

RECIENTES AVANCES SOBRE LOS MECANISMOS DE ACCION DE EXOTOXINAS BACTERIANAS QUE ACTUAN INTRACELULARMENTE

Fernando García*

Keywords: bacterial pathogenesis, exotoxins, A-B toxins, neurotoxins, binary toxins

RESUMEN

Las exotoxinas bacterianas juegan un importante papel en el curso de un proceso infeccioso. A pesar de existir una gran diversidad de toxinas bacterianas, es posible distinguir varios patrones bioquímicos característicos para muchas de ellas. Aun así, se desconoce el mecanismo de acción de numerosas toxinas. En este trabajo se presenta una revisión sobre los mecanismos de acción de las exotoxinas bacterianas, cuyos sitios de acción están localizados intracelularmente. Se hace énfasis sobre los mecanismos de síntesis, las actividades catalíticas y sus elementos blanco en la célula eucariota. Además, se presenta la nueva evidencia sobre los mecanismos de acción de las neurotoxinas tetánica y botulínicas. (*Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1995; 16-3; 85-95)

INTRODUCCION

La patogénesis bacteriana abarca todos aquellos mecanismos bioquímicos y estructuras celulares, conocidos como

factores de virulencia, por medio de los cuales las bacterias logran causar infección y enfermedad (1). El término infección se refiere a la colonización y perpetuación del patógeno en el hospedero, mientras que enfermedad (infecciosa) involucra la afección del estado general del hospedero. Obviamente, no todas las bacterias están en las mismas condiciones para causar infección y enfermedad. Algunas bacterias solamente pueden infectar aquellos individuos cuyo sistema inmunológico está comprometido de alguna manera. De hecho, el proceso infeccioso es un fenómeno multifactorial que depende tanto de la condición inmunológica del hospedero como de los factores de virulencia del microorganismo infectante. Tanto bacterias comensales como patógenas tienen la capacidad de colonizar y sobrevivir transitoriamente en las superficies expuestas del ser humano. Sin embargo, la toxigenicidad y la invasividad son dos propiedades comunes en bacterias patógenas, ausentes en bacterias comensales (1). La producción de toxinas por bacterias patógenas es una característica ventajosa, por cuanto promueve su diseminación a través de células y tejidos, no solamente por el daño causado directamente sobre las células, sino que también alteran mecanismos de defensa del hospedero (2).

* Facultad de Microbiología Universidad de Costa Rica, 2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica Tel: 207-4275 / Fax: 225-2374 / 224-3476

CLASIFICACION DE LAS TOXINAS BACTERIANAS

Existen básicamente dos tipos de toxinas bacterianas. El primer tipo son las endotoxinas, las cuales son componentes estructurales de la célula bacteriana que posee actividad tóxica sobre células y organismos eucariotas. El lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas es el ejemplo clásico de endotoxinas (3). Aunque las endotoxinas forman parte integral de la célula bacteriana, pequeñas cantidades pueden ser liberadas en el transcurso del ciclo de crecimiento bacteriano. El segundo tipo son las exotoxinas, las cuales son de naturaleza proteica (4). Las exotoxinas se pueden clasificar a su vez en dos grandes grupos, de acuerdo con su sitio de acción. Un primer grupo incluye aquellas toxinas que actúan intracelularmente, ya sea sobre componentes celulares que se encuentran en la cara interna de la membrana citoplasmática, o sobre estructuras dispersas en el citoplasma, como el citoesqueleto y los ribosomas. Un segundo grupo está constituido por aquellas exotoxinas que actúan directamente sobre la membrana de la célula blanco. Dicha acción puede causar lisis de la célula, por lo que a este grupo de toxinas se les denomina citolisinas (4). A pesar de su nombre, las exotoxinas bacterianas no son siempre secretadas al espacio extracelular de la célula bacteriana. En el caso de las bacterias Gram-negativas, algunas toxinas son transportadas únicamente hasta el espacio periplásmico. Otras toxinas pueden ser transportadas a través de las dos membranas, por meca-

nismos que requieren la participación de sistemas de translocación específicos (4).

EXOTOXINAS QUE ACTUAN INTRACELULARMENTE

Estas exotoxinas contienen dos tipos de subunidades o, en algunos casos, regiones intramoleculares claramente distinguibles desde el punto de vista funcional. La subunidad A posee actividad enzimática y es el componente tóxico, mientras que la subunidad B es responsable de la unión de la toxina con los receptores localizados en la superficie de la célula blanco. Las subunidades, separadamente, no muestran ningún efecto tóxico sobre las células. En algunos casos la subunidad A requiere de un procesamiento adicional, el cual genera un fragmento denominado A_1 , que es el responsable directo de la actividad tóxica (4).

1. Mecanismos de síntesis.

Existen dos modelos básicos de síntesis de estas exotoxinas. En el primer modelo, un gen contiene la información para la síntesis de una protoxina, la cual es posteriormente procesada por proteólisis para generar la toxina activa. El procesamiento proteolítico puede ocurrir dentro de la bacteria o en el medio extracelular. En este modelo, por lo general, se produce un heterodímero, en donde las subunidades A y B están unidas covalentemente por puentes disulfuro. Algunos ejemplos de este modelo de síntesis incluyen la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, y las neurotoxinas tetánica y botulínicas de *Clostridium tetani* y

C. botulinum, respectivamente (4).

En el segundo modelo, dos genes constituyen un operón y cada uno de ellos contiene la información para la síntesis de cada una de las subunidades. En este modelo, las subunidades pueden ser sintetizadas en forma independiente a partir del ácido ribonucleico mensajero (5, 6). Las subunidades pueden ser luego secretadas por la bacteria hasta el espacio periplásmico o el medio extracelular, sitios en los cuales ocurre el ensamblaje de la toxina (4, 7). Las toxinas sintetizadas de acuerdo a este modelo usualmente están constituidas por una subunidad A asociada a cinco subunidades B. Las toxinas cólera de *Vibrio cholerae* (8, 9), termolábil de *Escherichia coli* (7, 10), así como la toxina Shiga (ST) de *Shigella dysenteriae* y las toxinas similares a la toxina Shiga (SLT del inglés *Shiga-like toxins*) producida por ciertas cepas de *E. coli* y por las otras especies de *Shigella* (11, 12), son ejemplos de toxinas sintetizadas por este mecanismo. Un caso muy particular se presenta con la toxina pertussis de *Bordetella pertussis*, la cual está constituida por cinco diferentes subunidades, cada una de ellas codificada separadamente en un operón (13). Estas subunidades han sido designadas S1, S2, S3, S4 y S5 de acuerdo a su movilidad electroforética. La subunidad S1 posee la actividad tóxica, mientras que las subunidades S2, S3, S4 y S5 son responsables de la unión a receptores (14, 15). Estas cuatro subunidades están organizadas en dos heterodímeros denominados D1 (S2-S4) y D2 (S3-S4), los cuales permanecen unidos entre sí por medio

de la subunidad S5 (16).

Los genes que codifican para estas exotoxinas pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano, como en el caso de las toxinas cólera (8, 9), pertussis (13), la exotoxina A de *P. aeruginosa* (4) y las toxinas ST y SLT en las especies de *Shigella* (11). Otras toxinas están codificadas en elementos extracromosomales, ya sea en plásmidos, como las toxinas tetánica (17), termolábil y termoestables de *E. coli* (4), o en bacteriófagos temperados, como las toxinas botulínicas (17), diftérica (4) y SLT en *E. coli* (6).

2. Mecanismos de unión e internalización.

Como se ha indicado anteriormente, las subunidades B son responsables de la interacción de las toxinas con receptores específicos localizados en la superficie de las células blanco (18). Obviamente, células que carecen de los receptores específicos para una determinada toxina son resistentes a su actividad tóxica. Los receptores para los diferentes tipos de subunidades B son, por lo general, glicolípidos (gangliósidos) o glicoproteínas (8). Así, por ejemplo, la toxina cólera se une específicamente al gangliósido GM1, mientras que la toxina Shiga y similares lo hacen al glicolípidos Gb₃(8). En el caso de las neurotoxinas tetánica y botulínicas parece existir una interacción múltiple con receptores tanto proteicos como lipídicos de la membrana (19-21).

Posteriormente a la interacción entre las subunidades B y los respectivos receptores, la subunidad A es internalizada. Recientes estudios indican la existencia de, al menos, dos mecanismos de internalización de las

exotoxinas a la célula blanco, ambos iniciados a partir de endocitosis mediada por receptor (22). En la endocitosis mediada por receptor ocurre una invaginación de la porción de la membrana que contiene los receptores unidos a las moléculas de la toxina, lo cual conduce luego a la formación de una vesícula intracelular o endosoma. Todavía no se ha dilucidado el proceso por el cual la subunidad A o el correspondiente fragmento A_1 , que puede ser generado por proteólisis al fusionarse el endosoma con los lisosomas, alcanzan el citoplasma celular. El caso de la toxina diftérica ha sido el mejor estudiado (22-24). Al ocurrir la acidificación de los endosomas que contienen la toxina, el bajo pH (alrededor de 5.3) induce un cambio conformacional en la subunidad B, de tal forma que dominios hidrofóbicos normalmente ocultos se exponen en la molécula y se insertan en la membrana del endosoma. Si la acidificación de los endosomas es prevenido incubando las células en presencia de NH_4Cl u otros agentes alcalinizantes, la translocación de la subunidad A al citoplasma no ocurre. En un segundo mecanismo de internalización, otras toxinas, como las toxinas Shiga y similares, cólera, pertussis y la exotoxina A, parecen seguir una ruta alternativa posteriorala endocitosis, involucrando un transporte retrogrado dentro de los endosomas a través del aparato de Golgi hacia el retículo endoplásmico (25). El mecanismo de translocación de la subunidad A hacia el espacio citosólico es aun desconocido para estas toxinas.

3. Actividad enzimática de las exotoxinas.

Una vez que la subunidad A (o el fragmento A_1) ha alcanzado el citoplasma, puede ejercer su efecto tóxico sobre diversos elementos celulares. En todos los casos, eventos importantes de la fisiología celular son alterados de forma tal que favorecen el crecimiento o la dispersión de las bacterias toxigénicas. La naturaleza catalítica de la actividad intracelular de las exotoxinas es la base para su alta potencia: tan solo una molécula de la toxina es suficiente para alterar las moléculas blanco de una célula. Hasta hace poco tiempo, solamente tres tipos de actividad catalítica habían sido identificados en toxinas bacterianas que actúan intracelularmente. Sin embargo, recientemente ha sido descubierto un cuarto tipo de actividad catalítica en las neurotoxinas tetánica y botulínicas, que se discute luego separadamente.

a. Actividad de ADP-ribosiltransferasa.

En varias exotoxinas la subunidad A tiene actividad de ADP-ribosiltransferasa. Las subunidades A con esta actividad catalizan la modificación covalente de un determinado grupo de proteínas, en donde transfieren la molécula ADP-ribosa proveniente del cofactor NAD a un residuo de aminoácido específico. Esta unión covalente altera la conformación de la proteína blanco, lo cual a su vez modifica su función. La alteración de la estructura proteica es la responsable final de los efectos tóxicos observados. Las toxinas cólera (26, 27), termolábil de *E. coli* (28), pertussis (29), diftérica (30), así como la exotoxina A de

P. aeruginosa (31) son ejemplos clásicos de este mecanismo de acción. Por lo general, las proteínas blanco pertenecen a la familia de las proteínas G, las cuales utilizan GTP como cofactor en su funcionamiento normal. Las toxinas cólera, termolábil y pertussis catalizan la ADP-ribosilación de proteínas G que regulan la actividad de la adenilato ciclasa en el sistema de transducción celular, lo cual provoca la elevación de la concentración intracelular de AMP cíclico. Las toxinas cólera y termolábil modifican covalentemente la proteína G_i en un residuo de arginina específico, lo que provoca su activación permanente y la estimulación continua de la adenilato ciclasa (27, 28). La toxina pertussis, por su parte, modifica la proteína G_s, cuya función normal es inhibir la adenilato ciclasa (29). Al estar modificada la proteína G_s es entonces incapaz de ejercer su función normal y, por consecuencia, los niveles intracelulares de AMP cíclico se incrementan. La toxina diftérica y la exotoxina A actúan sobre otro tipo de proteína G, el factor de elongación 2 (FE2), un componente esencial en la síntesis de proteínas (30, 31). Estas dos toxinas catalizan la ADP-ribosilación de un residuo de histidina modificado (diftamida), en la cadena polipeptídica del FE2. Al estar modificado el FE2, la síntesis de proteínas se interrumpe, lo que provoca una severa alteración que conduce a muerte celular.

Recientemente se ha descrito un nuevo grupo de toxinas en algunas especies del género *Clostridium*, conocidas como toxinas binarias (32, 33), las cuales comparten muchas características con las exotoxinas descritas anteriormente. Las toxinas binarias están constituidas

por dos tipos de subunidades. La cadena pesada o subunidad B tiene la capacidad de unirse a receptores en la superficie de la célula blanco. Interesantemente, la cadena liviana o subunidad A se une a la cadena pesada únicamente al estar esta unida al receptor (32). Posteriormente se lleva a cabo el proceso de internalización. Las cadenas livianas muestran también actividad de ADP-ribosiltransferasa. A diferencia de las otras toxinas descritas previamente con la misma actividad, la subunidad A de las toxinas binarias actúa sobre la actina monomérica (actina G) (32, 33). La ADP-ribosilación de la actina G previene la polimerización de las moléculas de la actina G no modificada y promueve la despolimerización de los filamentos de actina (actina F), los cuales son componentes estructurales del citoesqueleto. Los efectos celulares más característicos de las toxinas binarias son cambios en la morfología celular, lo cual conduce a alteraciones en la función celular. Las toxinas binarias incluyen, entre otras, la toxina C2 de *C. botulinum* tipos C y D, la toxina iota de *C. perfringens*, y las toxinas de *C. spiriforme* y *C. difficile* (32, 33).

b. Actividad de N-glicosidasa.

A diferencia de las toxinas anteriormente mencionadas, el fragmento A₁ de la toxina Shiga y de las SLT tiene actividad de N-glicosidasa (11, 12). Este fragmento A₁ cataliza la hidrólisis del residuo de adenina en la posición 4328 cerca del extremo 3' del ARN ribosomal 28S, componente del complejo ribosomal eucariótico. Esta depurinación resulta en la inhibición de la elongación de la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas, debido

a un bloqueo en la unión del ARN de transferencia dependiente del factor de elongación 1 (FE1).

c. Actividad de adenilato ciclasa.

Un tercer tipo de actividad lo encontramos en las toxinas EF de *Bacillus anthracis* (34, 36), y la adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella pertussis* (37). En estos casos, las toxinas mismas tienen actividad de adenilato ciclasa y aumentan directamente la concentración intracelular de AMP cíclico. La toxina antrax producida por *B. anthracis* el agente causal del carbunco, consiste de tres proteínas separadas: el antígeno protector (PA), el factor letal (LF) y el factor de edema (EF) (34-36). Cada proteína por separado no tiene actividad tóxica. Sin embargo, en combinación constituyen los dos componentes tóxicos de la toxina antrax. PA en combinación con LF, heterodímero al que se le ha dado el nombre de toxina letal, provoca lisis de macrófagos de ratones y ratas, y es considerado como el responsable de los efectos letales en estos animales (34, 35). El mecanismo intracelular para la acción de LF es aún desconocido (35). El PA junto con EF, heterodímero designado como toxina de edema, produce edema e inhibe la función de células fagocíticas. Los efectos de la toxina de edema resultan de la elevación de las concentraciones intracelulares de AMP cíclico, debido a que EF es una adenilato ciclasa que ingresa a la célula gracias a PA y actúa sobre el ATP citosólico (38). El componente PA representa la subunidad B, el cual media la internalización de los componentes tóxicos (36). Los complejos PA-EF y PA-LF son

internalizados por medio de endosomas ácidos y presumiblemente son entonces translocados al citoplasma de la célula blanco (36). La adenilato ciclasa-hemolisina de *B. pertussis* pertenece a un grupo de citolisinas denominadas RTX (del inglés repeats in the toxin). Para su internalización, la adenilato ciclasa-hemolisina forma un poro en la membrana de la célula blanco, a través del cual es translocada hacia el citoplasma (37).

4. Mecanismos de acción de las neurotoxinas de *C. tetani* y *C. botulinum*.

Las bacterias anaerobias *C. tetani* y *C. botulinum* producen varias neurotoxinas estructuralmente relacionadas, las cuales se conocen por ser potentes inhibidores de la liberación de neurotransmisores por parte de las vesículas presinápticas en las terminaciones nerviosas. Las neurotoxinas son sintetizadas como una única cadena polipeptídica que es proteolíticamente procesada para generar la toxina madura, que consiste de una cadena pesada (H) unida a una cadena liviana (L) a través de un puente disulfuro (4). Es generalmente aceptado que las cadenas H (subunidad B) controlan la unión, internalización, distribución intraneuronal y, finalmente, translocación de las cadenas L (subunidad A) al citosol (39). Se han descrito siete serotipos de neurotoxinas botulínicas (BoNT-A, -B, -C1, D, -E, -F y -G), las cuales, gracias a la especificidad de sus respectivas cadenas H, actúan sobre las neuronas motoras periféricas, en donde causan un bloqueo de la liberación de acetilcolina y así producen las

manifestaciones clínicas del botulismo (parálisis flácida). En contraste, la toxina tetánica (TeTx) sufre un transporte axonal retrógrado hasta el sistema nervioso central, en donde bloquea la liberación de neurotransmisores inhibitorios, resultando en las manifestaciones clínicas del tétano (parálisis rígida). A pesar de estas diferencias, es conocido que las cadenas L de todas estas neurotoxinas son el componente activo que bloquean la exocitosis tan pronto como son liberadas al citoplasma de las neuronas. Recientemente se ha logrado demostrar que las cadenas L tienen actividad de proteasa dependiente de zinc (Zn-metaloproteasa). El blanco de la actividad proteolítica de las cadenas L es un conjunto de proteínas llamadas sinaptobrevinas, responsables del proceso de exocitosis que libera los neurotransmisores (39, 40). Las sinaptobrevinas son proteínas integrales de membrana localizadas en la membrana de las vesículas sinápticas que transportan y secretan los neurotransmisores. Las cadenas L cortan las moléculas de sinaptobrevina en un único sitio y las vesículas sinápticas son incapaces de descargar su contenido en la hendidura sináptica. Desde este punto de vista, las neurotoxinas botulínicas y tetánica pueden ser consideradas como una nueva clase de toxinas bacterianas, dada su novedosa actividad catalítica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De la presente revisión se obtiene una serie de conclusiones que nos permiten entender el papel biológico de las exotoxinas bacterianas. Sin embargo, estas conclusiones deben ser

consideradas como iniciales, dado que aún existe un numeroso grupo de toxinas bacterianas cuyo perfil bioquímico y su participación directa en el proceso infeccioso no han podido ser determinados. En primer lugar, es posible encontrar determinados patrones bioquímicos entre los diversos mecanismos de acción de las exotoxinas bacterianas. Sin embargo, toxinas estructural y funcionalmente similares pueden tener efectos totalmente diversos dependiendo del agente bacteriano que las produce y el cuadro clínico ocasionado por dicho agente. Así, aunque la toxina diftérica y la exotoxina A de *P. aeruginosa* catalizan intracelularmente reacciones idénticas y ambas se distribuyen sistémicamente, los procesos infecciosos resultantes son completamente diferentes. Estas diferencias pueden ser explicadas, al menos en parte, a nivel de las especificidades por las células blanco que cada una de dichas toxinas atacan (41). Por otra parte, la presencia de toxinas similares, pertenecientes a una misma familia, dispersas naturalmente entre diferentes especies bacterianas como, por ejemplo, la distribución observada para las toxinas similares a la toxina Shiga, permiten pensar en recientes relaciones evolutivas que involucran la transferencia horizontal de determinantes genéticos. Además, el conocimiento sobre las exotoxinas es fundamental para comprender como estos microorganismos son capaces de causar tal diversidad de cuadros clínicos, tanto en el ser humano como en animales. Más aún, este conocimiento puede ser de provecho para el estudio de mecanismos celulares que son inhibidos por diferentes toxinas, o

bien para la utilización de toxinas como inmunotoxinas para el tratamiento de procesos neoplásicos o en preparaciones de neurotoxinas altamente purificadas para el tratamiento de ciertos desórdenes neuronales.

ABSTRACT

Bacterial toxins play an essential role in the outcome of infections. In spite of the great diversity of the bacterial exotoxins, it is possible to distinguish various characteristic biochemical patterns for several of them. However, the mechanisms of action of many toxins are still unknown. In this review, the mechanisms of action of those bacterial exotoxins which act intracellularly are presented. Their synthesis processes, catalytic activities and target molecules in the eucaryotic cells are discussed. Furthermore, the new evidence on the action mechanisms of the tetanus and botulinum neurotoxins is also presented.

BIBLIOGRAFÍA

1. Finlay B. B., Falkow S.: Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 1989; 53: 210-230.
2. Hensler T., Koller M., Alouf J. E., Konig W.: Bacterial toxins induce heat shock proteins in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 179:872-879.
3. Morrison D. C., Ryan J. L.: Endo toxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* 1987; 38: 417-432.
4. Middlebrook J. L., Dorland R. B.: Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* 1984; 48:199-221.
5. Habib N. F., Jackson M. P.: Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. *J. Bacteriol.* 1993; 175:597-603.
6. Jackson M. P., Neill R. J., O'Brien A. D., Holmes R. K., Newland J. W.: Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987; 44:109-114.
7. Streatfield S. J., Sandkvist M., Sixma T. K., Bagdasarian M., Hol W. G. J., Hirst T. R.: Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89: 12140-12144
8. Dams E., De Wolf M., Dierick W.: Nucleotide sequence analysis of the CT operon of the *Vibrio cholerae* classical strain 569B. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1090:139-141.
9. Lockman H. A., Galen J. E., Kaper J. B.: *Vibrio cholerae* enterotoxin genes: nucleotide sequence analysis of DNA encoding ADP-ribosyltransferase. *J. Bacteriol.* 1984; 159:1086-1089.
10. Gill D. M., Clements J. D., Robertson D. C., Finkelstein R. A.: Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin. *Infect. Immun.* 1981; 33:677-682.
11. O'Brien A. D., Holmes R. K.: Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1987, 51:206-220.
12. Tesh V. L., O'Brien A. D.: The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Molec. Microbiol.* 1991; 5:1817-1822.
13. Gross A., Arico B., Rappuoli R.: Genetics of pertussis toxin. *Mol. Microbiol.* 1989; 3:119-124.
14. Heerze L. D., Chong P. C. S., Armstrong G. D.: Investigation of the lectin-like binding domains in pertussis toxin using synthetic peptide sequences. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:25810-25815.

15. Saukkonen K., Burnette W. N., Mar V. L., Masure H. R., Tuomanen E. I.: Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89:11b 122.
16. Antonie R., Loch C.: Roles of the disulfide bond and the carboxyterminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect. Immun.* 1990; 58:1518-1526.
17. Eklund M.W., Poysky F.T., Habig W. H.: Bacteriophage and plasmids in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani* and their relationship to production of toxins. In: Simpson L. L. (ed.) *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. Academic Press, San Diego, 1989; 25-51
18. Eidels L., Proia R. L., Hart D. A.: Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 1983; 47:596-620.
19. Bakry N., Kamata Y., Sorensen R., Simpson L. L.: Tetanus toxin and neuronal membranes: the relationship between binding and toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 258:613-619.
20. Schengrund C.-L., DasGupta B. R., Ringler N. J.: Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT_{1b} and derivatives thereof. *J. Neurochem.* 1991; 57: 1024-1032.
21. Schiavo G., Ferrari G., Rossetto O., Montecucco C.: Tetanus toxin receptor: specific cross-linking of tetanus toxin to a protein of NGF-differentiated PC 12 cells. *FEBS Lett.* 1991; 290:227-230.
22. Olsnes S., Moskaug J. O. Stenmark H., Sandvig K.: Diphtheria toxin entry: protein translocation in the reverse direction. *Trends Biochem. Sci.* 1988; 13:348-351.
23. Draper R. K., Simon M. I.: The entry of diphtheria toxin into mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J. Cell Biol.* 1980; 87:849-854.
24. Sandvig K., Olsnes S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J. Cell Biol.* 1980; 87:828-832.
25. Janicot M., Fouque F., Desbuquois B.: Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:12858-12865.
26. Cassel D., Pfeuffer T.: Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978; 75:2669-2673.
27. Gill D. M., Meren R.: ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978; 75: 3050-3054.
28. Gill D. M., Richardson S. H.: Adenosine diphosphateribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile entero-

- toxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 1980; 141:64-70.
29. Bokoch G. M., Katada T., Northup J. K., Hewlett E. L., Gilman A. G.: Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.* 1983; 258:2072-2075.
 30. Collier R. J.: Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* 1975; 39:54-85.
 31. Iglewski B. H., Kabat D.: NADdependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975; 72:2284-2288.
 32. Aktories K., Wegner A.: ADP-ribosylation of actin by clostridial toxins. *J. Cell Biol.* 1989; 109:1385-1387.
 33. Considine R. V., Simpson L. L.: Cellular and molecular actions of binary toxins possessing ADP-ribosyltransferase activity. *Toxicon* 1991; 29:913-936.
 34. Pezard C., Berche P., Mock M.: Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 1991; 59:3472-3477.
 35. Quinn C. P., Singh Y., Klimpel K. R., Leppla S. H.: Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by inframe insertion mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:20124-20130.
 36. Singh Y., Klimpel K. R., Quinn C. P., Chaudhary V. K., Leppla S. H.: The carboxy terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:15493-14497.
 37. Hewlett E. L., Gray L., Allietta M., Ehrmann I., Gordon V. M., Gray M.C.: Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: conformational change associated with toxin activity. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:17503-17508.
 38. Leppla S.H.: Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations in eucaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982; 79:3162-3166.
 39. Schiavo G., Poulain B., Benfenati F., DasGupta B. R., Montecucco C.: Novel targets and catalytic activities of bacterial protein toxins. *Trends Microbiol.* 1993; 1:170-174.
 40. Yamasaki S., Baumeister A., Binz T., Blasi J., Link E., Cornile F., Roques B., Fykse E. M., Sudhof T. C., Jahn R., Niemann H.: Cleavage of members of the synaptobrevin VAMP family by types D and F botulin neurotoxins and tetanus toxin. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 12764-12772.
 41. Middlebrook J. L., Dorland R. B.: Response of cultured mammalian cells to the exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium diphtheriae*: differential cytotoxicity. *Can. J. Microbiol.* 1977; 23: 183-189.