApUp, koji je analog NAD⁺-a, a može se naći u aktivnom mjestu domene C ovisno o uvjetima pripreme toksina, no on je zapravo inhibitor toksina difterije. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema <https://www.rcsb.org/3d-view/1FOL> (datum pristupa: 21. svibnja 2019.)

Toksin je organiziran u tri strukturne domene ekvivalentnih veličina i to tako da su od N-kraja do C-kraja poredane sljedećim redoslijedom: katalitička (C), translokacijska ili transmembranska (T) i vezna domena (R). Domena C odgovara podjedinici A, a domene T i R odgovaraju podjedinici B prema klasičnom nazivu koji se upotrebljava za bakterijske toksine s intracelularnim metama. Domena C sadržava sedam kratkih α -zavojnica koje okružuju dvije β -

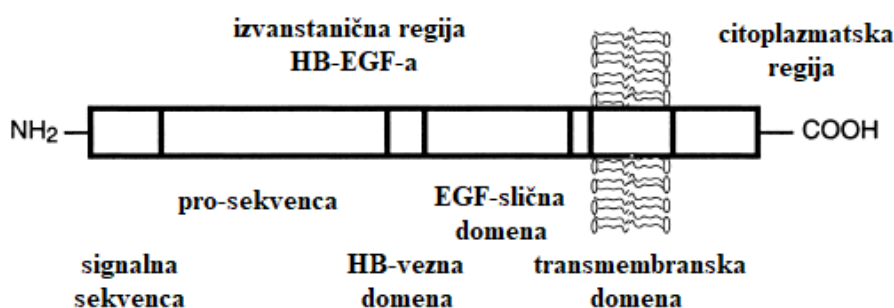
nabrane ploče od pet lanaca i tri lanca. Vidljivo je da domena R blokira aktivno mjesto za supstrat eukariotskog faktora elongacije 2 (eEF-2), što objašnjava zašto se podjedinica A mora odvojiti od podjedinice B za njegovu ekspresiju aktivnosti. Disulfidni most Cys186-Cys201 povezuje C-kraj domene C s N-krajem domene T. Domena T organizirana je kao snop od deset α -zavojnica. Domena R ima spljoštenu topologiju β -bačvi koja sadržava jedanaest lanaca. Drugi disulfidni most TD-a, koji povezuje Cys461 i Cys471, nalazi se unutar domene R.⁵⁻⁷

2.3. Mehanizam djelovanja toksina

Intoksikacija jedne eukariotske stanice s pomoću toksina difterije uključuje nekoliko različitih koraka: (1) vezanje toksina na specifični receptor na površini stanice, (2) proteolitička aktivacija TD-a, (3) internalizacija putem kltrin-posredovane endocitoze, (4) umetanjem transmembranske domene u membranu i dostava katalitičke domene u citosol, (5) ADP-ribosilacija eukariotskog faktora elongacije 2 (eEF-2), što rezultira ireverzibilnom inhibicijom sinteze proteina.

2.3.1. Vezanje toksina difterije za specifični receptor

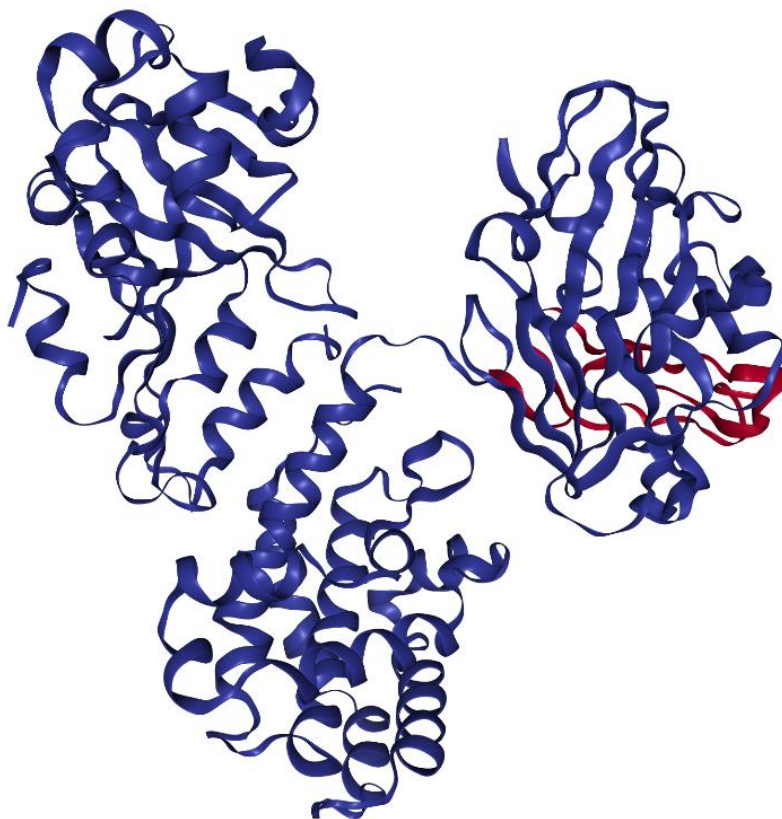
Receptor za TD membranski je prekursorski oblik faktora rasta koji je analogan epidermalnom faktoru rasta (EGF) i koji može vezati heparin, te je stoga poznat kao proHB-EGF. Ovaj transmembranski glikoprotein od 187 aminokiselinskih ostataka prirodno se cijepa kako bi se oslobodio HB-EGF.



Slika. 4. Shematski prikaz molekule proHB-EGF-a. Ilustracija preuzeta i prilagođena prema: A. Chenal, P. Nizard, D. Gillet, *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **21** (2002) 321–359.

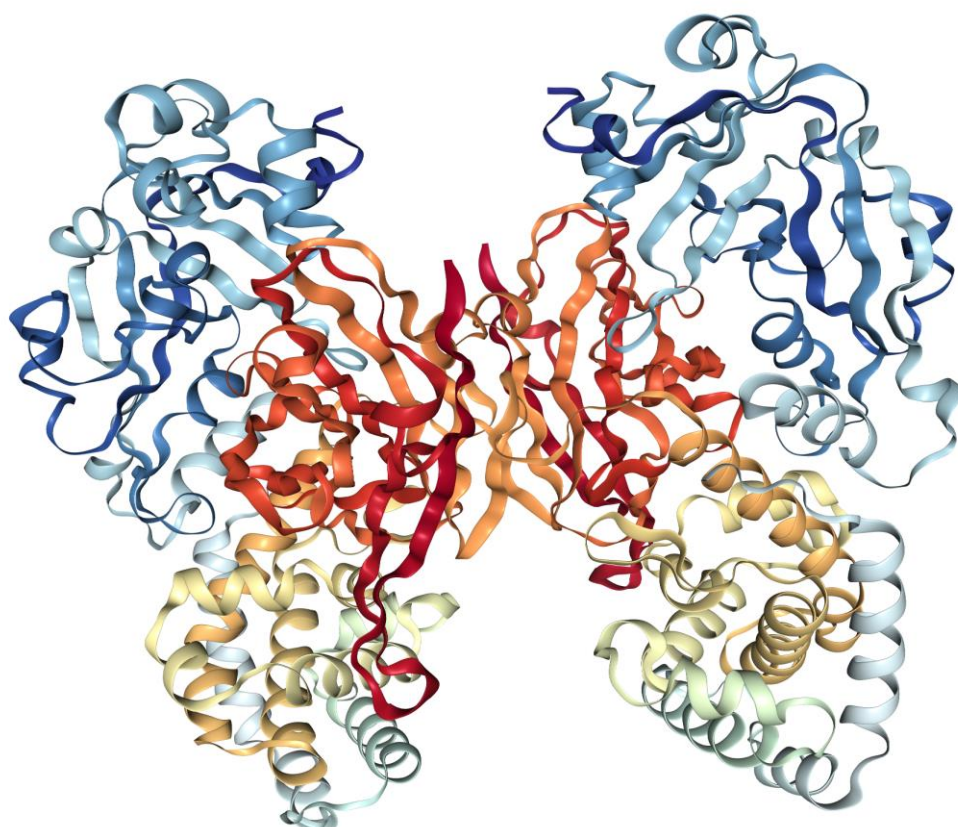
Od izvanstaničnog N-kraja do unutarstaničnog C-kraja cjelokupna molekula proHB-EGF-a (slika 4.) obuhvaća: signalnu sekvencu (aminokiselinski ostaci 1 – 22), prosekvencu (aminokiselinski ostaci 23 – 91), domenu za vezanje heparina (aminokiselinski ostaci 92 – 105),

domenu sličnu EGF-u (aminokiselinski ostaci 106 – 145), kratku poveznicu (engl. *linker*) (aminokiselinski ostaci 146 – 160), transmembransku domenu (aminokiselinski ostaci 161 – 183) i citoplazmatsku regiju (aminokiselinski ostaci 184 – 208). Ljudski i slični proHB-EGF-i vežu domenu R TD-a s pomoću domena sličnih EGF-u. Za ostatke Phe115, Leu127, posebno Glu141 i u manjoj mjeri Lys122, Ala129, Ile133 i His135, pokazalo se da su uključeni u prepoznavanje TD-a. Kod vrsta osjetljivih na TD (uključujući ljude, majmune, svinje i zečeve) stanične linije iz većine tkiva osjetljive su na toksin, što upućuje na prisutnost receptora na površini stanica. Međutim, razina ekspresije HB-EGF-a u danom tkivu može izrazito varirati u skladu s fiziološkim stanjem tog tkiva. Površinski marker CD9 djeluje kao koreceptor za TD. CD9 pripada obitelji tetraspanina koji karakteriziraju četiri transmembranske zavojnice, dvije izvanstanične i tri unutarstanične domene. CD9 ne utječe izravno na TD, nego, umjesto toga, njegova glavna izvanstanična domena interagira s proHB-EGF-om, čime se povećava afinitet proHB-EGF-a za domenu R TD-a. Vežanje TD-a na proHB-EGF omogućeno je velikom konformacijskom promjenom strukture toksina iz native (zatvorene) konformacije do otvorene konformacije (slika 5.).



Slika 5. Prikaz strukture otvorene konformacije TD-a nakon vezanja za proHB-EGF. Plavom je bojom označen TD, a crvenom je bojom označen proHB-EGF. Ilustracija je preuzeta s: <https://www.rcsb.org/3d-view/1XDT> (datum pristupa: 21. svibnja 2019.)

Domena R u početku je u bliskom kontaktu s domenama C i T, a zatim se zakreće za 180° oko prirodnog okreta (formiranog ostacima 379 – 386) koji premošćuje domene T i R. Zbog toga je domena R postavljena daleko od domena C i T te se time izlaže prethodno nedostupno aktivno mjesto. Pretpostavlja se da otvorena konformacija omogućuje interakciju domene T s membranom, jer domena R ostaje vezana za proHB-EGF kada toksin dosegne niski pH endosoma. U nekim uvjetima TD može formirati netoksične dimere (slika 6.) tako što dva TD-a u otvorenom obliku asociraju. Domene R svake molekule TD-a međudjeluju s domenama C i T druge molekule na isti način kao u zatvorenom monomeru.



Slika 6. Prikaz strukture dimerne molekule TD-a. Ilustracija preuzeta s: <http://www.rcsb.org/3d-view/1SGK> (datum pristupa: 22. svibnja 2019.)

Petlja od 14 aminokiselinskih ostataka koja povezuje domenu C i domenu T mora se pocijepati da bi se aktivirao TD. Tijekom procesa intoksikacije ovo cijepanje postiže se furinima, proteazama vezanim na ljudsku staničnu membranu. Ostale stanične proteaze također mogu aktivirati TD. Cijepanje se odvija između Arg193 i Ser194. To je i potvrđeno spoznajom da se izmjenom Arg193 nekim drugim aminokiselinskim ostatkom blokira cijepanje, a time i toksičnost. Stanice s nedostatkom furina slabo su osjetljive na TD, osim ako se toksin prethodno ne aktivira tripsinom. Jednom odcijepljen, C-kraj domene C ostaje vezan na N-kraj domene T s pomoću disulfidnog mosta Cys186-Cys201, što je neophodno za aktivnost toksina. Redukcija ovog disulfidnog mosta rezultira odvajanjem domene C od domena T i R, a time uzrokuje i gubitak toksičnosti. Redukcija ovog disulfida, koja je neophodna za oslobađanje domene C u

citostolu stanice, mora se dogoditi u kasnom stadiju procesa intoksikacije, vjerojatno za vrijeme ili nakon translokacije domene C preko membrane endosoma.

Kompleksi TD-proHB-EGF-a internaliziraju se u vezikule koje su obložene klatrinom i ulaze u endosomalni put. Nakon toga TD se prenosi preko endocitnih vezikula u kasne endosome i konačno u lizosome gdje se razgrađuje. Nizak pH koji je karakterističan za endosome (pH oko 5,3) aktivira interakciju domene T s membranom odjeljka i inicira translokaciju domene C preko ove membrane. Domena C najučinkovitije se prenosi iz ranih endosoma u područja bogata β -COP-om. β -COP je koatomerski protein koji sudjeluje u formiranju endocitnih nosivih vezikula koji prometuju od ranih do kasnih endosoma. Međutim, neće sve internalizirane molekule TD-a translocirati njihovu domenu C, ali translokacija samo jedne domene C u citoplazmu dovoljna je da uzrokuje smrt stanice.^{8,10}

2.3.2. Translokacija domene C

Domena T omogućava prodiranje domene C u membranu endosoma pri niskom pH i to je ujedno prvi korak translokacije domene C u citoplazmu. Kako bi se to omogućilo, domena T prolazi kroz niz konformacijskih promjena. Konformacijske promjene domene T omogućavaju vezanje za membranu a naposljetku i umetanje u membranu što uzrokuje formiranje selektivnog naponskog kanala za monovalentni kation u fosfolipidnim membranama ili staničnim plazma membranama. Umetanje domene T također uzrokuje destabilizaciju membrane i permeabilizaciju lipidnih vezikula.

Pri bazičnom pH, struktura domene T tvori snop od 10 α -zavojnica (numeriranih TH1 do TH9) i jedne kratke α -zavojnice (TH5' koja slijedi nakon TH5). Ove zavojnice raspoređene su u tri sloja, od toga TH8 i TH9 tvore visoko hidrofobnu okosnicu. Ove dvije α -zavojnice spojene su i skrivene duboko u unutrašnjosti između dvaju slojeva ampifatskih α -zavojnica (TH1-TH4 i TH5-TH7). Interakcija domene T s membranom endosoma potaknuta je niskim pH-om (oko 5,3) koji se nalazi u endosomu. Kiseli pH uzrokuje protoniranje šest histidinskih ostataka raspoređenih po domeni T na ključnim pozicijama na okretima i na dodirnim površinama između triju slojeva α -zavojnica. Njihovo protoniranje uzrokuje djelomično odmotavanje domene T što uzrokuje izlaganje hidrofobnih regija, a kao posljedica toga, domena T sklonija je vezanju i prodiranju u fosfolipidni dvosloj, što proizlazi iz kombinacije hidrofobnih učinaka i pomaka u elektrostatičkoj ravnoteži domene. Domena T nosi 23 kisela i 13 baznih aminokiselinskih ostataka, uglavnom na vanjskoj strani α -zavojnica TH1-TH4 i TH5-TH7.

Neutralizacija Glu i Asp ostataka protoniranjem, zbog kiselosti endosoma, sprječava odbijanje od negativno nabijenih fosfolipidnih polarnih skupina. Preostali pozitivno nabijeni Lys i Arg stvaraju privlačne elektrostatske interakcije s nabijenim fosfolipidnim skupinama, što dodatno potiče prodiranje domene T u membranu.

Kako se pH smanjuje od 7 do 4, domena C također ima tendenciju djelomično se razmotati te se vezati i prodrijeti u fosfolipidne dvosloje. Međutim, strukturne promjene domene C javljaju se pri nižim pH vrijednostima te ona ima manji afinitet za promjenu konformacije i prodiranje u membranu u usporedbi s domenom T. Uloga je domene T pomoći domeni C u tim prijelazima tako što domena T stabilizira djelomično razmotanu strukturu domene C. Osim toga, dodirne površine između dviju domena znatno smanjuju izlaganje domene C lipidima. Kao posljedica toga, domena C može prodrijeti duboko u membranu pri endosomalnom pH i to naposljetku omogućuje translokaciju u citosol.

Domena R nije potrebna za translokaciju i može se zamijeniti mnogim drugim domenama za vezanje receptora kao što su peptidni ligandi ili citokini. Nasuprot tome, za translokaciju domene C potrebna je intaktna domena T. Kao što je ranije spomenuto, domena C mora se djelomično razmotati kako bi prošla kroz membranu. Translokacija započinje na C-kraju domene C. Disulfidna veza Cys186-Cys201 koja povezuje domene C i T reducira se na citoplazmatskoj strani membrane u ranoj fazi procesa translokacije, prije nego što se domena C potpuno translocira. Nakon što stanica internalizira TD, translokacija domene C preko membrane endosoma ovisi o prisutnosti citoplazmatskih faktora, uključujući β -COP, adenzin trifosfat (ATP), šaperone (Hsp90) i tioredoksin-reduktazu. Kao što je prethodno navedeno, β -COP sudjeluje u formiranju vezikula od ranih do kasnih endosoma. ATP bi mogao biti potreban za održavanje niske pH vrijednosti u endosomima, ali je također potreban za aktivnost Hsp90. Vrlo je vjerojatno da Hsp90, citoplazmatski šaperon, pomaže u ponovnom smatanju domene C nakon njezine translokacije. Hsp90 također može pomoći i pri oslobađanju domene C iz membrane, dok je tioredoksin-reduktaza uključena u redukciju disulfidne veze Cys186-Cys201.¹⁰

2.3.3. Enzimatska aktivnost domene C

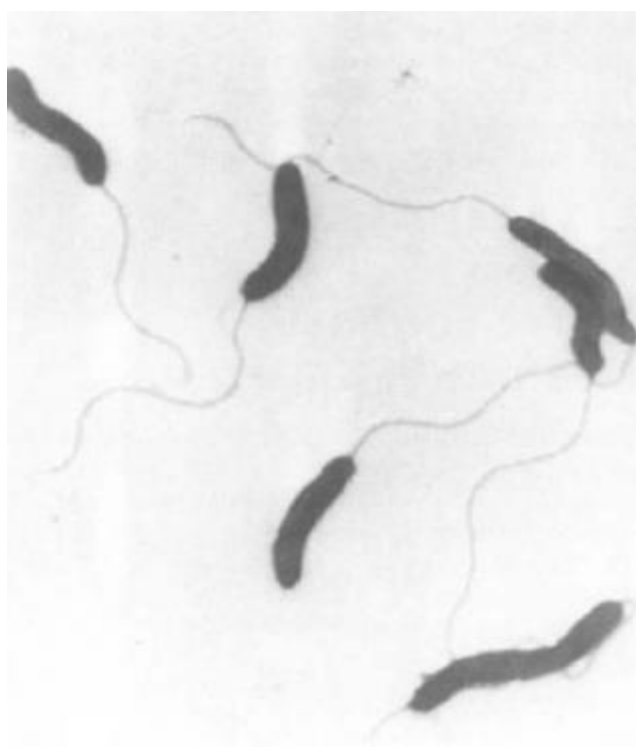
Kad se jednom dostavi u citosol, domena C ponovno se smota u enzimski aktivnu konformaciju i katalizira prijenos ADP-riboze s NAD^+ na svoj supstrat, eukariotski faktor elongacije 2 (eEF-2), čime se inhibira sinteza staničnih proteina. Nakon prestanka sinteze proteina,

pogođena će stanica u konačnici umrijeti uslijed apoptoze. Iz struktura toksina vidi se da domena R onemogućava pristup eukariotskom elongacijskom faktoru 2 (eEF-2) aktivnom mjestu domene C. Međutim, ovo je mjesto dostupno kosupstratu NAD^+ -u. Aktivno mjesto domene C nalazi se u rascjepu koji čine tri β -lanca (nazvana CB2, CB3, CB7), α -zavojnica (CH3) i petlja (CL2). U ovom rascjepu His21 i Tyr65 uključeni su u vezivanje NAD^+ -a, a reakcija se odvija uz uzastopno vezivanje prvo NAD^+ -a, a zatim eukariotskom elongacijskom faktoru 2 (eEF-2). Petlja CL2 (aminokiselinski ostaci 34 – 52), koja inače pokriva aktivno mjesto, nakon vezanja NAD^+ -a pomiče se i tako omogućava vezanje eukariotskog elongacijskog faktora 2 (eEF-2). ADP-ribozilirani ostatak eukariotskog elongacijskog faktora 2 (eEF-2) je diftamid (2-(karboksiamido-trimetilamonio-propil)-histidin), a to je histidinski ostatak koji je posttranslacijski modificiran. Ključno je to da je ADP-ribozilacija eEF-2 nepovratna reakcija, odnosno ne može se ukloniti ni jednim endogenim mehanizmom u stanici.

§ 3. TOKSIN KOLERE

3.1. *Vibrio Cholerae*

Vibrioni su Gram-negativne, asporogene, štapićaste bakterije koje su često blago zakrivljene. Izrazito su pokretni zbog jednog biča ili više njih smještenih na jednom polu. Klinički najznačajnija vrsta je *Vibrio cholerae* koja je Gram-negativan aerobni ili fakultativno anaerobni bacil (slika 7.) koji varira u veličini (od 1 – 3 μm u duljinu i 0,5 – 0,8 μm u promjeru).



Slika 7. *V. cholerae*, mikroskopski preparat. Preuzeto iz: A. A. Weil, J. B. Harris, *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, str. 1079–1098.

Iako je identificirano više od 200 serogrupa *V. cholerae*, epidemije kolere uzrokuju sojevi *V. cholerae* serogrupa O1 i O139. Serogrupa O1 dalje je klasificirana u sub-serotipove Inaba i Ogawa (i nestabilni serotip nazvan Hikojima) na osnovi O-metilacije O-antigena. Serogrupa O1 također se klasificira u klasične i El Tor biotipove na temelju fenotipskih i genetskih markera. Samo *V. cholerae* koja izlučuje toksin kolere može uzrokovati epidemiju. Geni za

toksin kolere kodirani su filamentoznim bakteriofagom, koji se neznatno razlikuje od klasičnih biotipova i biotipova El Tor. Ostali sojevi *V. cholerae* ne proizvode toksin kolere, ali se po biokemijskim svojstvima ne razlikuju od uzročnika kolere. Oni mogu izazvati izolirane slučajeve običnog, blagog gastroenteritisa.

Kao i toksin difterije, toksin kolere (TK) također posjeduje ADP-ribozilacijsku aktivnost i spada u skupinu toksina AB, točnije TK je toksin AB₅. Uz navedenu podjelu, TK spada u skupinu enterotoksina. TK je kodiran bakteriofagom, a sama sinteza i toksina i pilija regulirana je istim bakterijskim genomom, što bi značilo da su dva čimbenika odgovorna za virulentnost sintetizirana u isto vrijeme.

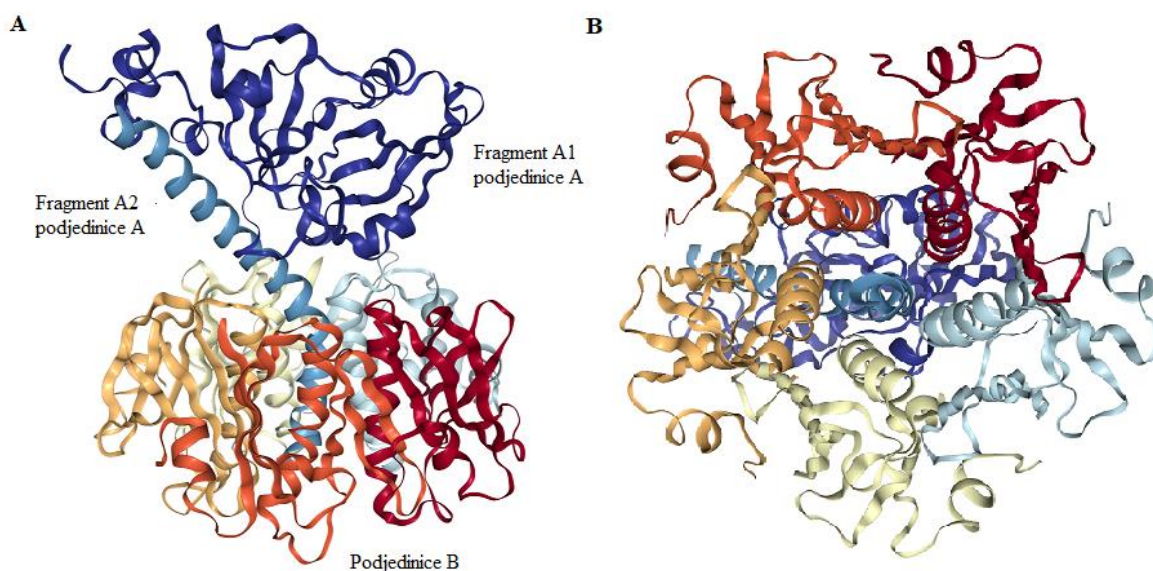
V. cholerae se u probavni sustav unosi kontaminiranom vodom i hranom, najčešće morskog podrijetla. Međutim, ove su bakterije izrazito osjetljive na nizak pH, stoga se mora unijeti velik broj ovih bakterije prije nego što dovoljan broj preživi prolazak kroz želudac kako bi nastupila infekcija. Jednom kad dospiju u tanko crijevo, preživjele bakterije prijanjaju na epitel tankog crijeva uporabom pilija i drugih površinskih proteina. Zatim se bakterije razmnožavaju na epitelnim stanicama bez vidljiva oštećenja. Najvažniji faktor kolonizacije su engl. *toxin-coregulated* pili (TCP), nitaste strukture koje pripadaju podvrsti pilija tipa IVb. TCP je promjera 8 nm i dužine 1–4 μm, a sastoji se od tisuća kopija isprepletenih podjedinica TcpA koje se protežu od stanične stijenke i izravno se vežu na receptore na sluznici. Kolonizirani toksigeni sojevi *V. cholerae* proizvode toksin kolere koji aktivira ionske transportne kanale u membrani epitelnih stanica čime uzrokuje da kloridi i drugi elektroliti izađu iz stanice. Voda slijedi elektrolite, što rezultira izlivanjem tekućine i soli u crijevni lumen. Iako toksin ne utječe na debelo crijevo, količina tekućine prevelika je da bi se apsorbirala uzrokujući dijareju koja rezultira teškom dehidracijom. Kontrola kolere u velikoj mjeri ovisi o adekvatnoj sanitaciji, sigurnoj isporuci čiste vode i hrani koja je dobro termički obrađena. Među specifične preventivne mjere ubraja se cijepljenje. Dobro cjepivo još nije razvijeno. Krajem 19. stoljeća proizvedeno je prvo cjepivo za parenteralnu primjenu, no ne preporučuje se zbog svoje ograničene djelotvornosti i kratkotrajne zaštite. Razvijena su i nova cjepiva za peroralnu primjenu sa zadovoljavajućim imunogenim i sigurnosnim svojstvima. Prvo od njih je monovalentno cjepivo koje se sastoji od formalinom inaktiviranog i toplinski inaktiviranog soja O1 i rekombinantne podjedinice B toksina kolere, dok su druga dva dvovalentna cjepiva koja sadržavaju inaktivirane sojeve O1 i O139, ali ne sadržavaju podjedinicu B toksina.

Lipopolisaharid (LPS) *V. cholerae* doprinosi virulenciji putem adherencije crijeva, kolonizacije, aktivnosti endotoksina, formiranja biofilma i kao receptor za bakteriofage.

Novija istraživanja TK-a pokazuju da je podjedinica B obećavajuće, imunomodulirajuće i protuupalno sredstvo bez toksičnosti povezane s podjedinicom A. Nedavno je otkriveno da rekombinantna podjedinica B TK-a suprimira imunopatološke reakcije u alergijskim i autoimunim bolestima, da stimulira humoralnu imunost i inducira protuupalne odgovore i da ima mogućnost ublažiti intestinalnu upalu Crohnove bolesti u miševa i ljudi.¹¹

3.2. Struktura toksina kolere

Toksin kolere heteroheksamerni je kompleks AB₅ (Mr = 85,620), što upućuje na to da se sastoji od jedne podjedinice A i pet podjedinica B raspoređenih u prsten (slika 8.). Nakon otpuštanja iz *V. cholerae*, TK se kooperativno veže preko svojih pentamernih podjedinica B na gangliozide GM1 izložene na luminalnoj površini crijevnih epitelnih stanica.



Slika 8. Struktura toksina kolere (TK) izolirana iz *Vibrio cholerae* (serotip O1). Na oba su prikaza zasebni polipeptidni lanci prikazani različitim bojama – tamnoplava boja prikazuje fragment A2, svjetlija plava boja prikazuje fragment A1, a ostali lanci pripadaju podjedinicama B. Na slici A struktura TK-a prikazana je sa strane, dok je na slici B struktura TK-a prikazana odozdo kako bi se uvidjela raspodjela podjedinica B. Preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.rcsb.org/3d-view/1XTC> (datum pristupa: 2. lipnja 2019.)

Podjedinice B polipeptidni su lanci koji su građeni od 124 aminokiselinskih ostataka. S tim da se 21 aminokiselinski ostatak s N-kraja odcijepi nakon ulaska u bakterijsku periplazmu, što znači da se zrele podjedinice B sastoje od 103 aminokiselinskih ostataka. Podjedinice B TK-a tvore visoko stabilan pentamer s gotovo savršenom petostrukom simetrijom. Središnja cilindrična pora obložena je s pet amfipatskih α -zavojnica koje su uključene u stabilizaciju pentamera. Nastala pentamerna struktura ima dvije različite strane, jednu hrapavu stranu koja posjeduje primarna mjesta vezanja receptora (pentamer sadržava pet ekvivalentnih GM1 veznih mjesta) i drugu ravnu površinu koja je okrenuta prema katalitičkoj podjedinici A. Kroz pentamer podjedinica B raspodjela je naboja visokoasimetrična, pri čemu je većina nabijenih ostataka lokalizirana ili prema podjedinici A ili u središnjoj pori. Svaka podjedinica B sastoji se od dvije antiparalelne β -ploče, od kojih svaka ima po tri lanca okružena jednom dugom i jednom kratkom α -zavojnicom. Za snažnu asocijaciju između podjedinica B odgovoran je veliki broj vodikovih veza i solnih mostova koji se stvaraju između susjednih podjedinica B.

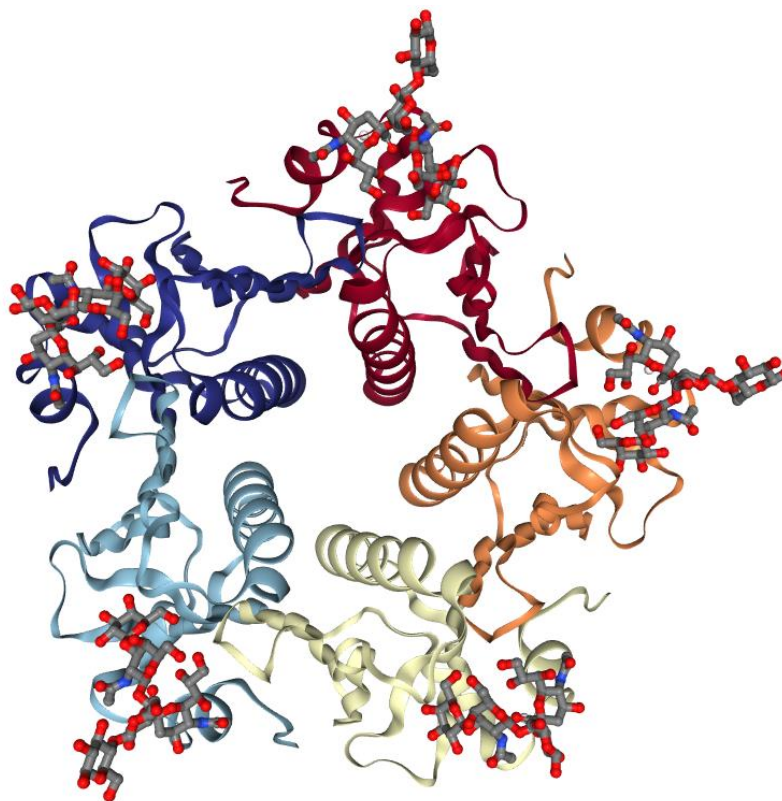
Podjedinica A bez signalne sekvence sadržava 240 aminokiselinskih ostataka. Podjedinica A nakon uklanjanja signalne sekvence još se cijepa proteazama te nastaju fragmenti A1 (aminokiselinski ostaci 1 – 192) i A2 (aminokiselinski ostaci 193 – 240), no ti fragmenti ostaju povezani disulfidnom vezom između Cys187 i Cys199 sve dok podjedinica ne uđe u stanicu domaćina gdje onda slijedi potpuna aktivacija redukcijom te disulfidne veze. Međutim, redukcija te disulfidne veze ne uzrokuje promjenu strukture jer se fragmenti A1 i A2 zajedno drže izrazito jakim nekovalentnim interakcijama, od kojih su najvažnije hidrofobne interakcije. Internalizirani fragment A1 veže NAD^+ i katalizira ADP-ribozilaciju $G_{s\alpha}$, GTP-vezujućeg regulatornog proteina koji interagira s adenilat-ciklazom. Fragment A1 posjeduje relaksiranu strukturu s dvije globularne domene, koje okružuju aktivno mjesto koje sadržava katalitički ostatak Glu112. Pokazalo se da vezanje ADP-ribozilačkog faktora (ARF) izaziva izrazite konformacijske promjene što omogućuje vezanje NAD^+ -a i izlaže aktivno mjesto fragmenta A1, čime se potiče prepoznavanje ciljnog proteina $G_{s\alpha}$. Za razliku od fragmenta A1, fragment A2 sastoji se od duge zavojnice, koja ide od fragmenta A1 do podjedinica B, točnije ulazi u poru između podjedinica B. Njegova interakcija s pentamerom podjedinica B u velikoj je mjeri polarna; dominiraju nekovalentne, interakcije posredovane molekulama vode kao i brojni solni mostovi iako su važne i hidrofobne interakcije. Na samom vrhu fragmenta A2, koji je usmjeren prema membrani, nalazi se sekvenca KDEL (-Lys-Asp-Glu-Leu-COOH), koja pomaže u transportu toksina u endoplazmatski retikulum (ER) nakon internalizacije.¹²

3.3. Mehanizam djelovanja toksina

Vezivanje receptora potiče se internalizacija toksina, a nakon retrogradnog transporta i aktivacije proteolitičkim cijepanjem te redukcije disulfidne veze, fragment A1 oslobađa se u citosol stanice domaćina. Toksični učinak dolazi od fragmenta A1 koji aktivira adenilat-ciklazu tako što fragment A1 katalizira ADP-ribozilaciju α podjedinice heterotrimernog GTP-vezujućeg proteina G_s koja nakon aktivacije disocira od podjedinica β i γ što aktivira adenilat-ciklazu. Trajna aktivacija adenilat-ciklaze uzrokuje prekomjernu proizvodnju sekundarnog glasnika cAMP-a što na uzrokuje otvaranje ionskih kanala.

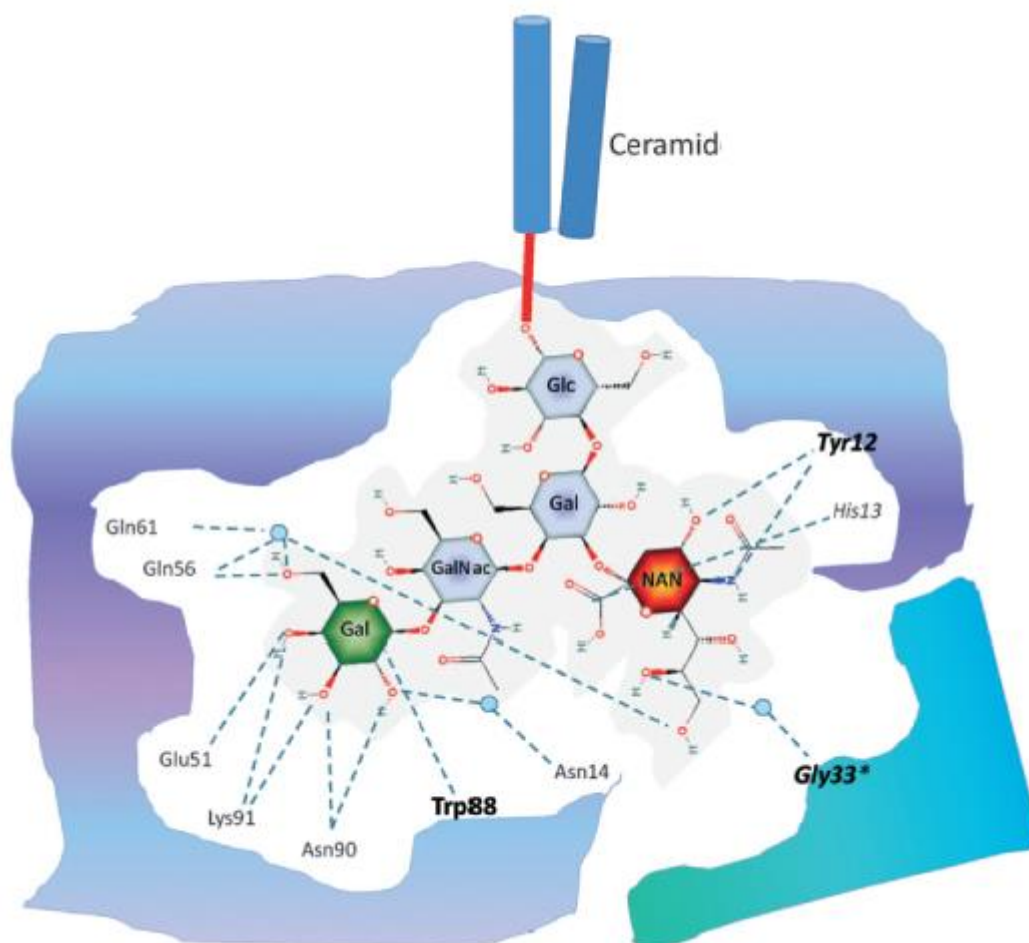
3.3.1. Vezanje toksina kolere za specifični receptor

Kada dospije u crijevni lumen, TK inicira svoje toksično djelovanje na stanice vezanjem podjedinice B visokim afinitetom i izuzetnom specifičnošću na stanične membranske receptore (slika 9.). Primarni je receptor TK-a ganglioizid GM1 na epitelu tankog crijeva. Ganglioizid GM1 koncentriran je u lipidnim mikrodomenama zvanim lipidni otoci koji su obogaćeni sfingomijelinom i kolesterolom te su povezani sa specifičnim proteinima kao što su aktin i flotilin. Podjedinica B sastoji se od visoko stabilizirane prstenaste strukture koja sadrži pet veznih mjesta koja pokazuju kooperativnost.



Slika 9. Podjedinica B toksina kolere vezana na pentasaharid GM1 prikazana od dolje. Slika preuzeta i prilagođena s: <https://www.rcsb.org/3d-view/3CHB> (datum pristupa: 10. lipnja 2019.)

Međutim, pokazalo se da je vezanje samo jednog gangliozida GM1 na jednu podjedinicu B dostatno za induciranje toksičnosti. Definirani su specifični ostaci šećera u GM1 i aminokiselinski ostaci u podjedinicama B koji međusobno djeluju. Premda postoji jedno mjesto vezanja GM1 na podjedinici, jedna amino kiselina (Gly33) iz susjedne podjedinice B također ima ulogu u vezivanju, čime se objašnjava veća sposobnost vezanja pentamera podjedinica B u usporedbi s pojedinačnim podjedinicama B. Ključni aminokiselinski ostaci za interakciju s GM1 su Trp88, Gly33 (iz susjednog monomera) i Tyr12, a shematski prikaz interakcija prikazan je na slici 10.



Slika 10. Prikaz interakcija između gangliozida GM1 i podjedinice B TK-a. Ostaci gangliozida GM1 u zelenoj i crvenoj boji oni su koji uspostavljaju interakcije s podjedinicom B, bilo izravno ili preko otapala (male plave sfere). Interakcije, uglavnom vodikove veze, prikazane su isprekidanom linijom. Ključni aminokiselinski ostaci za vezanje podebljani su i naglašeni većim fontom (Trp88 i Tyr12). Zvezdica označava aminokiselinski ostatak koji dolazi iz susjedne podjedinice (Gly33). Sve navedene interakcije uključuju bočne lance aminokiselina osim onih prikazanih kurzivom. (Gal – galaktoza, GalNac – N-acetilglukozamin, NAN – N-acetylenuraminska kiselina, Glc – glukoza) Slika preuzeta i prilagođena iz: J. Sánchez, J. Holmgren, *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** (2008) 1347–1360.

Nakon vezanja na GM1, TK se endocitozira u stanici. Ovisno o tipu stanice, endocitoza može biti ili klatrin-ovisna ili klatrin-neovisna, gdje se klatrin-neovisni putovi razlikuju po tome jesu li posredovani kaveolinom i dinaminom ili nisu. Raznolikost mehanizama za endocitozu objašnjava se raznolikošću GM1, odnosno varijabilnošću u ceramidnoj strukturi gangliozida.

3.3.2. Retrogradni transport u ER i translokacija preko membrane ER-a

Bez obzira na to kako toksin ulazi u stanicu, TK putuje do *trans*-Golgijeve mreže putem ranih i recikliranih endosomskih vezikula. C-kraj podjedinice A posjeduje aminokiselinski slijed KDEL za dohvata TK-a iz *cis*-Golgijeva aparata u ER. Međutim, iako je aminokiselinski slijed KDEL klasični eukariotski signal za zadržavanje u lumenu ER-a, nije vitalan za retrogradni transport TK-a u ER. Smatra se da on samo poboljšava povratak TK-a iz Golgijeva aparata i produžuje vrijeme zadržavanja TK-a u ER-u. Postoje i indicije da TK može zaobići retrogradni transport i izravno prijeći u ER. Međutim, točan mehanizam za izravan transport GM1 vezanog na TK iz endosomalnih odjeljaka u ER i dalje nije potpuno jasan. Neposredno prije ulaska u ER, podjedinica A mora biti proteolitički pocijepana na fragmente A1 i A2, koji ostaju povezani preko disulfidnog mosta. Proteolitička se aktivacija u načelu može odvijati u bilo kojem koraku od bakterijske sekrecije i kolonizacije tankog crijeva do transporta unutar ER stanice domaćina, ali u velikoj se mjeri to događa već prilikom sekrecije iz bakterijske stanice.¹³

U endoplazmatskom retikulumu proteinska disulfid-izomeraza (PDI), u svojoj reduciranoj formi, prepoznaje proteolitički pocijepan oblik podjedinice A. PDI odmotava fragment A1 i reducira disulfidni most između fragmenata A1 i A2, a to kao posljedicu ima disocijaciju fragmenta A1 od podjedinice B i vezanje fragmenta A1 na PDI. Poznato je da ovo mjesto cijepanja predstavlja kritičnu posttranslacijsku modifikaciju potrebnu za toksičnost. Prema tome, cijepanje peptidne petlje između fragmenata A1 i A2 djeluje kao molekularni prekidač. Kada je petlja netaknuta, TK se pravilno smata u periplazmi *V. cholerae*. Kada je petlja proteolitički pocijepana, TK se aktivira u ER-u domaćina. ER luminalna tioreduktaza ERO1 oksidira PDI, čime uzrokuje oslobađanje fragmenta A1 iz PDI-A1 kompleksa. Međutim, PDI nije jedini ER-luminalni šaperon uključen u retrotranslokaciju CTA1 u citosol, pretpostavlja se da i Hsp70 i Hsp40 pomažu u održavanju nesmotanog fragmenta A1 kako ne bi agregirao u ER-u, osim toga šaperoni mogu imati i ulogu sprječavanja ubikvitinacije fragmenta A1. Funkcija preostalog fragmenta A2 i podjedinice B nakon oslobađanja A1 lanca u ER nije još razjašnjena.

Nakon disocijacije fragmenta A1 od fragmenta A2 i podjedinica B, pretpostavlja se da fragment A1 ulazi u citosol preko ER-povezane degradacijske staze (ERAD; stanični put u kojem se pogrešno smotani proteini endoplazmatskog retikuluma obilježavaju ubikvitinom i

posljedično razgrađuju pomoću proteasoma). Međutim, fragment A1 očigledno izbjegava proteolizu, vjerojatno zbog niskog sadržaja lizina koji je meta ubikvitinacije.^{14,15}

3.3.3. Enzimatska aktivnost fragmenta A1

Kod intoksikacije stanice samo fragment A1 ulazi u citoplazmu. Nakon ulaska u citoplazmu fragment A1 alosterički se aktivira faktorima ADP-ribozilacije ARF6 (ARF; obitelj esencijalnih G proteina). Vežanje ARF6 uzrokuje velike konformacijske promjene koje omogućavaju vežanje NAD⁺-a u aktivno mjesto fragmenta A1, odnosno aktivaciju samog fragmenta A1. Nakon što fragment A1 dosegne svoju unutarstaničnu metu, aktivirani fragment A1 katalizira ADP-ribozilaciju α podjedinice heterotrimernog GTP-vezujućeg proteina G_s (prijenos s NAD⁺-a na Arg201 G_{s α}). To rezultira inhibicijom intrinzične aktivnosti GTPaze, što kao posljedicu ima konstantnu aktivaciju G_{s α} . Nakon aktivacije, GTP-vezni G_{s α} disocira od podjedinica β i γ što aktivira adenilat-ciklazu, što posljedično uzrokuje kontinuiranu proizvodnju sekundarnog glasnika cAMP-a iz ATP-a. Jedna od meta ovog sekundarnog glasnika u intestinalnim epitelnim stanicama je proteinkinaza A (PKA) koji se alosterički aktivira cAMP-om. Protein kinaza A aktivator je membranskog kloridnog kanala za transmembransku regulaciju (CFTR) koji je smješten u apikalnoj membrani epitelnih stanica. Kada se aktivira fosforilacijom, CFTR izlučuje ione klorida iz stanica u crijevni lumen. Povećanje unutarstanične razine cAMP-a, štoviše, aktivira povećanu ekspresiju CFTR-a, što rezultira dodatnim izlučivanjem klorida. Aktivacija CFTR-a primarno je sredstvo kojim TK potiče izlučivanje vode iz stanica. Međutim, povećana koncentracija cAMP-a ima brojne druge posljedice za stanicu domaćina, od kojih mnoge uzrokuju dodatno poticanje lučenja iona. Osim aktiviranja CFTR-a, PKA fosforilira i otvara bazolateralni kalijev kanal, koji suzbija depolarizirajuće učinke sekrecije klorida. Smanjenjem razina intracelularnog klorida, PKA također posredno povećava aktivnost Na⁺/K⁺/2Cl⁻ kotransportera u bazolateralnoj membrani. Ukupni učinak predstavlja povećanu koncentraciju soli u crijevu, što ga čini hipertoničnim. Time se uzrokuje osmotski tlak koji potiče izlazak ogromne količine vode iz stanice (0,5 – 1 dm³ / h), što u slučaju kolere rezultira ukupnim masovnim izlučivanjem tekućine u tanko crijevo. Tijekom prolaska kroz crijeva volumen tekućine daleko nadilazi normalan reabsorptivni kapacitet debelog crijeva što uzrokuje simptome kolere.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. S. Kalenić, i suradnici, *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 89–92, 153–155, 201–203.
2. J. L. Middlebrook, R. B. Dorland, *Microbiology Reviews* **48** (1984) 199–221.
3. D. Anderson, S. Salm, D. Allen, *Nester's MICROBIOLOGY: A Human Perspective*, McGraw-Hill, New York, 2015, str. 414–431, 539–541, 641–642.
4. H. Barth, B. G. Stiles, *Comprehensive Natural Products II: Protein Toxins from Bacteria*, Elsevier, 2010, str. 149–173.
5. C. Galanos, M. A. Freudenberg, *Mediators of Inflammation* **2** (1993) 11–16.
6. I. Mokrousov, *Infection, Genetics and Evolution* **9** (2009) 1–15.
7. D. Gillet, J. Barbier, *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Elsevier, 2015, str. 111–132.
8. A. Chenal, P. Nizard, D. Gillet, *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **21** (2002) 321–359.
9. R. J. Collier, *Toxicon* **39** (2001) 1793–1803.
10. J. R. Murphy, *Toxins* **3** (2011) 294–308.
11. J. Royal, N. Matoba, *Toxins* **9** (2017) 379.
12. J. Sánchez, J. Holmgren, *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** (2008) 1347–1360.
13. W. I. Lencer, *International Journal of Medical Microbiology* **293** (2004) 491–494.
14. J. E. Heggelund, V. A. Bjørnstad, U. Krengel, *Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Elsevier, 2015, str. 195–229.
15. A. A. Weil, J. B. Harris, *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, str. 1079–1098.