

УДК 579.222

## Бактериальные токсины: друзья или враги?

Клер К. Шмитт, Карен С. Мейсик, Алисон Д. О'Бразн  
Объединенный университет медицинских наук, Бетесда, Мэриленд, США

Переведена и печатается с согласия авторов и редакции журнала  
«Emerging Infectious Diseases» 1999; 5(2): 224-33

Многие бактерии выделяют токсины, являющиеся основными факторами вирулентности. Мы остановимся на семи бактериальных токсинах, продуцируемых хорошо известными патогенными микроорганизмами. Эти токсины отличаются различными механизмами действия в макроорганизме и включают:  $\beta$ -токсин *Staphylococcus aureus*, шигеллезный токсин, цитотоксический некротизирующий фактор первого типа, термостабильный токсин кишечной палочки *Escherichia coli* ботулотоксин, столбнячный нейротоксин и токсин *S. aureus*, вызывающий ток-

сический шок. В данной статье будут обсуждены структура и синтез, механизм действия и вклад токсинов в вирулентность, а также роль некоторых из них в передаче сигналов в эукариотических клетках и полезное использование токсинов и анатоксинов (токсоидов). Авторы стремились показать важность изучения бактериальных токсинов как для фундаментальной, так и для прикладной науки.

**Ключевые слова:** токсины, токсоиды, суперантигены, бактерии, инфекции.

## Bacterial Toxins: Friends or Foes?

Clare K. Schmitt, Karen C. Meysick, Alison D. O'Brien

Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, USA  
Translated and reprinted with permission from Emerging Infectious Diseases 1999;5(2):224-33

Many emerging and reemerging bacterial pathogens synthesize toxins that serve as primary virulence factors. We highlight seven bacterial toxins produced by well-established or newly emergent pathogenic microbes. These toxins, which affect eukaryotic cells by a variety of means, include *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxin, Shiga toxin, cytotoxic necrotizing factor type 1, *Escherichia coli* heat-stable toxin, botulinum and tetanus neurotoxins, and *S. aureus* toxic-shock syndrome toxin. For each, we

discuss the information available on its synthesis and structure, mode of action, and contribution to virulence. We also review the role certain toxins have played in unraveling signal pathways in eukaryotic cells and summarize the beneficial uses of toxins and toxoids. Our intent is to illustrate the importance of the analysis of bacterial toxins to both basic and applied sciences.

**Key words:** toxins, toxoids, superantigens, bacteria, infections.

## Введение

С тех пор, как Ру (Roux) и Йерсен (Yersin) выделили в 1888 г. дифтерийный токсин [1], микробные токсины были признаны основными факторами вирулентности различных патогенных бактерий. Бактериальные токсины были определены как раство-

Контактный адрес:  
Alison D. O'Brien,  
Uniformed Services University of the Health Sciences,  
Department of Microbiology and Immunology,  
4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD 20814, USA  
Fax: 301-295-3773; e-mail: aobrien@mxh.usuhs.mil

римые вещества, которые изменяют нормальный метаболизм клеток хозяина и оказывают тем самым вредное влияние на макроорганизм [2].

Действительно, основные симптомы заболеваний, вызываемых *Corynebacterium diphtheriae* (дифтерия), *Bordetella pertussis* (коклюш), *Vibrio cholerae* (холера), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Clostridium botulinum* (ботулизм), *Clostridium tetani* (столбняк) и энтерогеморрагической *Escherichia coli* (кровавая диарея и гемолитико-уремический синдром), являются результатом действия токсинов, продуцируемых перечисленными микроорганизмами. Знания о ведущей роли токсинов в возникновении симптомов этих и ряда других заболеваний позволили использовать инактивированные токсины (токсоиды) в качестве вакцин, что внесло большой вклад в сохранение и укрепление здоровья общества.

В данной статье приводится обзор различных бактериальных токсинов, разделенных в соответствии с механизмом их действия на следующие группы (см. таблицу):

- повреждающие клеточные мембраны;
- ингибирующие белковый синтез;
- активирующие пути метаболизма, контролируемые вторичными мессенджерами;
- ингибирующие высвобождение нейромедиаторов;
- активирующие иммунный ответ макроорганизма.

Подробно обсуждаются токсины, которые продуцируются как хорошо изученными (Stx-токсин энтерогеморрагической *E. coli*), так и недавно привлечшими всеобщее внимание ( $\alpha$ -токсин полирезистентного *S. aureus*) микроорганизмами: шигеллезный токсин (Stx-токсин), цитотоксический некротизирующий фактор первого типа (CNF1), термостабильный токсин кишечной палочки (ST), ботулотоксин, столбнячный нейротоксин и токсин *S. aureus*, вызывающий токсический шок (TSST). Кроме того, на примере выбранных веществ можно получить представление о различной структуре и механизмах действия токсинов (ST, CNF1, нейротоксины и TSST).

### Где тонко, там и рвется

Многие бактериальные экзотоксины (гиалуронидазы, коллагеназы и фосфолипазы) способны повреждать экстрацеллюлярные структуры или плазматическую мембрану эукариотических клеток с помощью ферментативного гидролиза или в результате формирования пор. Эти повреждения могут вызвать не только прямой лизис клеток, но также способствовать распространению бактерий в ма-

кроорганизме. Яркими представителями этой группы являются:  $\alpha$ -токсин *Clostridium perfringens*, который действует подобно фосфолипазе C, стрептокиназа *Streptococcus pyogenes*, гидролизующая плазминоген (профибринолизин) до пламина (фибринолизин) и растворяющая тромбы, и клостридиальные коллагеназы [3–5].

Порообразующие токсины в соответствии со своим названием формируют трансмембранные поры и нарушают селективный вход и выход ионов через плазматическую мембрану. Эта группа токсинов включает RTX-токсины грамотрицательных бактерий, стрептолизин O, выделяемый *S. pyogenes*, и  $\alpha$ -токсин *S. aureus*.

$\alpha$ -Токсин *S. aureus* может рассматриваться в качестве прототипа олигомеризующих порообразующих цитотоксинов. Ген, кодирующий  $\alpha$ -токсин, находится в виде единичной копии в хромосоме большинства патогенных штаммов *S. aureus*, и его экспрессия регулируется внешними факторами на уровне транскрипции дополнительным геном-регулятором (*agr*) [6,7]. Токсин синтезируется в виде молекулы-предшественника, состоящей из 319 аминокислот и имеющей на N-конце сигнальную последовательность из 26 аминокислотных остатков. Выделяемый готовый токсин (протомер) представляет собой гидрофильную молекулу молекулярной массой около 33 кДа, в которой отсутствуют остатки цистеина [6–8].

В настоящее время изучена кристаллографическая структура завершенной поры, образованной  $\alpha$ -токсином [9]. На поверхности плазматической мембраны 7 протомеров токсина образуют грибовидный гептамер (232 кДа), содержащий 3 различных домена (рис. 1А) [9, 10]. Домены, формирующие "шляпку" и "край", расположены на внешней поверхности плазматической мембраны, а домен "ножки" служит трансмембранным каналом.

$\alpha$ -Токсин обладает цитолитическими свойствами в отношении различных типов клеток, включая моноциты, лимфоциты, эритроциты, тромбоциты и эндотелиоциты человека. Различают три последовательные стадии повреждения клеточной мембраны под действием  $\alpha$ -токсина. Протомеры токсина сначала связываются с мембраной клетки-мишени при помощи неустановленных рецепторов или неспецифически абсорбируются фосфотидилхолином или холестерином, входящими в состав билипидного слоя мембраны [6, 8]. Во-вторых, связанные с мембраной протомеры олигомеризуются в нелитический гептамерный комплекс. И в заключение, гептамер претерпевает ряд конформационных изменений, конечным результатом которых является формирование "ножки", которая проникает

### Характеристика бактериальных токсинов\*

Микроорганизм	Токсин	Механизм действия	Мишень	Заболевание	Роль в развитии инфекции
1	2	3	4	5	6
<b>Повреждающие мембраны</b>					
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Аэролизин	Образование пор	Гликофорин	Диарея	(+)
<i>Clostridium perfringens</i>	О-перфринголизин	«	Холестерин	Газовая гангрена**	?
<i>Escherichia coli</i>	Гемолизин***	«	Плазматическая мембрана	ИМВП	(+)
<i>Listeria monocytogenes</i>	О-листериолизин	«	Холестерин	Пищевые системные инфекции, менингит	(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	α-Токсин	«	Плазматическая мембрана	Абсцессы**	(+)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Пневмолизин	«	Холестерин	Пневмония**	(+)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	О-стрептолизин	«	«	Тонзиллофарингит, скарлатина**	?
<b>Ингибиторы синтеза белков</b>					
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Дифтерийный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	Фактор элонгации 2	Дифтерия	+
<i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>	Токсин Шига	N-гликозидаза	28S рРНК		Геморрагический колит, ГУС*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Экзотоксин А	АДФ-рибозил-трансфераза	Фактор элонгации 2	Пневмония**	(+)
<b>Активаторы вторичных мессенджеров</b>					
<i>E. coli</i>	CNF	Деамидаза	Rho G-белки	ИМВП	?
	LT	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белки	Диарея	+
	ST***	Стимулирует гуанилатциклазу	Рецептор гуанилатциклазы	«	+
	CLTD***	Блокирует G2	Неизвестно	«	(+)
	EAST	Подобен ST (?)	«	«	?
<i>Bacillus anthracis</i>	Отечный фактор	Аденилатциклаза	АТФ	Сибирская язва	+
<i>Bordetella pertussis</i>	Дермонекротический токсин	Деамидаза	Rho G-белки	Ринит	(+)
	Коклюшный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белки	Коклюш	+
<i>Clostridium botulinum</i>	Токсин С2	«	Мономерный G-актин	Ботулизм	?
	Токсин С3	«	Rho G-белок	Ботулизм	?
<i>Clostridium difficile</i>	Токсин А	Гликозил-трансфераза	Rho G-белки	Диарея/псевдомембранозный колит	(+)
	Токсин В	«	«	«	?
<i>Vibrio cholerae</i>	Холерный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белки	Холера	+
<b>Активаторы иммунного ответа</b>					
<i>S. aureus</i>	Энтеротоксины	Суперантиген	Рецептор Т-клеток и HLA II	Пищевые интоксикации**	+
	Эксфолиатины	Суперантиген (и сериновая протеаза?)	«	Синдром “ошпаренной” кожи**	+

1	2	3	4	5	6
	Токсин синдрома токсического шока	Суперантиген	«	Синдром токсического шока**	+
<i>S. pyogenes</i>	Пирогенные экзотоксины	Суперантигены	Рецептор Т-клеток и МНС II	Скарлатина/ синдром токсического шока**	+
<b>Протеазы</b>					
<i>B. anthracis</i>	Летальный фактор	Металлопротеаза	MARKK1/MARKK2	Сибирская язва	+
<i>C. botulinum</i>	Нейротоксины А-Г	Zn-металло-протеаза	VAMP/синапто-бrevин, SNAP-25, синтаксин	Ботулизм	+
<i>Clostridium tetanus</i>	Столбнячный токсин	Zn-металло-протеаза	VAMP/синапто-бrevин	Столбняк	+

\* Аббревиатуры: CNF – цитотоксический некротизирующий фактор; LT – термолabileльный токсин; ST – термостабильный токсин; CLTD – цитолетальный разрыхляющий токсин; EAST – термостабильный токсин энтероагрегативной *E. coli*; МНС II – главный комплекс гистосовместимости класса II; MARKK – митогенактивируемая киназа протеинкиназа; VAMP – везикулоассоциированный мембранный белок; SNAP-25 – синаптосомальноассоциированный белок; ИМВП – инфекции мочевыводящих путей; ГУС – гемолитико-уремический синдром.

\*\* Другие заболевания также связаны с данным микроорганизмом.

\*\*\* Токсин продуцируют также бактерии других родов.

+ – имеются доказанные причинно-следственные взаимоотношения между токсином и заболеванием.

(+) – роль данных токсинов в патогенезе показана на животных моделях или на клеточной культуре.

? – роль данных токсинов в патогенезе неизвестна.

сквозь цитоплазматическую мембрану [9, 10]. Через образовавшуюся пору происходит вход и выход небольших молекул и ионов, что ведет к набуханию и гибели клеток, имеющих ядро, и осмотическому лизису эритроцитов.

Кроме того, отмечено, что при образовании пор запускаются вторичные процессы, которые также могут обуславливать развитие патологических последствий. Эти процессы включают активацию эндонуклеаз, увеличение экзоцитоза тромбоцитов, высвобождение цитокинов и медиаторов воспаления, а также выделение эйкозаноидов [6, 8]. На примере нескольких экспериментальных моделей на животных было показано, что  $\alpha$ -токсин является фактором вирулентности *S. aureus* [6, 8], однако его точная роль в развитии стафилококковых заболеваний у человека остается неясной.

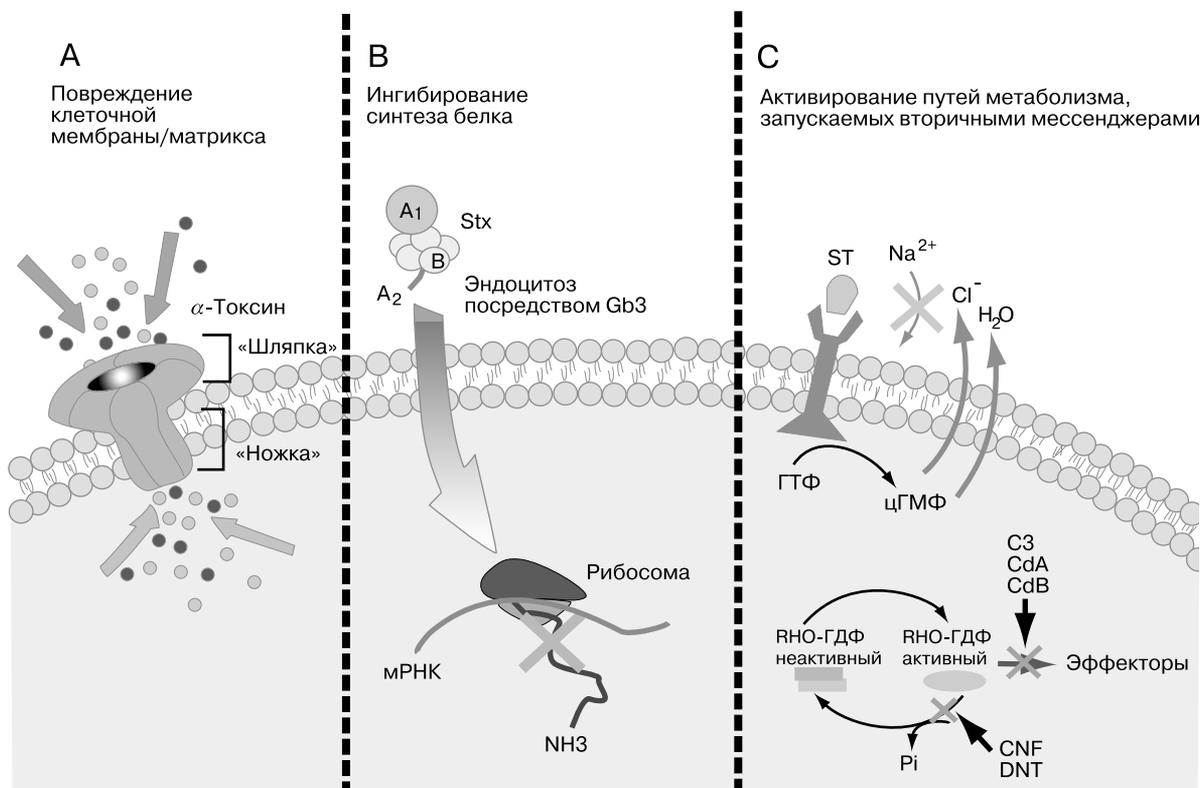
### Именем токсина, остановитесь

Бактериальные токсины, объединенные во второй класс, поражают клетки-мишени в результате подавления синтеза белков. Субстратами для этих токсинов являются фактор элонгации и рибосомальная РНК. Так, дифтерийный токсин и экзотоксин А *Pseudomonas* spp. вызывают АДФ-рибозилирование фактора элонгации 2 (EF2) [11, 12], нарушая синтез белка. *Shigella dysenteriae* серотипа 1 и некоторые другие клинически значимые бактерии, например Stx-продуцирующие *E. coli* (STEC), вырабатывают Stx-токсины (веротоксины). Stx-токсины инактиви-

руют рибосомальную РНК, нарушая ее взаимодействие с факторами элонгации [13, 14]. Подавление белкового синтеза данной группой токсинов приводит в конечном итоге к гибели клетки-мишени.

Stx-токсины являются мощными цитотоксинами и могут быть разделены на две группы, отличающиеся по антигенным свойствам и имеющие 50 – 60% гомологии: Stx/Stx1- и Stx2-токсины [15–17]. Stx-токсин *S. dysenteriae* серотипа 1 и Stx1-токсин *E. coli* отличаются только одной аминокислотой. Различные модификации Stx2-токсинов обнаружены у штаммов *E. coli*. Хотя Stx2-токсин рассматривается в качестве прототипа этой группы, были найдены различные модификации, отличающиеся по антигенным свойствам, степени сродства к рецепторам и способности активироваться под действием интестинальной слизи. Некоторые из перечисленных свойств обусловлены различиями в одном-двух нуклеотидах кодирующих генов.

Ген *stx* у *S. dysenteriae* всегда расположен на хромосоме, тогда как гены, кодирующие Stx1 и Stx2, могут входить в состав бактериальной хромосомы или генетического материала лизогенных бактериофагов. Гены, определяющие А и В субъединицы Stx-токсинов (*stxA* и *stxB* соответственно), объединены в оперон. Оперон Stx/Stx1-токсинов (но не Stx2) содержит область, ответственную за регуляцию экспрессии Stx- и Stx1-токсинов, которая в свою очередь зависит от наличия ионов железа. На экспрессию Stx2-токсина не влияют ни наличие же-



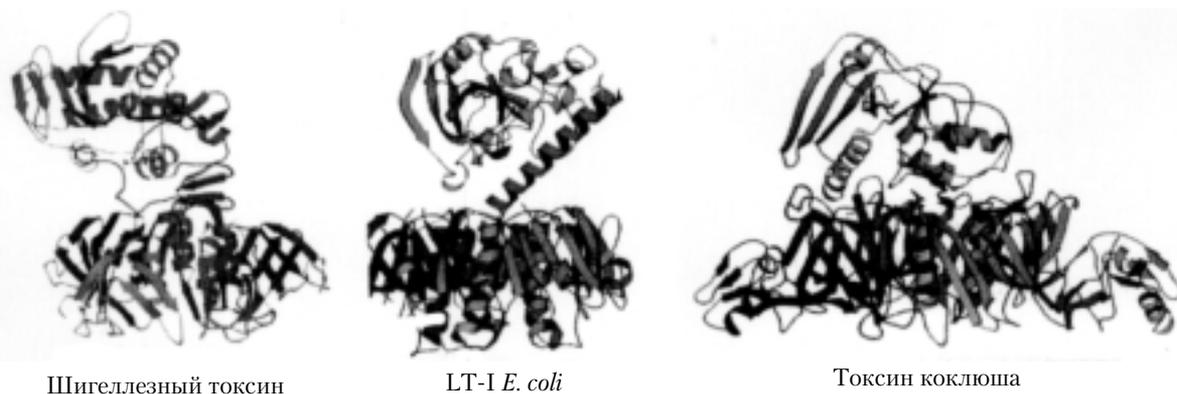
**Рис. 1.** Механизм действия некоторых бактериальных токсинов. А – повреждение клеточных мембран под действием  $\alpha$ -токсина *S. aureus*. После связывания и олигомеризации «ножка» гептамера  $\alpha$ -токсина внедряется в пораженную клетку и нарушает вход и выход ионов. В – подавление белкового синтеза токсином Шига (Stx). Токсин, состоящий из ферментативно-активной (А) и пяти связывающих (В) субъединиц, проникает в клетку с помощью глоботриазил-перамидного (Gb3) рецептора. Субъединица А, действуя подобно N-гликозидазе, отщепляет адениновый остаток от 28S рРНК, что останавливает синтез белков. С – механизм действия бактериальных токсинов, активирующих вторичные мессенджеры. Связывание термостабильных энтеротоксинов (ST) с рецептором гуанилатциклазы приводит к увеличению образования циклического ГМФ (цГМФ), который отрицательно влияет на транспорт электролитов. Экзоэнзим C3 *C. botulinum* (C3) и токсины А и В *C. difficile* (CdA и CdB) вызывают соответственно рибозилирование или гликозилирование АДФ, что инактивирует Rho ГТФ-связывающие белки. Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) *E. coli* и дермонекротический токсин (DNT) *Bordetella* spp. активирует Rho за счет дезаминирования

леза, ни другие внешние факторы. Однако кишечная слизь усиливает активность некоторых разновидностей Stx2-токсина [18]. Stx-токсины, которые имеют типичные лидерные последовательности на N-конце, не способны активно выделяться через стенку бактериальной клетки. Предполагается, что в данном случае токсин выходит во внешнюю среду при лизисе клетки.

Stx-токсины имеют типичную АВ-структуру, то есть ферментативно активная субъединица А нековалентно связана с субъединицей В, непосредственно взаимодействующей с мишенью. Уже хорошо изучена кристаллическая структура пентамера В в Stx1-токсине [19] и холеротоксина в Stx-токсине [20] (рис. 2). Подобная АВ-структура токсина характерна для термолabile токсина *E. coli* [21], холерного токсина и токсина коклюша [22] (рис. 2).

Зрелые мономерные субъединицы А и В имеют молекулярную массу около 35 и 7,5 кДа соответственно, при этом холеротоксин содержит 5 молекул субъединицы В. Пентамер субъединицы В регулирует связывание холеротоксина с гликолипидными рецепторами на поверхности чувствительных эукариотических клеток. После связывания полипептид А расщепляется на ферментативно активную часть А<sub>1</sub> и часть А<sub>2</sub>, соединенные дисульфидной связью. А<sub>2</sub>-часть служит связующим звеном между фрагментом А<sub>1</sub> и пентамером В.

Субъединица А, обладающая ферментативной активностью, действует как N-гликозидаза, отщепляя единичный адениновый остаток от 28S рибосомальной РНК [13, 14]. Подобная депуринизация в конечном итоге подавляет синтез белка в пораженной клетке (рис. 1В). При этом к действию N-гли-



**Рис. 2.** Кристаллическая структура токсина Шига (*S. dysenteriae*) [20], термолabile токсина I *E. coli* (LT-I) [21] и коклюшного токсина [22]

козидазы одинаково чувствительны рибосомы про- и эукариот [23].

STEC лишь недавно приобрела статус "проблемного" микроорганизма [24] после вспышки в 1983 г. геморрагического колита, вызванного употреблением гамбургеров, подвергнутых недостаточной термической обработке [25, 26]. STEC O157:H7 ежегодно вызывает в США около 20 тыс. случаев геморрагического колита [27], тысячу случаев гемолитико-уремического синдрома и 100 летальных исходов [27].

### Не стреляйте в мессенджер

Бактериальные токсины могут нарушать функции различных клеточных белков, не вызывая непосредственной гибели клеток. Активация или модификация вторичных мессенджеров под действием токсинов может обусловить значительные нарушения процессов передачи сигналов, имеющих критическое значение в поддержании разнообразных функций клеток. Чтобы продемонстрировать различия подобных токсинов, рассмотрим термостабильные энтеротоксины и токсин CNF типа 1 (CNF1).

### Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF)

CNF типа 1 и 2 (CNF1/2), продуцируемый *E. coli*, принадлежит к группе бактериальных токсинов, модифицирующих Rho-подсемейство небольших ГТФ-связывающих белков, которые являются регуляторами актинового цитоскелета [28, 29]. Большинство токсинов этого семейства, включающего основные клостридиальные цитотоксины и С3-экзоэнзим *C. botulinum*, инактивируют Rho [29]. CNF1, CNF2 и дермoneкротический токсин *Bordetella* spp. являются уникальными представителями своего семейства, так как обладают способно-

стью активировать Rho (рис. 1B) [29–32]. CNF1 сходен с CNF2 по аминокислотному составу на 99%, однако далее будет детально рассмотрен лишь CNF1 в связи с его ролью в развитии внекишечных инфекций, вызванных *E. coli*, особенно инфекций мочевыводящих путей.

Ген, кодирующий CNF1, локализован на хромосоме уропатогенных *E. coli* в составе так называемого "островка патогенности" [33, 34]. Токсин синтезируется в виде гидрофильного полипептида с молекулярной массой примерно 115 кДа, который сохраняется первое время в цитоплазме из-за отсутствия сигнальной последовательности [33]. Недавние исследования структуры и действия CNF1 показали, что токсин имеет два различных четко выраженных домена: связывающий и ферментативный [35]. N-концевая часть CNF1, включающая два потенциальных трансмембранных домена, содержит домен, ответственный за связывание с клеткой-мишенью. Эта часть молекулы сходна по аминокислотному составу с токсином *Pasteurella multocida* – мощным митогеном, который считают этиологическим фактором развития прогрессирующего атрофического ринита у свиней [33, 35]. С-концевая часть представляет собой ферментативный домен токсина. Он имеет участок длиной 100 аминокислотных остатков, гомологичный дермoneкротическому токсину, который, возможно, является активным центром токсина [33, 35].

В эукариотических клетках, пораженных CNF1, развивается ряд характерных явлений: складчатость мембраны, фокальная адгезия и напряженные актиновые волокна, а также ДНК-репликация без клеточного деления – феномен, в результате которого образуются гигантские многоядерные клетки (рис. 3). Столь драматические изменения в клетках, подвергшихся воздействию CNF1, являются результатом способности токсина модифицировать

Rho [29, 30, 32]. Недавно установлено, что эта модификация заключается в дезаминировании остатка глутамина в позиции 63 с образованием глутаминовой кислоты. Подобное изменение аминокислоты вызывает образование доминирующего активного Rho белка, не способного гидролизовать ГТФ [30, 32]. *In vivo* CNF1 вызывает некроз кожи у кроликов после внутрикожной инъекции и персистирующее воспаление у мышей [36]. Эпидемиологические данные подтверждают значение CNF1 как фактора вирулентности при внекишечных инфекциях у человека, однако прямые доказательства роли токсина в развитии данных заболеваний еще предстоит доказать [29, 37].

### Термостабильный токсин (ST)

Описано два семейства термостабильных токсинов (ST), являющихся причиной диареи: STa (или STI) и STb (или STII). STa-токсины продуцируются самыми разнообразными бактериями, вызывающими заболевания желудочно-кишечного тракта: энтеротоксигенными *E. coli* (ETEC), *V. cholerae*,

*Vibrio mimicus*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii* и *Klebsiella* spp.

Патогенные для человека штаммы ETEC могут продуцировать или STa, или термолabile токсин I, или оба токсина. STa-токсины различных штаммов ETEC являются родственными, но отличными друг от друга токсинами [38]. STb вырабатываются штаммами, выделяемыми у человека, в то время как STr преимущественно обнаруживают у штаммов, полученных от свиней.

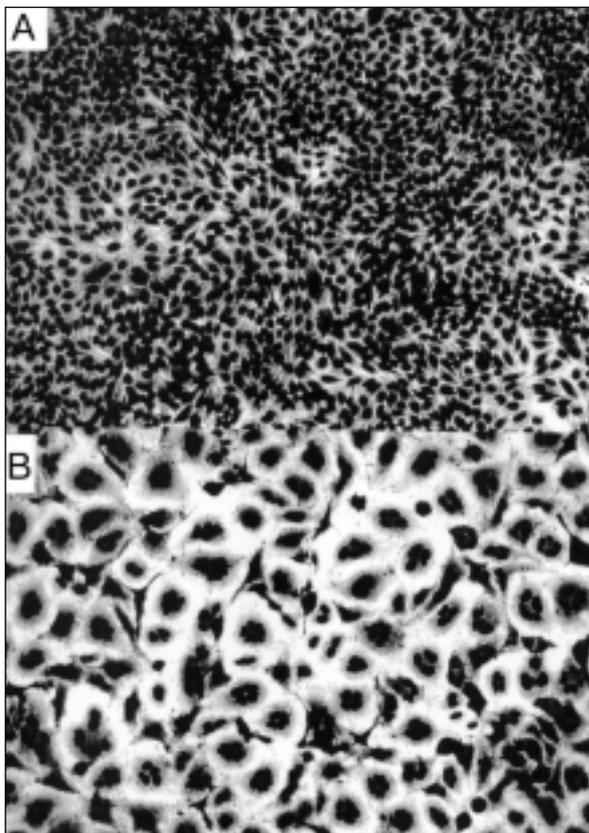
Гены, кодирующие STa (*estA*) у ETEC, входят в состав мобильного генетического элемента. Они обнаружены во множестве репликонов [39, 40]. STa транслируется в виде молекулы-прекурсора, состоящей из 72 остатков аминокислот, которая после двукратного расщепления в процессе "созревания" выделяется во внешнюю среду.

Зрелые ST – небольшие пептиды, содержащие от 19 до 53 аминокислотных остатков. STb и STr содержат 19 и 18 аминокислотных остатков соответственно. Токсины, относящиеся к семейству STa, имеют на С-конце последовательность протяженностью 13 аминокислотных остатков, определяющую токсичность и термостабильность токсина. Шесть остатков цистеина, связанных между собой тремя дисульфидными "мостиками", в составе данного домена обуславливают токсичность этой молекулы.

Связывание STa со специфичным клеточным рецептором приводит к активации мембраноассоциированной гуанилатциклазы, которая в свою очередь превращает внутриклеточный ГМФ в циклический ГМФ (рис. 1С) [41]. Такое увеличение концентрации цГМФ нарушает транспорт электролитов в кишечнике: подавляется абсорбция ионов натрия и повышается секреция ионов хлора. Изменения ионных потоков приводят к развитию секреторной диареи, характерной для инфекций, вызванных ETEC. ETEC вызывают диарею путешественников и являются основным этиологическим фактором диареи у детей во всем мире.

### Мощь некоторых токсинов

Нейротоксины *C. botulinum* (BoNT серотипов А–G) и *C. tetani* (TeNT) формируют другую категорию бактериальных токсинов на основании сходства структуры, ферментативной активности и мишеней – клеток нервной системы. Токсины BoNT наиболее часто связаны с ботулизмом у новорожденных и пищевым ботулизмом и существуют в природе в виде больших комплексов, включающих нейротоксин и один или несколько белков, которые, как полагают, обеспечивают защиту и стабильность молекулы токсина в желудочно-кишечном тракте [42,



**Рис. 3.** Эффект действия цитотоксического некротизирующего фактора 1 типа (CNF1) на эукариотические клетки: А – Нер-2 клетки, В – Нер-2 клетки, обработанные CNF1

43]. TeNT, синтезируемый в ранах вегетативными формами *C. tetani*, не формирует комплексов с белками [42, 43].

Гены, кодирующие VoNT и TeNT, локализованы на плазидах (TeNT, VoNT/A, G и, возможно, B) или в составе бактериофагов (VoNT/C, D, E, F). Нейротоксины синтезируются в виде неактивных полипептидов с молекулярной массой до 150 кДа [44]. Они высвобождаются при лизисе бактериальной клетки и активируются путем протеолитического расщепления незащищенной петли полипептида [45]. Каждая активная молекула нейротоксина состоит из тяжелой (100 кДа) и легкой (50 кДа) цепочек, соединенных единичной бисульфидной связью [42, 45]. Тяжелая цепочка VoNT и TeNT содержит два домена: участок, ответственный за транслокацию токсина в N-концевой части, и область на C-конце, регулиующую связывание токсина с клеткой [45, 46]. Легкие цепочки VoNT и TeNT содержат цинксвязывающие последовательности, необходимые для осуществления протеазной активности токсина, зависящей от ионов цинка [45, 46].

Клеточными мишенями VoNT и TeNT является группа белков, необходимых для стыковки и соединения синаптических пузырьков с пресинаптическими плазматическими мембранами с последующим высвобождением нейромедиаторов. VoNT связываются с рецепторами на пресинаптической мембране моторных нейронов периферической нервной системы. Протеолиз белков-мишеней в этих нейронах ингибирует высвобождение ацетилхолина, препятствуя таким образом мышечным сокращениям [47, 48]. VoNT/B, D, F и G разрушают везикулоассоциированный мембранный протеин и синаптобrevин; VoNT/A и E поражают синаптосомаальноассоциированный белок SNAP-25; VoNT/C гидролизует синтаксин и SNAP-25 [42, 45, 46].

TeNT воздействует на центральную нервную систему, поражая два вида нейронов. Он первоначально связывается с рецепторами пресинаптической мембраны моторных нейронов, но затем с помощью обратного везикулярного транспорта перемещается в спинной мозг, где может внедриться в тормозные и вставочные нейроны [45, 47]. Расщепление везикулоассоциированного мембранного протеина и синаптобrevина в этих нейронах приводит к высвобождению глицина и гамма-аминомасляной кислоты, которые в свою очередь вызывают мышечные сокращения (контрактуры) [47, 48]. Различия в клинических проявлениях интоксикации VoNT и TeNT (пониженный тонус мышц и спастический паралич соответственно) являются прямым следствием воздействия данных токсинов на раз-

личные нейроны и блокирования различных нейротрансмиттеров [45–47].

### **Бактериальные суперантигены: слишком много хорошего**

Некоторые бактериальные токсины действуют непосредственно на Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки иммунной системы. При нарушении функций этих клеток, вызванном токсином, развиваются заболевания. Одна из больших групп этой категории токсинов – пирогенные токсины, обладающие свойствами суперантигенов (PTSAg). Их отличительная особенность – мощное стимулирующее действие на клетки иммунной системы, пирогенность и усиление эндотоксического шока [49–51]. Эти термостабильные токсины с молекулярной массой от 22 до 30 кДа включают стафилококковые энтеротоксины серотипов А–Е, G и H, пирогенные экзотоксины стрептококков группы А (серотипы А–С и F), суперантиген стрептококков группы А и стафилококковый TSST-1.

Все токсины, относящиеся к PTSAg, имеют сходную биологическую активность, при этом среди членов данного семейства выделяется TSST-1, имеющий менее 30% гомологии по аминокислотному составу с другими токсинами данного семейства [52–54]. Ген, кодирующий TSST-1, локализован на хромосоме и в то же время у штаммов *S. aureus* ген *tst* входит в состав различных мобильных генетических элементов [49, 52, 55]. Токсин синтезируется в виде молекулы-предшественника, состоящей из 234 аминокислотных остатков, причем первые 40 остатков являются сигнальной последовательностью, которая отщепляется в процессе образования зрелого токсина массой 22 кДа [49].

Экспрессия TSST-1 зависит от концентрации кислорода, температуры, pH и уровня глюкозы и регулируется *agr* локусом *S. aureus* [49, 51]. По данным кристаллографического анализа, TSST-1 так же, как и ряд других токсинов, относящихся к PTSAg, состоит из двух различных доменов, но в отличие от других членов семейства TSST-1 не нуждается в ионах цинка в качестве ко-фактора [51–54]. Домен А TSST-1 (аминокислотные остатки 1–17 и 90–194) представляет собой  $\beta$ -захватывающую последовательность, а домен В состоит из пятицепочечной  $\beta$ -содержащей последовательности, которая формирует олигосахарид-/олигонуклеотидсвязывающую складку.

В целом мощное иммуностимулирующее свойство PSTAg является прямым результатом связывания токсина с различными участками снаружи от пептидсвязывающего участка молекул основного фактора гистосовместимости второго класса (рас-

положенных на поверхности антигенпрезентирующих клеток) и специфических  $V\beta$ -элементов на рецепторах Т-клеток. В частности, В-домен TSST-1 сначала связывается с  $\alpha$ -цепочкой молекул человеческого лейкоцитарного антигена DR1, в то время как А-домен специфически связывается с  $V\beta$ -элементами рецепторов Т-клеток [51–53, 56].

Связывание TSST-1 с  $V\beta$ -элементами рецепторов Т-клеток приводит к массивной пролиферации (до 20%) периферических Т-клеток – явление, которое радикально изменяет набор  $V\beta$  у Т-клеток [53, 56]. Т-клетки, образовавшиеся в результате пролиферации, могут существовать в состоянии анергии или подвергаются апоптозу [56]. Пролиферация Т-клеток сопровождается массивным высвобождением лимфоцитарных (интерлейкин [ИЛ]-2,  $\alpha$ -фактор некроза опухолей,  $\gamma$ -интерферон) и моноцитарных (ИЛ-1, ИЛ-6,  $\alpha$ -фактор некроза опухолей) цитокинов [51, 56]. Они вызывают гипотензию, высокую температуру тела и диффузную эритематозную сыпь, которые характерны для синдрома токсического шока. На протяжении длительного времени TSST-1 рассматривают как ключевую субстанцию в развитии синдрома стафилококкового токсического шока, однако в последние годы его стали связывать и с развитием синдрома Кавасаки – ведущей причины приобретенных пороков сердца у детей в США [50, 54].

### **Доктор Джекилл или мистер Хайд?**

Некоторые из сильных болезнетворных токсинов используют при изучении биологии клеток и в медицинских целях. Например, холерный токсин и родственный ему термолабильный токсин *E. coli* так же, как и токсин *B. pertussis*, применялись при исследовании механизма активации аденилатциклазы и роли циклического АМФ как вторичного мессенджера эукариотических клеток [57–59]. Дериваты некоторых из этих токсинов, холерный токсин и термолабильный токсин *E. coli* входят в состав вакцин [60, 61].

Активность некоторых мощных цитотоксинов использовалась в качестве потенциальной терапии ряда онкологических заболеваний. Токсины могут использоваться непосредственно для лечения или в качестве компонентов иммунотоксинов [62–64]. Например, Stx-токсин связывается с гликолипидом CD77, который экспрессируется В-клетками некоторых В-клеточных лимфом [65, 66]. Это открытие послужило толчком к исследованиям, показавшим, что Stx-токсин может "очищать" костный мозг мышей (потенциально – и человеческий) от злокачественных CD77<sup>+</sup> В-клеток перед аутологичной пересадкой костного мозга [67]. Другие токсины, ин-

гибирующие белковый синтез, такие, как дифтерийный токсин, экзотоксин А у штаммов *Pseudomonas* spp. или токсин растительного происхождения ризицин, часто используются в качестве цитотоксических компонентов иммунотоксинов. Эти "волшебные пули", сочетающие в себе ферментативно активную часть молекулы токсина и моноклональные антитела (или рецептор), проходят клинические испытания для лечения больных с В-клеточными лимфомами, лейкемией и при трансплантации костного мозга.

Мощный ботулинический нейротоксин типа А (BoNT/A) имеет несколько клинических показаний [46, 68]. Один из них – лечение мышечной гиперактивности. Микродозы инъекций очищенного токсина в определенные точки вызывают паралич мышцы-мишени и устраняют мышечный спазм. Терапию следует постоянно продолжать, так как действие токсина продолжается только несколько месяцев. Впервые BoNT/A был применен для лечения нарушений функции глазодвигательных мышц [69]. Эффективность BoNT/A показана также при многих других расстройствах, включая дистонию мышц шеи и гортани, писчий спазм, гемифасциальный спазм, тремор и тик [46, 68]. BoNT/A используется и в косметических целях для уменьшения глубоких морщин, вызванных контрактурой мышц лица [70].

Другой бактериальный токсин, используемый в медицине, – стрептокиназа некоторых патогенных штаммов стрептококков, которая является мощным активатором плазминогена. Протеолитическая активность стрептокиназы используется для восстановления проходимости тромбированных артерий при инфаркте миокарда [71, 72].

### **Вакцинировать не мешкая**

Вакцины, нацеленные на токсический компонент бактериальных патогенов, являются доказанным эффективным средством профилактики некоторых болезней. Большинство лицензированных токсидных вакцин сравнительно мало очищены, однако эффективны. Такие вакцины состоят из частично очищенных токсинов, полученных из супернатанта культуры бактерий, в частности *C. diphtheriae*, *C. tetani*, *B. anthracis*. При изготовлении вакцин применяют формальдегид для устранения токсичности дифтерийного или столбнячного токсина; вакцина против сибирской язвы содержит защитный антиген и небольшое количество летального и отечного факторов. Опытные образцы вакцины против ботулизма состоят из 5 неочищенных ботулинических анатоксинов; препарат производится центрами по контролю и предупреждению заболе-

ваний (CDC, США) и распространяется среди исследователей, работающих с токсином или микроорганизмом. Бесклеточная вакцина против коклюша, имеющая в своем составе либо один анатоксин коклюша, либо еще несколько компонентов, обладает одинаковой эффективностью и значительно меньшей реактогенностью по сравнению с вакциной, содержащей целые убитые клетки [73]. Данная вакцина была недавно разрешена для применения у новорожденных и детей старшего возраста.

На различных стадиях разработки (синтез, доклинические испытания, I, II и III фазы клинических испытаний) находятся новые антитоксические вакцины [74]. Будущее поколение вакцин, содержащих анатоксины, можно разделить на три категории: очищенные анатоксины, инактивируемые химическим или генетическим способом; живые ослабленные штаммы возбудителей, продуцирующие генетически измененный анатоксин; живой ослабленный несвязанный векторный штамм, например *V. cholerae* или *Salmonella* spp., продуцирующий необходимый анатоксин. Примеры каждого из этих подходов и достижения в разработке специфических анатоксинов описываются ежегодно в "Jordan Report" [74].

Антитоксины, полученные против анатоксинов дифтерии, столбняка и ботулизма, используются уже многие годы при лечении тяжелобольных. Исследуется возможность применения специфической антисыворотки против Stx-токсинов, выделяе-

мых *E. coli* O157:H7 и другими STEC, с целью предупреждения опасного для жизни осложнения – гемолитико-уремического синдрома.

## Заключение

Микробные токсины, способные прерывать или гиперстимулировать многие важные функции эукариотических клеток, эволюционируют вместе со своими бактериями-носителями. Вероятно, эти токсины выгодны бактериям либо на стадии взаимодействия "паразит – хозяин", либо в какой-либо экологической нише во внешней среде, где встречаются данные бактерии. Некоторые бактериальные токсины приводят к необратимым повреждениям клеточной мембраны или изменяют нормальную передачу сигнала в клетке, другие проявляют ферментативную активность только лишь при попадании в цитоплазму чувствительных к ним клеток путем эндоцитоза. Кроме того, существуют токсины, выключающие или замыкающие нормальные функции клеток хозяина.

Вредные для чувствительных клеток при инфекции свойства некоторых бактериальных токсинов нашли применение в исследованиях биохимических реакций в эукариотических клетках и в медицине.

Таким образом, изучение микробных токсинов предоставляет новые данные не только о их роли в развитии заболеваний, но и о свойствах клеток-мишеней.

## Литература

- Roux E, Yersin A. Contribution a l'etude de la diphtherie. Ann Inst Pasteur 1888; 629-61.
- Schlessinger D, Schaechter M. Bacterial toxins. In: Schaechter M, Medoff G, Eigenstein BL, editors. Mechanisms of microbial disease. 2nd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1993. p. 162-75.
- Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol 1997;5:156-61.
- Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MD. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? Trends Microbiol 1994; 2:20-4.
- Harrington DJ. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. Infect Immun 1996;64:1885-91.
- Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. Microbiol Rev 1991;55:733-51.
- Tomita T, Kamio Y. Molecular biology of the pore-forming cytolytins from Staphylococcus aureus,  $\alpha$ - and gamma-hemolysins and leukocidin. Biosci Biotechnol Biochem 1997;61:565-72.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, et al. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolytins. Arch Microbiol 1996;165:73-9.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science 1996;274:1859-66.
- Lesieur C, Vecsey-Semjen B, Abrami L, Fivaz M, Gisou van der Goot F. Membrane insertion: the strategies of toxins. Mol Membr Biol 1997;14:45-64.
- Collier RJ, In: Moss J, Vaughan M, editors. ADP-ribosylating toxins and g proteins. Washington: Am Soc Microbiol; 1990. p. 3-19.
- Wick MJ, Iglewski BH. In: Moss J, Vaughan M, editors. ADP-ribosylating toxins and g proteins. Washington: Am Soc Microbiol; 1990. p. 11-43.
- Endo Y, Tsurugi K, Yutsucio T, Takeda Y, Ogasawara Y, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli. O157:147 and Shiga toxin in eucaryotic ribosomes. Eur J Biochem 198;171:45-50.
- Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman KJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected Xenopus oocytes. J Biol Chem 1989;264:596-601.
- Tesh VL, O'Brien AD. The pathogenic mechanisms of

- Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol* 1991;5:1817-22.
16. O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-RoIfe A, Jackson MP, Oisnes S, Sandvig K, et al. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. In: Sansonetti PJ, editor. *Pathogenesis of shigellosis*. 180th ed. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 1992. p. 66-94.
  17. O'Brien AD, Kaper JB. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today, and tomorrow. In: Kaper JB, O'Brien AD, editors. *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington: Am Soc Microbiol; 1998. p. 1-11.
  18. Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Activation of Shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 1996;64:1569-76.
  19. Stein PE, Boodhoo A, Tyrell GT, Brunton J, Read RJ. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 1992;355:748-50.
  20. Frasier ME, Chernaia MM, Kozlov YV, James MNG. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nature Structural Biol* 1994;1:59-64.
  21. Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BA, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, et al. Redefined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J Mol Biol* 1993;230:890-918.
  22. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 1994;2:45-57.
  23. Suh J-K, Hovde CJ, Robertus JD. Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eukaryotic ribosomes. *Biochemistry* 1998;37:9394-8.
  24. Centers for Disease Control and Prevention. Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:1-18.
  25. O'Brien AD, Lively TA, Chen M, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with hemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. *Lancet* 1983;i:702.
  26. Centers for Disease Control. Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis – United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982;31:580-5.
  27. Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:364-8.
  28. Aktories K. Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol* 1997;5:282-8.
  29. Oswald E, Sugai M, Labigne A, Wu HC, Fiorentini C, Boquet P, et al. Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3814-8.
  30. Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gin-63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997;387:725-9.
  31. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, et al. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997;387:729-33.
  32. Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J, Sugimoto N, et al. Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gin-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11623-6.
  33. Falbo V, Pace T, Picci L, Pizzi E, Caprioli A. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993;61:4909-14.
  34. Blum G, Falbo V, Caprioli A, Hacker J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and -hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* 1995;126:189-96.
  35. Lemichez E, Flatau G, Bruzzone M, Boquet P, Gauthier M. Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNFI cell-binding and catalytic domains. *Mol Microbiol* 1997;24:1061-70.
  36. DeRycke J, Gonzalez EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1990;28:694-9.
  37. Andreu A, Stapleton AE, Fennell C, Lockman HA, Xercavins M, Fernandez F, et al. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J Infect Dis* 1997;176:464-9.
  38. Nair GB, Takeda Y. The heat-stable enterotoxins. *Microb Pathog* 1998;24:123-31.
  39. So M, McCarthy BJ. Nucleotide sequence of transposon Tnl681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4011-5.
  40. So M, Boyer HW, Betlach M, Falkow S. Molecular cloning of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. *J Bacteriol* 1976;128:463-72.
  41. Giannella RA. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? *J Lab Clin Med* 1995;125:173-81.
  42. Singh BR, Li B, Read D. Botulinum versus tetanus neurotoxins: why is botulinum neurotoxin but not tetanus neurotoxin a food poison? *Toxicon* 1995;33:1541-7.
  43. Jahn R, Hanson PI, Otto H, Ahnert-Hilger G. Botulinum and tetanus neurotoxins: emerging tools for the study of membrane fusion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995;60:329-35.
  44. Henderson I, Davis T, Elmore M, Minton NP. The genetic basis of toxin production in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. In: Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW, editors. *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 261-94.
  45. Schiavo G, Montecucco C. The structure and mode of action of botulinum and tetanus toxins. In: Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW, editors. *The*

- clostridia: molecular biology and pathogenesis. San Diego: Academic Press; 1997. p. 295-322.
46. Kessler KR, Benecke R. Botulinum toxin: from poison to remedy. *Neurotoxicology* 1997;18:761-70.
  47. Halpern JL, Neale EA. Neurospecific binding, internalization and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;195:221-41.
  48. Arnon SS. Human tetanus and human botulism. In: Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW, editors. *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*, San Diego: Academic Press; 1997. p. 95-115.
  49. Rago JV, Schlievert PM. Mechanisms of pathogenesis of staphylococcal and streptococcal superantigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;225:81-97.
  50. Lee PK, Schlievert PM. Molecular genetics of pyrogenic exotoxin "superantigens" of Group A streptococci and staphylococcus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;174:1-19.
  51. Schlievert PM. Searching for superantigens. *Immunol Invest* 1997;26:283-90.
  52. Bohach GA, Stauffacher CV, Ohiendorf DH, Chi YL, Vath GM, Schlievert PM. The staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin family. In: Singh BR, Tu AT, editors. *Natural Toxins II*. New York: Plenum Press; 1996. p. 131-54.
  53. Papageorgiou AC, Acharya KR. Superantigens as immunomodulators: recent structural insights. *Structure* 1997;5:991-6.
  54. Prasad GS, Radhakrishnan R, Mitchell DT, Earhart CA, Dinges MM, Cook WJ, et al. Refined structures of three crystal forms of toxic shock syndrome toxin-I and of a tetramutant with reduced activity. *Protein Sci* 1997;6:1220-7.
  55. Betley MJ, Borst DW, Regassa LB. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. *Chem Immunol* 1992;55:1-35.
  56. Stevens DL. Superantigens: their role in infectious diseases. *Immunol Invest* 1997;26:275-81.
  57. Harnett MM. Analysis of G-proteins regulating signal transduction pathways. *Methods Mol Biol* 1994;27:199-211.
  58. Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 1983;258:2072-5.
  59. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995;80:249-57.
  60. Snider DP. The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit Rev Immunol* 1995;15:317-48.
  61. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera-B subunit as oral mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 1993;11:1179-84.
  62. Pastan I. Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:01-6.
  63. Ghetie MA, Ghetie V, Vitetta ES. Immunotoxins for the treatment of B-cell lymphomas. *Mol Med* 1997;3:420-7.
  64. Winkler U, Barth S, Schnell R, Diehl V, Engert A. The emerging role of immunotoxins in leukemia and lymphoma. *Ann Oncol* 1997;8:139-46.
  65. Murray LJ, Habeshaw JA, Wiels J, Greaves MF. Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells. *Int J Cancer* 1985;36:561-5.
  66. Taga S, Mangeney M, Tursz T, Wiels J. Differential regulation of glycosphingolipid biosynthesis in phenotypically distinct Burkitt's lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 1995;61:261-7.
  67. LaCasse EC, Saleh MT, Patterson B, Minden MD, Gariely J. Shiga-like toxin purges human lymphoma from bone marrow of severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1996;88:1551-67.
  68. Wheeler AH. Therapeutic uses of botulinum toxin. *Am Fam Physician* 1997;55:541-8.
  69. Averbuch-Heller L, Leigh RJ. Medical treatments for abnormal eye movements: pharmacological, optical and immunological strategies. *Aust NZJ Ophthalmol* 1997;25:7-13.
  70. Carter SR, Seiff SR. Cosmetic botulinum toxin injections. *Int Ophthalmol Clin* 1997;37:69-79.
  71. Maseri A, Andreotti F. Targeting new thrombolytic regimens at specific patient groups: implications for research and cost-containment. *Eur Heart J* 1997;18:F28-35.
  72. Levine SR. Thrombolytic therapy for stroke: the new paradigm. *Hosp Pract (Off Ed)* 1997;32:57-73.
  73. Cherry JD. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:890-6.
  74. National Institutes of Health. *The Jordan report: accelerated development of vaccines*. 1998.
  75. Kraulis PJ. MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Applied Crystallography* 1991; 24: 946-50.