

Patrycja Kobierecka<sup>1</sup>, Agnieszka Wyszynska<sup>1</sup>, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, Zakład Genetyki Bakterii, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

Spis treści: 1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka CDT – operon *cdt*. 3. Rola podjednostek toksyny. 4. Mechanizm składania dojrzałej toksyny, struktura CDT. 5. Losy CDT w komórkach docelowych. 6. Mechanizm intoksykacji komórki przez toksyny CDT. 7. Nietypowa toksyna CDT wytwarzana przez *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. 8. Podsumowanie

#### Characterization of CDT (cytolethal distending toxin) genotoxins

**Abstract:** The cytolethal distending toxins (CDTs) comprise a family of intracellularly acting bacterial protein genotoxins, produced by a variety of Gram-negative pathogenic bacteria, which cause DNA damage in the target cells. The DNA damage-response in the initiated cell results in the characteristic and irreversible cell cycle arrest and apoptosis in a broad range of mammalian cell cultures. Most of CDTs are AB<sub>2</sub> toxins composed of three different subunits: CdtA and CdtC, both exhibiting a lectin-type fold, and CdtB, which is the active component of the complex, with DNase I and phosphatase activity. Although it is generally accepted that CdtA and CdtC, required for full activity of the CdtB, mediate its delivery into host cells, their precise role in the process remains poorly understood. Also the mechanism of toxin secretion and the mechanisms of cell surface binding, uptake and trafficking require further investigation. Some bacteria utilize OMVs to secrete CDTs. After internalization by dynamin-dependent endocytosis which requires the intact lipid rafts, toxin is retrograde transported through Golgi complex and the endoplasmic reticulum into the cell nuclear compartment, where CdtB exerts its toxic activity. CDTs are virulence determinants playing an important role in the pathogenesis of several bacterial diseases associated, for example, with human infections by *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

This review encompasses recent work on CDTs and focuses on the CDTs structure as well as on the molecular mechanisms of toxin uptake and cell's intoxication. We also discuss some controversial issues and indicate questions which still remain unanswered.

**Contents:** 1. Introduction. 2. General characterization of CDT – *cdt* operon. 3. Role of CDT toxin subunits. 4. Mechanisms of mature toxin assembly, CDT tertiary structure. 5. CDT uptake into host cells. 6. Mechanism of CDT cellular intoxication. 7. Unusual CDT toxin producing by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** genotoksyna, CDT, aktywność DNazy, aktywność fosfatazy, apoptoza  
**Key words:** genotoxin, CDT, DNase activity, phosphatase activity, apoptosis

## 1. Wstęp

Patogenne mikroorganizmy podczas koewolucji z organizmem gospodarza wykształciły różnorodne strategie inwazji i przeżycia. Jednym z tych mechanizmów jest wydzielanie związków, głównie białek zwanych egzotoksynami, które modyfikują funkcje komórkowe. Najczęściej ich aktywność jest letalna dla komórek gospodarza. Egzotoksyny wytwarzane są zarówno przez bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne, zarówno przez bakterie tlenowe jak i beztlenowe. Różnią się one mechanizmami działania oraz docelowymi komórkami wobec których ujawniają swoją aktywność, a ich nomenklatura nie jest jednoznacznie usystematyzowana. Nazwy mogą pochodzić od rodzaju atakowanych komórek (neurotoksyny, leukotoksyny), od szczepów, przez które są produkowane (*Shigella* sp. – toksyna Shiga), wywołanych chorób (*Clostridium tetani* – toksyna tężca) czy też posiadanej aktywności (*Bordetella pertussis* – cyklaza adenyloza). Zdarza się, że nadawane jest im mało informacyjne oznaczenie literowe, tak jak w przypadku

toksyny A wydzielanej przez *Pseudomonas aeruginosa*. Niektóre toksyny posiadają kilka wymiennie stosowanych nazw i tak np. toksyna *E. coli* podobna do toksyny czerwonki zwana jest też werotoksyną, od nazwy linii małych komórek (Vero) wrażliwych na jej działanie. Egzotoksyny wydzielane są przez błonę zewnętrzną bakterii gramujemnych za pomocą różnych systemów sekrecji (I, II, V, OMVs – *outer membrane vesicles*) [13, 33]. Do grupy toksyn zaliczane są także przez niektórych badaczy tzw. białka efektorowe przekazywane z cytozolu bakterii do docelowej komórki za pomocą systemu sekrecji typu III (TTSS – *type three secretion system*) lub IV (TFSS – *type four secretion system*). Białka te modyfikują procesy fizjologiczne komórek eukariotycznych, tak by stworzyć dogodny dla mikroorganizmu warunki do życia i replikacji [12, 70].

Przyjmując za kryterium podziału egzotoksyn mechanizm ich działania można wyróżnić trzy główne ich typy: a) toksyny internalizowane przez komórki gospodarza i wpływające na ich strukturę/metabolizm, b) toksyny oddziałujące z receptorami na powierzchni

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, UW; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

komórek ssaczyh i wywołujące wielopoziomową odpowiedź tzw. superantygenu oraz c) toksyny uszkodzające błonę cytoplazmatyczną, poprzez tworzenie w niej porów lub aktywność enzymatyczną [65].

Przedstawiony niżej artykuł przeglądowy ma na celu zapoznanie czytelnika z danymi eksperymentalnymi opisującymi strukturę oraz mechanizm działania toksyny CDT (*cytolethal distending toxin*). Jest to pierwsza opisana genotoksyna, która wywołuje uszkodzenie materiału genetycznego wrażliwych komórek eukariotycznych, co skutkuje zatrzymaniem ich cyklu komórkowego i w efekcie śmierć komórek. Z tego powodu zwana jest także cyklomoduliną. Toksyna CDT jest produkowana przez wiele gatunków Gram-ujemnych bakterii patogennych dla ludzi i/lub zwierząt, kolonizujących różne nisze ekologiczne, należących do klas Gamma i Epsilonproteobacteria. Aktualnie w bazach danych znajduje się ponad 500 sekwencji aminokwasowych białek adnotowanych jako sekwencje aminokwasowe odpowiednich podjednostek toksyn CDT [21]. Najdokładniej pod względem biochemicznym, strukturalnym oraz fizjologicznym przebadane zostały toksyny CDT produkowane przez: *Escherichia coli* (EcCDT), *Haemophilus ducreyi* (HdCDT), *Shigella dysenteriae* (SdCDT), *Salmonella enterica* sv. Typhi (SeCDT), *Helicobacter hepaticus* (HhCDT), *Aggregatibacter* (dawniej *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (AaCDT) i *Campylobacter* spp (CjCDT) [3, 14, 23, 25, 40, 53, 64].

Najczęściej zalecana nomenklatura toksyn CDT produkowanych przez różne gatunki mikroorganizmów, podana wyżej, zakłada poprzedzenie skrótu CDT dużą literą odpowiadającą pierwszej literze nazwy rodzajowej i małą literą odpowiadającą pierwszej literze nazwy gatunkowej produkującego toksynę mikroorganizmu. Wraz z szybkim wzrostem liczby mikroorganizmów o zsekwencjonowanych genomach ten system już niedługo może okazać się niejednoznaczny. Ostatnio zaproponowano więc zastąpienie jednej litery nazwy gatunkowej jej trzema pierwszymi literami. I tak zamiast CjCDT niektórzy autorzy proponują stosowanie oznaczenia CjejCDT [30].

## 2. Ogólna charakterystyka CDT – operon *cdt*

Toksyna CDT została po raz pierwszy opisana w 1987 roku, kiedy to Johnson i Lior wykazali, że supernatant z hodowli komórek *E. coli* powoduje charakterystyczne postępujące, powolne pęcznienie komórek eukariotycznych (2–5 dni) prowadząc ostatecznie do ich śmierci [7, 32]. W 1988 roku udokumentowano, że niektóre kliniczne izolaty *C. jejuni* powodują podobne zmiany [7, 31]. Wrażliwa na działanie temperatury i trypsyny toksyna wykazuje cytotoksyczność w stosunku do komórek większości linii komórkowych,

m.in. CHO (*chinese hamster ovary*), HeLa (*human cervical adenocarcinoma epithelial cells*) [15] i Hep-2 (*human epithelial type 2*) [51]. Na jej działanie nie są natomiast wrażliwe fibroblasty 3T3 (*mouse embryonic fibroblasts cell line*) [8], jak również komórki linii Caco-2 (*human colonic carcinoma cell line*) [15] i ludzkie limfocyty [62].

Locus CDT składa się z trzech zlokalizowanych przeważnie na chromosomie, wspólnie, konstytutywnie transkrybowanych otwartych ramek odczytu (ORF): *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* [40, 51, 68]. Unikalny locus *cdt*, składający się z pięciu ORFs: *orf1*, *orf2*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, występuje w genomie *A. actinomycetemcomitans*. Dwie krótkie otwarte ramki odczytu (*orf1* i *orf2*) zlokalizowane są powyżej genu *cdtA* i prawdopodobnie transkrybowane razem z trzema genami *cdt*. Nie wiadomo jednak czy mRNA *orf1* i *orf2* ulegają translacji *in vivo*, a delecja tego fragmentu DNA nie wpływa na aktywność toksyny [61]. Patogenne szczepy *E. coli* nietypowo wytwarzają pięć typów toksyn CDT (oznaczane EcCDT I–V zgodnie z chronologią ich opisania), z których jedynie EcCDT-III kodowana jest przez geny zlokalizowane na plazmidzie Vir [1, 52, 68, 69]. Chromosomowe geny kodujące pozostałe typy toksyn *E. coli* otoczone są przez nukleotydowe sekwencje lambdoidalnych fagów wskazujące na ich przeniesienie na drodze transdukcji, co sugeruje, że operon *cdt* został nabyty na drodze horyzontalnego transferu genów i stanowi wyspę patogenności niedużych rozmiarów [37]. Z trzech genów, których produkty tworzą toksynę CDT, najwyższy poziom konserwacji wykazuje sekwencja nukleotydowa genu *cdtB* [71]. Poziom identyczności sekwencji aminokwasowych CdtB zależy od porównywanych gatunków bakterii. Tak np. sekwencja aminokwasowa HdCdtB jest identyczna w 95,8% z AaCdtB, podczas gdy z EcCdtB-I wykazuje jedynie 51,1% identyczności [7, 62]. Niezależnie jednak od stopnia identyczności sekwencji aminokwasowych podjednostek CdtB zachowują one elementy strukturalne warunkujące podobny mechanizm ich działania.

CDT należy do grupy toksyn AB, które wnikając do wnętrza komórek gospodarza modulują w różnorodny sposób ich strukturę i/lub metabolizm. Generalnie toksyny AB składają się z podjednostki A (activity) posiadającej aktywność enzymatyczną i z podjednostki/ek B (*binding*), które poprzez wiązanie się do swoistych receptorów na powierzchni komórki docelowej pośredniczy/ą w transporcie podjednostki A do miejsca działania. Wyróżnianych jest kilka podklas toksyn AB w zależności od budowy i mechanizmu składania dojrzałej toksyny. Toksyna A *P. aeruginosa* lub toksyna dyfterytu składają się z jednej podjednostki A i jednej podjednostki B syntetyzowanych jako pojedynczy łańcuch białkowy, który przechodzi następnie potranslacyjne modyfikacje. Toksyna cholery oraz toksyna LT enterotoksycznych szczepów *E. coli* to przykłady toksyn podklasy AB<sub>3</sub>. Toksyna wąglika należy do trzeciej

podklasy, ponieważ jej podjednostki transportowane są niezależnie na zewnątrz komórki bakteryjnej i składane do dojrzałej holotoksyny dopiero na powierzchni komórki eukariotycznej. CDT należy do nowej podklasy toksyn AB – podtyp AB<sub>2</sub>. Spośród trzech budujących ją podjednostek: CdtA, CdtB i CdtC aktywność enzymatyczną posiada CdtB, natomiast CdtA i CdtC odpowiadają raczej za rozpoznanie docelowej komórki i pośredniczą w transporcie podjednostki B do jej wnętrza, choć ich dokładna rola w procesie intoksykacji komórek docelowych nie jest do końca wyjaśniona. Masy cząsteczkowe poszczególnych podjednostek w zależności od gatunku wytwarzającego je mikroorganizmu wynoszą odpowiednio: 23–30, 28–29, i 19–21 kDa dla CdtA, CdtB i CdtC [27; 58; 61]. Trzy podjednostki toksyny są syntetyzowane konstytutywnie, składane w kompleks na terenie peryplazmy po usunięciu sekwencji sygnałnych i translokowane na zewnątrz komórki bakteryjnej. Przypisanie funkcji określonej podjednostce możliwe było dopiero po sklonowaniu kodujących je genów w komórkach *E. coli* i oczyszczeniu rekombinowanych białek. Wcześniej uzyskiwano niespójne wyniki badań, co prawdopodobnie było wynikiem zanieczyszczenia preparatu badanej podjednostki pozostałymi składnikami kompleksu. Ostatnio uzyskane dane eksperymentalne sugerują, że obecność trzech podjednostek jest konieczna dla zachowania pełnej aktywności przez toksynę CDT wydzielaną przez *H. ducrei*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* oraz *Camylobacter jejuni* [5, 36, 46, 47, 54, 55, 58, 71], choć kontrowersje nadal dotyczą roli podjednostki CdtA. Jej obecność w kompleksie nie wydaje się być absolutnie wymagana, choć podwyższa poziom indukowanych zmian w komórkach eukariotycznych [4, 5, 38]. Nietypową strukturę posiada toksyna CDT produkowana przez komórki *Salmonella enterica* sv. Typhi, co opisano w dalszej części tej pracy przeglądowej.

### 3. Funkcje podjednostek toksyny

Podjednostka CdtB wykazuje strukturalne podobieństwo do nukleaz eukariotycznych. Charakterystyczne dla ssaczej DNazy I reszty aminokwasowe zaangażowane w hydrolizę wiązań fosfodiestrowych (His134 i His252), reszty aminokwasowe biorące udział w tworzeniu wiązań wodorowych (Glu78 i Asp212), jak również wysoko konserwowane reszty aminokwasowe oddziałujące z DNA (Arg111, Asn170, Arg41) mają swoje odpowiedniki w sekwencji aminokwasowej CdtB. Podjednostka CdtB zawiera także odnajdywany we wszystkich DNazach pentapeptydowy motyw (Ser-Asp-His-Tyr-Pro), w którym dwie reszty aminokwasowe (Asp251 i His252) są kluczowe w przebiegu procesu enzymatycznego [15, 51]. Przewidywaną na podstawie analizy *in silico*

funkcję nukleolityczną potwierdzono doświadczalnie. Stwierdzono, że preparat zawierające EcCDT, AaCDT bądź HdCDT w warunkach *in vitro*, wykazuje aktywność DNazy wobec plazmidowego DNA [5, 14, 15, 48]. Także wprowadzenie oczyszczonej podjednostki CdtB na drodze elektroporacji lub bezpośredniej iniekcji do komórek eukariotycznych stymuluje zmiany w chromatynie transfekowanych komórek [18, 36]. Zmiana aminokwasów uwikłanych w proces katalityczny bądź wiązanie Mg<sup>2+</sup> wykazała, że zmutowane białka nie posiadają aktywności nukleazy w warunkach *in vitro* i nie wywołują w komórkach typowych dla działania opisywanej toksyny zmian [15, 24, 26, 35].

CdtB, w zależności od pochodzenia, może wykazywać różny poziom aktywności nukleolitycznej. El w e l l i D r e y f u s za pomocą reakcji „nacinania plazmidowego DNA”, umożliwiającej ilościowe oszacowanie superzwiniętej (*supercoiled*) formy DNA, udokumentowali, że EcCdtII-B posiada tylko 0,01% aktywności ludzkiej lub bydłowej DNazy I [14]. Jednocześnie wykazano, że zagęszczony supernatant znad komórek *E. coli* zawierających HdCdtB wykazuje aktywność na poziomie podobnym do trzustkowej DNazy I [20]. Niska nukleazowa aktywność CdtB obserwowana *in vitro* może sugerować, że białko to wymaga do osiągnięcia pełnej aktywności obecności komórkowego kofaktora lub specyficznej struktury chromatyny. Jednakże wiadomo, że jedno dwuniciowe pęknięcie nici DNA jest wystarczające do zatrzymania cyklu komórkowego. Możliwe jest zatem, że nawet niska aktywność nukleazy *in vivo* jest wystarczająca do wywołania efektu cytotoksycznego [37].

Kontrowersyjne wnioski z przeprowadzonych eksperymentów wysunuli S h e n k e r i wsp, którzy sugerują, że zmiany wywołane przez CDT związane są raczej z aktywnością fosfatazową białka [60]. Wykazali oni, że podjednostka AaCdtB oprócz aktywności nukleolitycznej przeprowadza hydrolizę 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PI-3-4-5-P<sub>3</sub>; PIP<sub>3</sub>) do 3,4-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PI-3,4-P<sub>2</sub>). Porównanie sekwencji aminokwasowych AaCdtB, i 5-fosfatazy inozytolopoli-fosfatydyloowej pozwoliło wskazać konserwowane regiony odpowiedzialne za aktywność fosfatazową białka. W celu dokładniejszego zbadania powiązań pomiędzy strukturą i funkcją białka stworzono kilka punktowych mutantów CdtB, w których zmieniono aminokwasy pełniące funkcje katalityczne (CdtB H160Q, CdtB H274Q, CdtB D199S, CdtB R117A). We wszystkich przypadkach zaobserwowano zredukowaną aktywność fosfatazy w porównaniu do aktywności CdtB dzikiego typu. Zmutowane białka wykazywały również obniżoną aktywność DNazy I, choć w przypadku CdtB H274Q aktywność nukleazowa nie uległa zmianie. Według autorów głównym celem działania CdtB jest PI-3,4,5-P<sub>3</sub>. Badania S h e n k e r a i wsp. nie wykluczają jednak możliwości, że CdtB pełni podwójną funkcję. Aktywność DNazy

warunkuje toksyczność CdtB w niektórych typach komórek, podczas gdy aktywność fosfatazy istotna jest dla oddziaływania z innymi rodzajami komórek [60]. Podobne doświadczenie wykonali Rabin i wsp. również udowadniając, że CdtB posiada dwie aktywności, DNazy i fosfatazy PIP3, oraz, że aktywności te można od siebie odróżnić stosując mutacje specyficzne co do miejsca [53]. AaCdtB, do której sekwencji aminokwasowej wprowadzono specyficzne wobec miejsca mutacje hamujące aktywność fosfatazową a nie wpływające na aktywność nukleolityczną, indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego i proces apoptozy proliferujących monocytów U937 [53]. Mechanizm działania AaCDT analizowano również z wykorzystaniem komórek *Saccharomyces cerevisiae*, które nie syntetyzują 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu. W tych eksperymentach aktywność nukleolityczna była wystarczająca do wywołania przez białko CdtB efektu cytotoksycznego [41]. Obserwowane różnice w aktywnościach enzymatycznych różnych zmutowanych form CdtB mogą wynikać między innymi z odmiennej wrażliwości stosowanych w badaniach komórek eukariotycznych.

Główną funkcją podjednostek B toksyn AB jest rozpoznanie odpowiednich receptorów i zapewnienie transportu podjednostki A do cytozolu komórki docelowej. Różnorodność uzyskanych wyników eksperymentów, których celem było ustalenie receptora dla CDT sugeruje, że toksyny CDT, w zależności od pochodzenia, mogą wykazywać różną specyficzność receptorową. Udokumentowano, że EcCdtA-II, podobnie jak podjednostka C, wiąże na docelowych komórkach N-glikoproteiny zawierające fukozę [43], a toksyna AaCDT wiąże się z powierzchniowymi glikosfingolipidami (GM1, GM2, GM3 i Gb4 w przypadku CdtA; GM1 i GM2 w przypadku CdtC) [44]. Prezentowane wyżej dane zgodne są ze strukturalnymi analizami CtdA i CtdC. Występowanie w podjednostkach CtdA i CtdC domen lektynowych, podobnych do siebie nawzajem i do domeny roślinnej toksyny rycynowej, sugeruje ich powinowactwo do węglowodanowych receptorów [29, 46]. Odmienne dane zaprezentowali Eshraghi i wsp. Udokumentowali, że komórki linii CHO niezdolne do produkcji N-glikoprotein oraz glikosfingolipidów bądź niezdolne do biosyntezy fukozy są równie wrażliwe na działanie toksyn CDT pochodzących z *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. coli* i *C. jejuni* jak komórki CHO o niezmiennym fenotypie [16]. Dodatkowo dane przedstawione przez Boesze-Battaglia i wsp. sugerują, że AaCDT oddziałuje z mikrodomenami błonowymi bogatymi w cholesterol. M $\beta$ CD (*methyl beta-cyclodextrin*), związek powodujący obniżenie poziomu cholesterolu, redukuje zdolność AaCDT i HdCDT do wiązania się odpowiednio z komórkami linii Jurkat i HeLa oraz chroni te komórki przed toksyczną aktywnością CDT [3].

Z badań Eshraghi i wsp. wynika, że również wiązanie AaCDT, HdCDT oraz EcCDT-III, ale nie CjCDT zależy od obecności cholesterolu w błonie komórek docelowych [16]. Ostatnio zidentyfikowano dwa geny (SGMS1 i TMEM181), których unieczynnienie sprawia, że komórki eukariotyczne stają się odporne na działanie EcCDT. Mutacje w genie SGMS1 obniżają poziom sfingomieliny, kluczowego składnika mikrodomen błonowych, przez co prawdopodobnie obniżają poziom oddziaływania toksyny z powierzchnią komórek eukariotycznych. Zlokalizowany na powierzchni komórek produkt drugiego genu, TMEM181, może także pełnić funkcję receptora. Nie można jednak wykluczyć, że białko to uwikłane jest jedynie w transport kompleksu toksyna-receptor przez błonę komórkową [6]. Poznanie receptora toksyny wymaga dalszych badań. Ostatnio opublikowane dane eksperymentów, w których z wykorzystaniem fluorescencji analizowano lokalizację poszczególnych podjednostek AaCDT w komórkach linii CHO-K1. CdtA odnajdywana była na powierzchni komórek docelowych niezależnie od obecności w ich błonach cholesterolu, podczas gdy CdtC była obecna w cytozolu komórek docelowych. Pozwoliło to autorom na postawienie hipotezy, że podjednostka CdtC pełni rolę białka opiekuńczego dla CdtB i jego rola w procesie rozpoznania receptorów jest tylko pomocnicza [11].

#### 4. Mechanizm składania dojrzałej toksyny, struktura CDT

Składanie dojrzałej toksyny, będącej heterotrimerowym białkiem, ma miejsce na terenie peryplazmy. Sekwencje sygnałowe podjednostek są odcinane przez specyficzne proteazy podczas transportu przez błonę wewnętrzną komórki. Podjednostki CdtB i CdtC zaopatrzone są w klasyczne sekwencje sygnałowe, podczas gdy CdtA ma charakterystyczną dla lipoprotein sekwencję sygnałową rozpoznawaną przez sygnałową peptydazę II [27]. CdtA unikalne procesowanie podczas składania całego kompleksu i prawdopodobnie jest odpowiedzialna za transport dojrzałej toksyny przez błonę zewnętrzną komórki bakteryjnej [58]. Plazmid pUCA-cdtA zawierający gen *cdtA* warunkuje wytwarzanie dwóch immunopozytywnych białek o masie 25 kDa i 18 kDa [58]. Tylko CdtA o masie cząsteczkowej 18 kDa wchodzi w skład dojrzałej toksyny. Podobne procesowanie HdCdtA w *E. coli* zaobserwowali Frisk i wsp. [20].

Rozwiązanie struktur HdCDT, AaCDT oraz EcCdtB-II potwierdziło wcześniejsze dane otrzymane na drodze modelowania strukturalnego w oparciu o podobieństwo tych białek do eukariotycznej DNazyI oraz pozwoliło na częściowe wyjaśnienie mechanizmu składania kompleksu [28, 46, 72]. Wykazano m.in., że końce CdtA oraz CdtC o strukturze nieglobularnej stabilizują ostateczny

kompleks. Nesic i Stebbins skonstruowali trzy mutanty wytwarzające toksynę z CdtA z jedną z delecji na N-końcu ( $\Delta 18-56$ ,  $\Delta 18-67$  lub  $\Delta 18-75$ ). Skutkiem tych zmian nie było obniżenie aktywności enzymatycznej, ale destabilizacja toksyny. Usunięcie większej liczby niż 75 aminokwasów z N-końca dawało podobny efekt. Tak więc ten fragment białka nie ma istotnego znaczenia dla aktywności ostatecznego kompleksu. Natomiast C koniec CdtA oddziałuje z CdtC. W wyniku usunięcia 8 aminokwasów CdtA ( $\Delta 215-223$ ) odnotowano brak zdolności do prawidłowego zwinięcia kompleksu. Dodatkowo analiza mutantów delecyjnych w genie *cdtC* wykazała, że oddziaływanie CdtC z innymi podjednostkami jest bardzo istotne w montażu, stabilności i aktywności kompleksu. Delecja aminokwasów od 21 do 35 z N-końca CdtC nie wpływała na stabilność kompleksu, ale już brak 4 dodatkowych aminokwasów ( $\Delta 21-39$ ) prowadził do znaczącej destabilizacji holo-toksyny i spadku jej aktywności. Aminokwasy podjednostki CdtC w pozycji od 169 do 178 uwikłane są w proces oddziaływania zarówno z CdtB jak i z CdtA. Struktura czwartorzędowa kompleksu wykazuje, że CdtA i CdtC uczestniczą w formowaniu dwóch istotnych powierzchniowych elementów dojrzalej toksyny: grupy wysoko konserwowanych aromatycznych reszt aminokwasowych i głębokiego rowka w miejscu styku tych podjednostek. Stosując mutagenезę specyficzną co do miejsca, udokumentowano istotny udział tych elementów strukturalnych w wiązaniu CDT do komórek docelowych i ich rolę w aktywności enzymatycznej ostatecznego kompleksu [47].

## 5. Losy CDT w komórkach docelowych

Wyjaśnienie mechanizmu wnikania CDT do komórek eukariotycznych wymaga dalszych badań ponieważ wyniki ostatnio wykonanych eksperymentów wskazują, że jest ona wydzielana do środowiska zewnętrznego za pomocą pęcherzyków błony zewnętrznej (OMVs – *outer membrane vesicles*), a nasza wiedza o uwalnianiu zawartości OMV do cytozolu komórek eukariotycznych jest jak dotąd bardzo ograniczona [40]. Dane dotyczące procesu wnikania CDT do komórek eukariotycznych pochodzą głównie z eksperymentów wykonanych *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych białek. Po związaniu do odpowiednich receptorów, toksyna CDT jest pobierana na drodze endocytozy zależnej od dynaminy [9]. Następnie jest transportowana poprzez aparat Golgiego do retikulum endoplazmatycznego (ER) na drodze tzw. wtórnego transportu. Uszkodzenie aparatu Golgiego przez traktowanie komórek brefeldyną A lub zablokowanie endocytozy hamuje ich intoksykację [9]. Translokacja podjednostki enzymatycznej toksyn z grupy AB z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu zwykle odbywa

się za pomocą szlaku ERAD (*ER associated degradation*). Jednak w przypadku HdCDT transport zachodzi niezależnie od ERAD lub znacznie się różni od mechanizmu używanego przez inne znane toksyny [23]. Wielu zwolenników ma teoria wskazująca na bezpośredni transport HdCdtB z ER do jądra komórkowego [37], tym bardziej, że metodami biochemicznymi nie udało się stwierdzić występowania omawianej toksyny w cytozolu zainfekowanych komórek eukariotycznych. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że wyniki eksperymentów nie są jednoznaczne i zależą od użytej strategii doświadczalnej [11]. Dotychczas dwie grupy badawcze wskazały na istnienie w obrębie AaCdtB i EcCdtB-II specyficznych sekwencji aminokwasowych NLS warunkujących kierowanie białka do jądra komórkowego. NLS w białku AaCdtB znajduje się na N-końcu i obejmuje aminokwasy 48–124. Delecja zaledwie 11 aminokwasów ( $\Delta 114-124$  aa) wystarczy do zaburzenia transportu AaCdtB do jądra komórki docelowej/zniesienia cytotoxycywności CDT [49]. W białku EcCdtB-II zidentyfikowano dwie sekwencje aminokwasowe decydujące o jego lokalizacji jądrowej nazwane: NLS1 i NLS2. Interesujące jest to, że delecja każdej z tych sekwencji aminokwasowych powoduje odmienną lokalizację podjednostki toksyny [42]. Przeprowadzone badania sugerują, że NLS2 może działać jako sygnał uniemożliwiający „ucieczkę” CdtB do cytozolu, natomiast NLS1 odpowiadałaby za translokację z ER do jądra komórkowego. Interesujący aspekt biologii toksyny CDT stanowi kwestia obecności podjednostek A i C na którymkolwiek z etapów transportu. Model zaproponowany przez D a m e k - P o p r a w a i wsp. zakłada, że podjednostka CdtC wzmacniająca wiązanie z trawami lipidowymi poprzez odpowiedni motyw wiążący cholesterol (CRAC domena) jest także transportowana w formie dimeru z CdtB do wnętrza komórki i przechodzi drogę transportu wtórnego. Zgodnie z tym modelem oddysocjowuje ona od dimeru w ER i podlega degradacji a uwolniona podjednostka B jest dostarczana do jądra [11].

## 6. Mechanizm intoksykacji komórki przez toksyny CDT

Uszkodzenia materiału genetycznego przez czynniki endogenne lub egzogenne indukuje aktywność mechanizmów zwanych odpowiedzią na uszkodzenia DNA (*DDR – DNA damage response*), których celem jest minimalizowanie niekorzystnych efektów. Mechanizmy te obejmują szlaki naprawy DNA i modulację aktywności punktów kontrolnych cyklu komórkowego głównie przez dwa szlaki sygnalizacyjne: zależny od kinazy ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) i zależny od czynnika ATR (*ATM and Rad3 related*). Aktywność odpowiednich białek gwarantuje zachowanie prawidłowej replikacji DNA i rozdzielenia chromosomów.

CdtB mająca aktywność DNazy I indukuje powstanie dwuniciowych pęknięć w DNA (*DSB – double strand breaks*), czego konsekwencją jest uruchomienie odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Komórki są nieodwracalnie zatrzymane w fazie G1 lub G2 i nie przechodzą mitozy [7]. Faza, w której zatrzyma się cykl komórkowy zależy od typu komórek. I tak np. HdCDT blokuje cykl podziałowy nabłonkowych linii komórkowych (HeLa, Hep-2) i keratynocytów w fazie G2 [7, 74] a ludzkie fibroblasty blokowane są w fazie G1 oraz G2 [10, 62]. Limfocyty T mające kontakt z lizatem *Campylobacter upsaliensis*, blokowane są w fazie G2 i ostatecznie przechodzą apoptozę [45]. Mechanizm zatrzymania cyklu komórkowego indukowany w wyniku działania CDT jest podobny do tego indukowanego przez promieniowanie jonizujące [37]. W blokowanie cyklu komórkowego zaangażowana jest kinaza ATM, która ulega autofosforylacji w odpowiedzi na powstanie DSB [7]. Li i wsp. sugerują, że w ten proces zaangażowany jest także czynnik ATR [39]. Natomiast Shi i Lo uważa, że dwuniciowe pęknięcia w DNA prowadzą do aktywacji ATM, podczas gdy ATR jest aktywowany przez uszkodzenia DNA pojawiające się w wyniku działania promieniowania jonizującego [63]. Autofosforylacja ATM prowadzi do fosforylacji Chk2 (*checkpoint kinase 2*), która przeprowadza fosforylację CDC25C (fosfataza) w pozycji 216, co skutkuje utratą aktywności tego białka [7]. W niezaburzonym cyklu komórkowym ufosforylowane w pozycji treoniny 14 i tyrozyny 15 białko Cdc2 (*cell division cycle 2*) jest nieaktywne. Rozpoczęcie przez komórkę mitozy jest wynikiem aktywacji cykliny B/Cdc2, która zachodzi wskutek działania fosfatazy CDC25C. Konsekwencją utraty aktywności przez CDC25C jest brak defosforylacji cykliny B/Cdc2, co prowadzi do zatrzymania cyklu w G2/M lub przejścia komórek w stan starzenia [2, 7, 10, 57]. ATM aktywuje także czynnik transkrypcyjny p53. P53, którego poziom reguluje onkoproteina MDM2 (*mouse double minute 2*), bezpośrednio aktywuje p21 (inhibitor kinaz zależnych od cyklin). W fibroblastach lub keratynocytach zainfekowanych CDT fosforylacja p53 przez kinazę Chk2 prowadzi do oddysocjowania MDM2 i w efekcie do zwiększonej liczby cząsteczek p21 i wzrostu poziomu p27. Kompleks cdk2/cyklina E jest inaktywowany przez p21, czego konsekwencją jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Możliwe, że przewaga wstrzymania cyklu w G2/M obserwowana w większości doświadczeń może być związana z nieobecnością p53 w stosowanych do badań liniach komórkowych. ATM fosforyluje także histon H2AX prowadząc do aktywacji Mre11, kompleksu białek Rad50/NBS1/Mre11 związanych z naprawą DNA [39]. Fosforylacja H2AX wykrywana jest już godzinę po traktowaniu komórek DC (*dendritic cells*) HdCDT, a 2–3 godziny później następuje relokalizacja Mre11. Relokalizacja ta nie ma miejsca w przypadku traktowa-

nia komórek UV, co sugeruje, że aktywacja kompleksu związana jest z DSB [39]. W większości komórek (linie komórkowe CHO, Hep-2, HeLa) zainfekowanych CDT obserwuje się także montaż włókien stresowych aktywny [18; 74] odpowiedzialnych są za kształt komórki oraz zaangażowanych w jej mobilność. Przebudowa szkieletu aktywnego po dodaniu CDT wymaga aktywacji GTPazy RhoA zależnej od defosforylacji regulującego jej aktywność czynnika Net1 [22]. Białko RhoA wpływa na formowanie ognisk adhezji, co promuje przyczepianie się komórek do podłoża, reguluje ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcji oraz stymuluje proces proliferacji komórek [50]. Opisane zmiany cytoszkieletu aktywnego zachodzące w odpowiedzi na stres genotoksyczny są prawdopodobnie niezbędne do przeżycia komórki [18, 22, 56, 73]. W przedstawionym wyżej mechanizmie działania CDT zmiany indukowane przez DSB skutkują zatrzymaniem cyklu komórkowego i apoptozą komórek. Niektórzy autorzy sugerują odwrotny mechanizm, w którym fragmentacja DNA jest konsekwencją zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy oraz podkreślają rolę jednoniciowych pęknięć DNA w tym procesie. Obserwowane różnice mogą być zależne od rodzaju komórek oraz dawki toksyny użytych w eksperymentach [17, 19, 59]. Shenker i wsp. udokumentowali, jak wspomniano wyżej, że AaCDT wykazuje aktywność fosfatazy 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytoli (PIP3). Autorzy uważają, że blokowanie cyklu komórkowego przez toksynę głównie spowodowane jest aktywnością fosfatazy, a tylko czasami jej aktywnością DNazy [60], co zgodne jest to z wcześniejszą sugestią Sertai i wsp., że zablokowanie cyklu w punkcie kontrolnym G2/M nie zależy od powstawania DSB [57]. Dane eksperymentalne przedstawione przez Rabin i wsp., którzy stworzyli serię mutantów AaCdtB, zaprzeczają jednak tej hipotezie. Warianty CdtB H160G (zredukowana aktywność DNazy, a utrzymana aktywność fosfatazy PIP3) i CdtB D199G (obniżona aktywność DNazy i fosfatazy PIP3) nie powodują zablokowania cyklu komórkowego i apoptozy w proliferujących komórkach. Nie można jednak wykluczyć, że indukcja apoptozy w proliferujących komórkach U937 przez CDT wymaga aktywności zarówno DNazy jak i fosfatazy [53]. W przeciwieństwie do proliferujących komórek, apoptoza w nieproliferujących komórkach U937 nie wymaga aktywacji kaskady kaspaz i mobilizacji AIF (*apoptosis-inducing factor*). W dodatku w tych komórkach apoptoza występuje w wyniku działania CdtB D199G, CdtB H160G, niezmutowanej cząsteczki CdtB, oraz w obecności CdtB dzikiego typu z dodatkiem inhibitora fosfatazy PIP3 – bpV(pic) (*bisperoxo (picolinato) oxo-vanadate*). Sugeruje to, że apoptoza w nieproliferujących komórkach występuje niezależnie od aktywności fosfatazy PIP3 lub od aktywności DNazy [53]. Czy CDT pełni dwojaką funkcję i czy hydroliza PI-3,4,5-P3 do

PI-3,4-P2 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego wymaga dalszego wyjaśnienia. Istnieją także inne bardzo kontrowersyjne hipotezy dotyczące mechanizmu działania CDT. Schenker i wsp. w 2004 zasugerowali, że zatrucie komórki może być spowodowane kaskadą sygnałów pochodzącą z błony komórkowej docelowej komórki [58]. Jednak Guerra i wsp. udowodnili, że ingerencja w prawdopodobną drogę transportu tej toksyny, między innymi w funkcjonowanie aparatu Golgiego, chroni komórkę przed zablokowaniem cyklu komórkowego, jak również przed powstawaniem DSB w DNA komórek HeLa [23].

## 7. Nietypowa toksyna CDT wytwarzana przez *Salmonella enterica* serovar Typhi

Toksynę CDT produkuje również wewnątrzkomórkowy patogen *Salmonella enterica* sv. Typhi. W genomie tego mikroorganizmu nie odnaleziono genów kodujących białka wykazujące podobieństwo do sekwencji aminokwasowych podjednostek CdtA i CdtC, co było dość zaskakujące, bowiem wyniki przeprowadzonych wcześniej analiz wskazują, że obecność tych białek jest niezbędna do budowy aktywnego kompleksu toksyny. Składnik toksyny o aktywności enzymatycznej, homolog podjednostki CdtB, kodowany jest przez jeden z genów małej wyspy genomowej *Salmonella*. Białko to posiada Sec-zależny sygnał sekrecji i wszystkie reszty aminokwasowe istotne dla katalitycznej aktywności CdtB. Zaobserwowano, że ekstrakt zawierający jedynie SeCdtB, podobnie do CdtB produkowanych przez inne gatunki bakterii, nie wykazuje aktywności cytotoksycznej wobec komórek eukariotycznych. Natomiast aktywność kompleksu złożonego z CdtB *S. Typhi* oraz z podjednostek CdtA i CdtC pochodzących z komórek *C. jejuni* była porównywalna z aktywnością toksyny CDT wydzielanej przez pałeczki *Campylobacter*. Ponadto stwierdzono, że pomimo braku homologów podjednostek CdtA i CdtC w proteomie *S. Typhi*, w komórkach nabłonka jelita zainfekowanych przez ten mikroorganizm dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego i charakterystycznych zmian powodowanych obecnością toksyny CDT [25]. Oznacza to, że w komórkach *S. enterica* sv. Typhi podjednostka CdtB jest transportowana bez udziału białek CdtC i CdtA. Kolejne obserwacje wykazały, że produkcja toksyny jest ściśle uzależniona od procesu internalizacji bakterii. Białko to powstaje jedynie wtedy, gdy patogen znajduje się wewnątrz zainfekowanej komórki. CdtB musi więc mieć możliwość przedostawania się przez błonę wakuoli, w której *Salmonella* przebywa na pierwszym etapie infekcji (SCV, *Salmonella*-containing vacuole). Genom *Salmonella* koduje dwa systemy sekrecji typu trzeciego (TTSS SPI-1 oraz TTSS SPI-2), żaden z nich nie uczestniczy jednak w transporcie CdtB do

cytozolu komórek eukariotycznych [25]. Spano i wsp. wykazali, że w komórkach *Salmonella* aktywną toksynę CDT tworzą oprócz CdtB, dwa białka, PltA i PltB, kodowane przez tę samą wyspę genomową co CdtB i podobnie jak CdtB produkowane jedynie wewnątrz zainfekowanej przez patogen komórki. PltA (*pertussis-like toxin A*) jest ortologiem ADP-rybozylującej podjednostki A toksyny *Bordetella pertussis*, podczas gdy PltB (*pertussis-like toxin B*) wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do jednego z pięciu składników podjednostki B tej toksyny. Transport CdtB na zewnątrz komórek eukariotycznych zainfekowanych przez *Salmonella*, odbywa się więc prawdopodobnie z udziałem białek PltA i PltB. Kompleks CdtB/PltA/PltB wydzielany jest na zewnątrz komórek eukariotycznych, po czym wykazuje toksyczne działanie zarówno w odniesieniu do komórek wcześniej zainfekowanych (droga autokrynną) jak i niezainfekowanych (droga parakrynną), choć efekt cytotoksyczny jest szybciej widoczny w tym drugim przypadku. Dodanie do środowiska przeciwciał rozpoznających CdtB zapobiega intoksykacji komórek eukariotycznych, zarówno zainfekowanych jak i niezainfekowanych [66, 67]. Zaproponowano o hipotezę, według której komórki nie posiadające receptora dla toksyny CDT, a więc odporne na autokrynną ścieżkę transporu toksyny, mogą stanowić „bezpieczne schronienie” dla komórek *Salmonella* i jednocześnie stanowić źródło toksyny CDT oddziałującej na komórki posiadające na swej powierzchni właściwe receptory. Powyższy stan mógłby odpowiadać za powstawanie chronicznej infekcji, typowej dla serowaru Typhi. Ocena wiarygodności tego modelu wymaga przeprowadzenia jeszcze wielu badań.

## 8. Podsumowanie

CDT jest powszechnie występującą genotoksyną bakterii gramujemnych składającą się z trzech jednostek: CdtA, CdtB i CdtC. Podjednostka CdtB wykazuje aktywność DNazy oraz fosfatazy podczas gdy CdtA i CdtC oddziałują z błoną komórkową komórek docelowych i dostarczają podjednostkę katalityczną do wnętrza komórki. Dokładna rola CdtA i CdtC w procesie intoksykacji komórek, podobnie jak rola aktywności CdtB (nukleaza vs fosfataza) w modulacji cyklu komórkowego nadal wymagają wyjaśnienia. Translokacja CdtB do jądra powoduje uszkodzenie materiału genetycznego gospodarza, uruchamiając kaskadę sygnałów prowadzącą między innymi do aktywacji mechanizmów naprawy materiału genetycznego, zatrzymania cyklu komórkowego na poziomie G1/S lub G2/M oraz indukcji procesów starzenia lub apoptozy komórek. Mechanizm działania CDT sugeruje, że tworzenie DSB może być strategią bakterii pozwalającą na modulowanie funkcji życiowych

gospodarza. Dotychczasowe badania skupiały się szczególnie na analizach aktywności CDT *in vitro*, badaniach biochemicznych a ostatnio strukturalnych. Stosunkowo mało jest dostępnych danych na temat roli toksyn CDT w procesach wirulencji *in vivo*. Potencjalnym mechanizmem działaniem tej genotoksyny jest inhibicja proliferacji komórek nabłonka i indukcja ich apoptozy, co umożliwia inwazję bakterii oraz zahamowanie proliferacji komórek odpowiedzi immunologicznej, czego efektem jest lokalna immunosupresja. Wywoływane objawy chorobowe uwarunkowane aktywnością CDT są różne i zależne od gatunku patogenu i kolonizowanej niszy ekologicznej. I tak np. CDT *A. actinomycetemcomitans* przyczynia się do zapalenia ozębnej powodując zanik tkanki kostnej, podczas gdy CDT *H. ducreyi* opóźnia gojenie się ran po przez wpływ na poziom indukowanej odpowiedzi immunologicznej. Coraz więcej danych eksperymentalnych wskazuje na fakt, że w wypadku chronicznych infekcji powodowanych np. przez *H. hepaticus* czy *C. jejuni* wytwarzanie CDT przez patogenne mikroorganizmy może być przyczyną indukcji procesu nowotworzenia [34].

## Piśmiennictwo

Ze względu na dużą liczbę opublikowanych prac dotyczących genotoksyny CDT cytowana literatura nie jest wyczerpująca aczkolwiek w opinii autorów jest reprezentatywna.

- Bielaszewska M., Sinha B., Kuczius T., Karch H.: Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 552–562 (2005)
- Blažkova H., Krejčíková K., Moudry P., Frisan T., Hodny Z., Bartek J.: Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 357–367 (2010)
- Boesze-Battaglia K., Besack D., McKay T., Zekavat A., Otis L., Jordan-Sciutto K., Shenker B.J.: Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.* **8**, 823–836 (2006)
- Cao L., Bandelac G., Volgina A., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Role of aromatic amino acids in receptor binding activity and subunit assembly of the cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **76**, 2812–2821 (2008)
- Cao L., Volgina A., Huang C.M., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Characterization of point mutations in the *cdtA* gene of the cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol. Microbiol.* **58**, 1303–1321 (2005)
- Carette J.E., Brummelkamp T.R. i wsp.: Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, **326**, 1231–1235 (2009)
- Ceelen L.M., Decostere A., Ducatelle R., Haesebrouck F.: Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol. Res.* **161**, 109–120 (2006)
- Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Lagergard T., Thelestam M.: The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *J. Clin. Invest.* **103**, 107–115 (1999)
- Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Lagergard T., Thelestam M.: Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **68**, 6903–6911 (2000)
- Cortes-Bratti X., Karlsson C., Lagergard T., Thelestam M., Frisan T.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 5296–5302 (2001)
- Damek-Poprawa M., Jang J.Y., Volgina A., Korostoff J., DiRienzo J.M.: Localization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin subunits during intoxication of live cells. *Infect. Immun.* **80**, 2761–2770 (2012)
- Dean P.: Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 1100–1125 (2011)
- Delepelaire P.: Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1694**, 149–161 (2004)
- Elwell C., Chao K., Patel K., Dreyfus L.: *Escherichia coli* CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect. Immun.* **69**, 3418–3422 (2001)
- Elwell C.A., Dreyfus L.A.: DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol. Microbiol.* **37**, 952–963 (2000)
- Eshraghi A., Maldonado-Arocho F.J., Gargi A., Cardwell M.M., Prouty M.G., Blanke S.R., Bradley K.A.: Cytolethal distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* **285**, 18199–18207 (2010)
- Fedor Y., Vignard J., Nicolau-Travers M.L., Boutet-Robinet E., Watrin C., Salles B., Mirey G.: From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cell Microbiol.* **15**, 1–15 (2013)
- Frisan T., Cortes-Bratti X., Chaves-Olarte E., Stenerlow B., Thelestam M.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol.* **5**, 695–707 (2003)
- Frisan T., Cortes-Bratti X., Thelestam M.: Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 495–499 (2002)
- Frisk A., Lebens M., Johansson C., Ahmed H., Svensson L., Ahlman K., Lagergard T.: The role of different protein components from the *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in the generation of cell toxicity. *Microb. Pathog.* **30**, 313–324 (2001)
- Gargi A., Reno M., Blanke S.R.: Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally? *Front. Cell. Microbiol.* **2**, 124 (2012)
- Guerra L., Carr H.S., Richter-Dahlfors A., Masucci M.G., Thelestam M., Frost J.A., Frisan T.: A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS One*, **3**, e2254 (2008)
- Guerra L., Nemeček K.N., Massey S., Tatulian S.A., Thelestam M., Frisan T., Teter K.: A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 489–495 (2009)
- Guerra L., Frisan T. i wsp.: Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol.* **7**, 921–934 (2005)
- Haghjoo E., Galan J.E.: *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4614–4619 (2004)



26. Hassane D.C., Lee R.B., Mendenhall M.D., Pickett C.L.: Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infect. Immun.* **69**, 5752–5759 (2001)
27. Heywood W., Henderson B., Nair S.P.: Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle. *J. Med. Microbiol.* **54**, 207–216 (2005)
28. Hontz J.S., Villar-Lecumberri M.T., Dreyfus L.A., Yoder M.D.: Crystallization of *Escherichia coli* CdtB, the biologically active subunit of cytolethal distending toxin. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 192–195 (2006)
29. Hu X., Stebbins C.E.: Dynamics and assembly of the cytolethal distending toxin. *Proteins*, **65**, 843–855 (2006)
30. Jinadasa R.N., Bloom S.E., Weiss R.S., Duhamel G.E.: Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*, **157**, 1851–1875 (2011)
31. Johnson W.M., Lior H.: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* **4**, 115–126 (1988)
32. Johnson W.M., Lior H.: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb. Pathog.* **4**, 103–113 (1988)
33. Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G.: The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 336–351 (2012)
34. Lagergård T., Keith J.: Cytolethal distending toxin as virulence factor, protective antigen, and target for vaccine development. *Vaccine: Develop. Therapy*, **2**, 51–60 (2012)
35. Lara-Tejero M., Galan J.E.: A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, **290**, 354–357 (2000)
36. Lara-Tejero M., Galan J.E.: CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* **69**, 4358–4365 (2001)
37. Lara-Tejero M., Galan J.E.: Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol.* **10**, 147–152 (2002)
38. Lee R.B., Hassane D.C., Cottle D.L., Pickett C.L.: Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect. Immun.* **71**, 4883–4890 (2003)
39. Li L., Sharipo A., Chaves-Olarte E., Masucci M.G., Levitsky V., Thelestam M., Frisan T.: The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol.* **4**, 87–99 (2002)
40. Lindmark B., Wai S.N. i wsp.: Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* **9**, 220 (2009)
41. Matangkasombut O., Wattanawaraporn R., Tsuruda K., Ohara M., Sugai M., Mongkolsuk S.: Cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces DNA damage, S/G2 cell cycle arrest, and caspase-independent death in a *Saccharomyces cerevisiae* model. *Infect. Immun.* **78**, 783–792 (2010)
42. McSweeney L.A., Dreyfus L.A.: Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cell Microbiol.* **6**, 447–458 (2004)
43. McSweeney L.A., Dreyfus L.A.: Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits. *Infect. Immun.* **73**, 2051–2060 (2005)
44. Mise K., Akifusa S., Watarai S., Ansai T., Nishihara T., Takehara T.: Involvement of ganglioside GM3 in G(2)/M cell cycle arrest of human monocytic cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **73**, 4846–4852 (2005)
45. Mooney A., Clyne M., Curran T., Doherty D., Kilmartin B., Bourke B.: *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. *Microbiology*, **147**, 735–743 (2001)
46. Nescic D., Hsu Y., Stebbins C.E.: Assembly and function of a bacterial genotoxin. *Nature*, **429**, 429–433 (2004)
47. Nescic D., Stebbins C.E.: Mechanisms of assembly and cellular interactions for the bacterial genotoxin CDT. *PLoS Pathog.* **1**, e28 (2005)
48. Nishikubo S., Sugai M. i wsp.: Single nucleotide polymorphism in the cytolethal distending toxin B gene confers heterogeneity in the cytotoxicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **74**, 7014–7020 (2006)
49. Nishikubo S., Sugai M. i wsp.: An N-terminal segment of the active component of the bacterial genotoxin cytolethal distending toxin B (CDTB) directs CDTB into the nucleus. *J. Biol. Chem.* **278**, 50671–50681 (2003)
50. Nowak J.M., Grzanka A., Zurryn A., Stepien A.: The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton. *Post. Hig. Med. Dośw.* **62**, 110–117 (2008)
51. Ohara M., Oswald E., Sugai M.: Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* **136**, 409–413 (2004)
52. Peres S.Y., Oswald E. i wsp.: A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* **24**, 1095–1107 (1997)
53. Rabin S.D., Flitton J.G., Demuth D.R.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces apoptosis in nonproliferating macrophages by a phosphatase-independent mechanism. *Infect. Immun.* **77**, 3161–3169 (2009)
54. Saiki K., Gomi T., Konishi K.: Deletion and purification studies to elucidate the structure of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *J. Biochem.* **136**, 335–342 (2004)
55. Saiki K., Konishi K., Gomi T., Nishihara T., Yoshikawa M.: Reconstitution and purification of cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol. Immunol.* **45**, 497–506 (2001)
56. Sato T., Nishihara T. i wsp.: p53-independent expression of p21(CIP1/WAF1) in plasmacytic cells during G(2) cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **70**, 528–534 (2002)
57. Sert V., Cans C., Tasca C., Bret-Bennis L., Oswald E., Ducommun B., De Rycke J.: The bacterial cytolethal distending toxin (CDT) triggers a G2 cell cycle checkpoint in mammalian cells without preliminary induction of DNA strand breaks. *Oncogene*, **18**, 6296–6304 (1999)
58. Shenker B.J., Besack D., McKay T., Pankoski L., Zekavat A., Demuth D.R.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. *J. Immunol.* **172**, 410–417 (2004)
59. Shenker B.J., Demuth D.R., Zekavat A.: Exposure of lymphocytes to high doses of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces rapid onset of apoptosis-mediated DNA fragmentation. *Infect. Immun.* **74**, 2080–2092 (2006)
60. Shenker B.J., Dlakic M., Walker L.P., Besack D., Jaffe E., LaBelle E., Boesze-Battaglia K.: A novel mode of action for a microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity. *J. Immunol.* **178**, 5099–5108 (2007)
61. Shenker B.J., Hoffmaster R.H., McKay T.L., Demuth D.R.: Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB

- protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. *J. Immunol.* **165**, 2612–2618 (2000)
62. Shenker B.J., McKay T., Datar S., Miller M., Chowhan R., Demuth D.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. *J. Immunol.* **162**, 4773–4780 (1999)
63. Shiloh Y.: ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 71–77 (2001)
64. Smith J.L., Bayles D.O.: The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**, 227–248 (2006)
65. Solyers A.A., Whitt D.D., Bacterial Exotoxins: Important but still a mystery (w) Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. Second edition, Washington D. C., 2002, s. 131–149
66. Spano S., Galan J.E.: A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 15–20 (2008)
67. Spano S., Ugalde J.E., Galan J.E.: Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe*, **3**, 30–38 (2008)
68. Toth I., Herault F., Beutin L., Oswald E.: Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4285–4291 (2003)
69. Toth I., Nougayre J.P., Dobrindt U., Ledger T.N., Boury M., Morabito S., Oswald E.: Cytolethal distending toxin type I and type IV genes are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**, 492–500 (2009)
70. Voth D.E., Broederdorf L.J., Graham J.G.: Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol.* **7**, 241–257 (2012)
71. Wising C., Lagergard T. i wsp.: Toxicity and immunogenicity of purified *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in a rabbit model. *Microb. Pathog.* **33**, 49–62 (2002)
72. Yamada T., Komoto J., Saiki K., Konishi K., Takusagawa F.: Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Protein Sci.* **15**, 362–372 (2006)
73. Yamamoto K., Tominaga K., Sakedai M., Okinaga T., Iwanaga K., Nishihara T., Fukuda J.: Delivery of cytolethal distending toxin B induces cell cycle arrest and apoptosis in gingival squamous cell carcinoma *in vitro*. *Eur. J. Oral Sci.* **112**, 445–451 (2004)
74. Young V.B., Knox K.A., Schauer D.B.: Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect. Immun.* **68**, 184–191 (2000)