

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Nové diagnostické metody latentní tuberkulózy
využívající antigeny ESAT-6 a CFP-10**



Pavel Mikulecký

Školitel: Ing. Peter Šebo, CSc.

2007/2008

Obsah:

Abstrakt	3
Abstract	3
1. Úvod	4
2. Mycobacterium tuberculosis a tuberkulóza	5
3. Prevence proti TB	6
4. Diagnostika TB	7
4.1. Kultivační techniky	7
4.2. Mikroskopie sputa	8
4.3. Sérologické vyšetření	8
4.4. Rentgenologické vyšetření plic	9
4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	9
4.6. Tuberkulínový kožní test (TST).....	10
4.7. Krevní test	10
5. Léčba tuberkulózy	12
6. Mykobakteriální antigeny ESAT-6 a CFP-10	13
7. Prezentace antigenů	15
8. Doprava antigenu do antigen-prezentujících buněk	16
8.1. Bakteriální toxiny	16
8.2. Adenylát cyklázový toxin bakterie Bordetella pertussis	17
9. Závěr	20
10. Seznam použité literatury	21

Abstrakt

Tuberkulóza je závažné onemocnění, které končí v mnoha případech smrtí. Odhaduje se, že téměř třetina světové populace byla infikována *M. tuberculosis*. V poslední zprávě Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2006 bylo zveřejněno 9,2 miliónů případů nakažení a 1,7 miliónů úmrtí. Nemoc se netýká pouze rozvojových oblastí, ale stále častěji se objevuje i ve vyspělých zemích. Důležitým faktorem pro úspěšnou léčbu je nalezení lidí s latentní tuberkulózou a jejich vyléčení. Současné diagnostické metody jsou buď časově náročné, málo spolehlivé nebo příliš drahé. Pro detekční účely se v poslední době s úspěchem používají antigeny ESAT-6 a CFP-10, které dokáží aktivovat paměťové T lymfocyty v krvi infikovaných jedinců a vyvolat sekreci cytokinu interferonu gamma. Ke zlepšení dopravy a vystavení antigenů na povrchu buněk je možno využít adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, který zvyšuje specifitu a citlivost stávajících testů.

Abstract

Tuberculosis is a serious disease leading to death in many cases. Approximately one-third of world's population is infected with *M. tuberculosis*. The last report of The World Health Organization estimated 9,2 million new cases and 1,7 million deaths in year 2006. It occurs not only in developing regions, but more and more frequently in advanced countries. Identification and cure of people with latent tuberculosis play a key role in successful treatment. Current diagnostic methods are either time consuming, not reliable, or too expensive. Antigens ESAT-6 and CFP-10 are successfully used for diagnosis purpose in recent years. They can activate memory T cells founding in blood of infected people and induce secretion of cytokine interferon gamma. For improving antigen delivery and its presentation to cell surface could be used adenylate cyclase toxin of bacteria *Bordetella pertussis* which increases specificity and sensitivity of current tests.

Klíčová slova: Diagnostika, *M. tuberculosis*, tuberkulóza, antigen CFP-10, antigen ESAT-6, adenylát cyklázový toxin

Keywords: Diagnosis, *M. tuberculosis*, tuberculosis, antigen CFP-10, antigen ESAT-6, adenylate cyclase toxin

1. Úvod

Bakterie *Mycobacterium tuberculosis* způsobuje závažné onemocnění tuberkulózu, která stále představuje celosvětový problém. Stávající diagnostické metody jsou málo citlivé a specifické, časově náročné a v mnoha případech příliš drahé pro rutinní testování. Novou strategií se zdá být využití specifických mykobakteriálních antigenů, především ESAT-6 a CFP-10. Tyto dva proteiny jsou sekretovány pouze virulentními mykobakteriemi a nikoliv vakcinačním kmenem *M. Bovis* BCG nebo environmentálními mykobakteriemi. Navíc jsou imunodominantní a dokáží aktivovat paměťové T lymfocyty v krvi infikovaných osob. Stimulace způsobí produkci cytokinu interferonu gamma, jehož množství lze stanovit imunochemickými metodami.

K dalšímu vylepšení lze s úspěchem použít geneticky detoxifikovaný adenylát cyklázový toxin (ACT, CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*, který se specificky váže na receptor CD11b/CD18 exprimovaný na antigen-prezentujících buňkách. Tento toxin funguje jako vektor pro dopravu a vystavení antigenů na glykoproteinech hlavního histokompatibilního komplexu jak I. třídy (MHC I), tak i II. třídy (MHC II). Navíc snižuje molární množství potřebných antigenů, zvyšuje hladinu produkovaného IFN- γ a celkově přispívá k vyšší citlivosti a specificitě současných diagnostických metod.

2. *Mycobacterium tuberculosis* a tuberkulóza

Acidorezistentní bakterie *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) byla poprvé popsána Robertem Kochem 24. března 1882. Patří mezi obligátně aerobní mikroorganismy, a proto napadá orgány s vysokým obsahem kyslíku. Jako intracelulární patogen dokáže přežít a růst v makrofázích nebo granulocytech. Buněčná stěna mykobakterií obsahuje velké množství lipidů, které jí dodávají vysokou hydrofobicitu a nízkou propustnost. Tyto vlastnosti spolu s její jedinečnou stavbou způsobují rezistenci na většinu běžných antibiotik (Jarlier and Nikaido, 1994). Ve srovnání s ostatními bakteriemi má dlouhou generační dobu (15–20 hodin).

Tuberkulózu (TB) způsobuje komplex blízce příbuzných mykobakterií (*M. tuberculosis* complex), kam patří *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* a *M. canetti*. Po mnoho let se předpokládalo, že se nemoc původně přenesla na člověka ze skotu, jelikož rozpětí hostitelů u *M. bovis* je mnohem širší než u *M. tuberculosis*. Ovšem v nedávné studii zabývající se delecemi a insercemi v genomu komplexu *M. tuberculosis* byl prokázán nezávislý vývoj *M. tuberculosis* a *M. bovis* z původního předka (Brosch *et al.*, 2002).



Obr. 1: Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu (Dennis Kunkel Microscopy, Inc.). Shluk bakterií *M. tuberculosis*.

TB je závažné infekční onemocnění, které je jednou z hlavních příčin úmrtí v rozvojových zemích. Odhaduje se, že téměř třetina světové populace byla infikována *M. tuberculosis*. V poslední zprávě Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2006 bylo zveřejněno 9,2 miliónů případů nakažení a 1,7 miliónů úmrtí. Ve vyspělých zemích se díky lepším životním podmínkám, hygieně, účinné léčbě antibiotiky a očkování podařilo výskyt tuberkulózy potlačit na minimum. Avšak v posledních letech výskyt nemoci roste a to hlavně díky migraci obyvatel, mezinárodnímu cestování, zhoršené imunitě, HIV infekci a špatným životním podmínkám v zemích třetího světa. Dalším velkým problémem je vyšší výskyt multirezistentních kmenů a s tím spojená obtížnost léčby (Wade and Zhang, 2004).

Z člověka na člověka se TB přenáší kapátkovou infekcí a vzácněji může být zdrojem nákazy zvíře (např. domácí skot). Pravděpodobnost nakažení se zvyšuje při dlouhodobějším těsném kontaktu v rámci rodiny, partnerských a pracovních vztahů. Příznaky jsou kašláním (často s krví), bolesti v hrudi, slabost, hubnutí, nechutenství, horečky a noční pocení.

Zasaženými orgány mohou být mízní uzliny, hrtan, střeva, ledviny, kosti, kůže, ale nejběžnější je plicní forma. U infikovaného jedince se nemoc nemusí projevit i několik let a takový jedinec nevykazuje žádné příznaky. Propuknutí nemoci je způsobeno zhoršením životních podmínek nebo oslabením imunitního systému. Promoření populace virem HIV je především v Africe významným faktorem přispívajícím k velkému výskytu TB.

Pokud je jedinec infikován, aktivní forma nemoci se rozvine u přibližně 10% nakažených, většinou v prvních dvou letech po napadení. Ve zbylých případech přetrvává v latentní formě, která může být později reaktivována (Dinnes *et al.*, 2007). Narozdíl od pacientů s aktivní tuberkulózou, jedinci s latentní TB nepatří mezi přenašeče a nejsou tedy hrozbou pro ostatní (Parrish *et al.*, 1998). Dodnes není přesně objasněno, u kterých pacientů se onemocnění rozvine v aktivní formě.

3. Prevence proti TB

Hlavní strategií při prevenci lidí před nákazou je nalézt zdroj infekce, izolovat jej od okolí a poté jedince účinně vyléčit. S tím souvisí dostatečně rychlá diagnostika a efektivní léčba. V rámci prevence probíhá v některých zemích celoplošné očkování obyvatelstva celobuněčnou vakcínou *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG). V České republice je tato povinnost daná zákonem.

BCG vakcína se připravuje z živého oslabeného kmene *M. bovis*, který ztratil svoji virulenci. U lidí byla poprvé použita v roce 1921. Přestože se stále pracuje na vývoji nových vakcín, dodnes zůstává BCG jedinou dostupnou a účinnou vakcínou. Zatímco v určitých oblastech velice pomáhá v boji proti TB, v jiných je její význam zanedbatelný. Úspěšnost závisí na promoření environmentálními bakteriemi, které se liší v různých zeměpisných šířkách. Dalším vlivem určujícím efektivnost vakcinace je používání odlišných BCG vakcín.

Mechanismus působení byl objasněn a spočívá v rozšíření vakcinační látky lymfatickými cestami do uzlin a navození stejné imunitní reakce jako u přirozené infekce virulentním kmenem. Vakcinace snižuje v průměru o 50% riziko nákazy tuberkulózou (Colditz *et al.*, 1994).

Velkou výhodou této vakcinace je její finanční dostupnost. Nevýhodou se ale ukázal vliv vakcíny na výsledky některých diagnostických metod, např. u nejvíce používaného tuberkulinového testu. Proto se v některých zemích už neprovádí hromadná imunizace a více se spoléhá na detekci latentní formy tuberkulózy.

4. Diagnostika TB

Rychlá, přesná a hlavně včasná diagnóza je nejdůležitější částí léčby TB. Tradiční postup při zjišťování aktivní TB spočívá v rychlé identifikaci bakterie pomocí mikroskopie spolu s kultivací pro určení bakteriálního kmene a výběru vhodného antibiotika. Pro dlouhou generační dobu je celý proces zdoluhavý, a proto se hledají nové metody zaměřené především na detekci latentní tuberkulózy.

4.1. Kultivační techniky

Kultivace probíhá na pevném médiu obsahující směs antibakteriálních agens, které dovolují replikaci jen mykobakteriím. Používají se média na vaječné (Lowenstein-Jensen nebo Ogawa) nebo agarové bázi (Middlebrook 7H9, 7H10 a 7H11). Rychlost růstu a vzhled kolonií závisí na typu použitého média (Welch *et al.*, 1993). Novějším metodou je poloautomatický radiometrický systém BACTEC 460TB, který je obecně přijímán jako standardní (Tortoli *et al.*, 1999). V dnešní době se však dává přednost neradioaktivním postupům, které měří změny v tlaku plynu, produkci oxidu uhličitého nebo spotřebě kyslíku, a dovolují nám průběžné měření kultivace (Drobniewski *et al.*, 2003).

Kultivace je nejcitlivější ze současných testů (až 98% úspěšnost). Výhodou je možnost odhalení rezistence na antibiotika a nalezení vhodných léků pro léčbu TB. Nicméně na izolaci *M. tuberculosis* ze vzorku na pevném mediu se potřebuje 6–8 týdnů a 10–20% bakterií vůbec nevyroste (Andersen *et al.*, 2000). U radiometrických systémů problémy spočívají v nutnosti se bezpečně zbavit radioaktivního odpadu a celkově vyšších finančních nároků.

4.2. Mikroskopie sputa

Používá se ke zjišťování přítomnosti mykobakteriálních bakterií v klinických vzorcích nebo kulturách. Nejběžněji se používá barvení Ziehl-Neelsen, které identifikuje acidorezistentní bakterie. S rozvíjejícími se technologiemi se upřednostňuje fluorescenční mikroskopie.

Výhodou je rychlost průkazu infekce, ale přesnost není velká a často nelze rozlišit různé kmeny mykobakterií. I přesto mikroskopie sputa často představuje jedinou dostupnou metodu diagnostiky plicní TB v rozvojových zemích (Dinnes *et al.*, 2007). Nevýhodou je špatné získávání sputa od dětí.

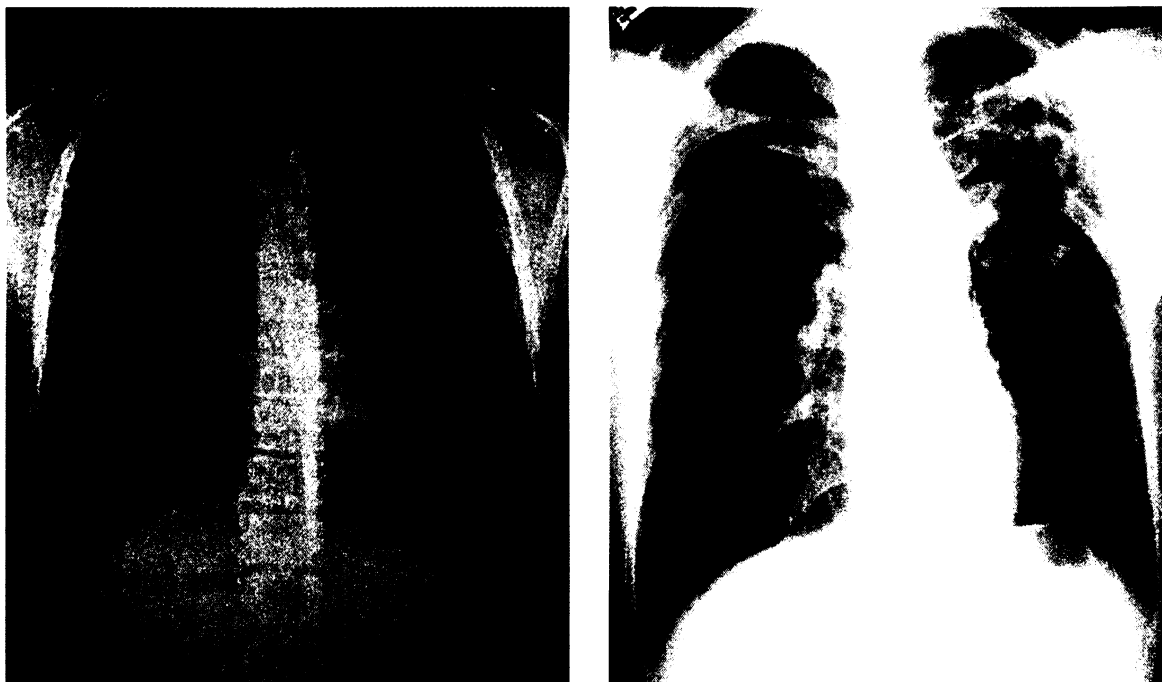
4.3. Sérologické vyšetření

Doposud byla vyvinuta řada různých sérologických testů (ICT Tuberculosis, AMRAD-ICT,...) detekujících protilátky proti různým antigenům. Největší využití mají v rozvojových zemích, protože jsou jednoduché, rychlé a levné (Gounder *et al.*, 2002).

Žádný z těchto testů však zatím neprokázal takovou přesnost, aby mohl být široce používán. Protilátky se používají proti mnoha antigenům a citlivost je obecně velmi malá (Lyashchenko *et al.*, 1998). Výsledky testů ovlivňují mimo jiné infekce environmentálními mykobakteriemi, BCG vakcinace nebo infekce virem HIV.

4.4. Rentgenologické vyšetření plic

Při aktivní plicní tuberkulóze vznikají v plicní tkáni uzlíky, které fibrotizují a někdy až kalcifikují, a lze je pozorovat na rentgenových snímcích. RTG vyšetření se provádí hlavně u lidí bez výrazných příznaků nemoci, ale s pozitivním tuberkulínovým testem (viz. níže).



Obr. 2: Rentgenové snímky plic. Vlevo snímek zdravých plic, vpravo infikovaného člověka.

4.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR (polymerase chain reaction) lze zaznamenat i malé množství genetického materiálu (DNA nebo RNA), které může být použito k zjištění druhu bakterie a genů kódujících rezistenci na antibiotika. Ačkoliv jde o velice rychlou (3–6 hodin) a specifickou metodu, její citlivost je nižší než u kultivační techniky, jelikož jakákoliv kontaminace může dávat falešné pozitivní výsledky (Jatana *et al.*, 2000). Vyšší finanční náklady a potřebná výbava laboratoří brání jejímu běžnému použití v rozvojových zemích.

Na trhu je k dostání několik komerčních testů – *Probe Amplified M. tuberculosis Direct Test (MTD)*, *BD ProbeTec* nebo *Roche Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test*, který amplifikuje část genu pro 16S rRNA.

4.6. Tuberkulínový kožní test (TST)

TST je v současnosti standardním nástrojem pro detekci latentní infekce a je založen na časově zpožděné imunologické odpovědi na přečištěný proteinový derivát (PPD) – směs antigenů pocházejících z mykobakterií. Vyžadují se dvě návštěvy lékaře, jedna na aplikaci PPD a druhá za 48–72 hodin na odečtení výsledku (velikost kožní reakce). Měří se průměr zduřeniny, která vzniká u lidí nakažených tuberkulózou.

Ačkoliv je TST relativně levný a nemusí k němu být speciální laboratoř, není schopný úplně rozlišit mezi BCG vakcinací a infekcí způsobenou virulentními bakteriemi (Behr *et al.*, 1999). Výsledky testu mohou být ovlivněny infekcí environmentálními mykobakteriemi a důsledkem může být stejná nebo lepší reakce na PPD než na samotnou nákazu *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 2000). Imunosuprese (např. HIV infekce) může být příčinou falešných negativních výsledků, jelikož je narušena funkčnost imunitního systému. Dalšími komplikacemi jsou nutná druhá návštěva lékaře, nemožnost provedení testu u lidí s kožními nemocemi a případně vznik bolestivého zánětu se zanecháním jizvy.

4.7. Krevní test

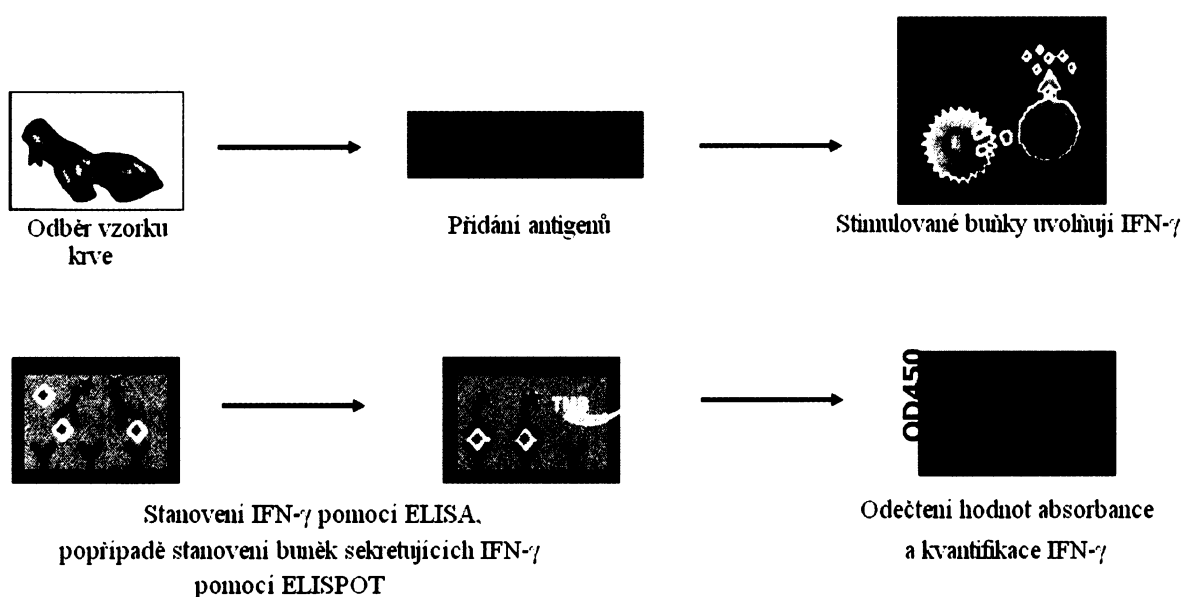
Principem testu je stanovení množství cytokinu IFN- γ ve vzorku plně heparizované krve pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) nebo ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Spot Assay). IFN- γ produkují T lymfocyty po stimulaci specifickými mykobakteriálními antigeny. Rozlišují se dva hlavní typy dostupných testů – první test je založen na PPD (QuantiFERON-TB) a druhý na specifických mykobakteriálních antigenech zahrnujících ESAT-6, CFP-10 a TB7.7 (QuantiFERON-TB Gold, T-SPOT.TB), které se nacházejí pouze u virulentních kmenů *M. tuberculosis*. Lze tak rozlišit jedince s latentní TB od osob vakcinovaných BCG. *In vitro* experimenty ukazují, že kombinace ESAT-6 a CFP-10 poskytuje vyšší citlivost a specifitu diagnostiky než při použití PPD (Arend *et al.*, 2001).

Výhodou je automatické testování, které poskytuje větší objektivnost výsledků. Tím lze zlepšit přesnost diagnózy u lidí s latentní tuberkulózou, kteří mají TST často falešně negativní (např. lidé s HIV).

V kitu **QuantiFERON-TB** je plná heparizovaná krev stimulovaná pomocí PPD z *M. bovis* a kontrolních antigenů. Proteinové složky PPD se nacházejí u dalších mykobakterií a to může způsobit falešné pozitivní výsledky u lidí vakcinovaných BCG a neschopnost

odlišení *M. tuberculosis* od environmentálních mykobakterií (van Pinxteren *et al.*, 2000). V současné době už tento test není komerčně dostupný.

V testu **QuantiFERON-TB Gold (QFT-G)** se používá směs specifických mykobakteriálních antigenů ESAT-6 a CFP-10 a vyhodnocení se provádí metodou ELISA. Pokud se jedinec setkal nebo je infikován některou mykobakterií z komplexu *M. tuberculosis*, v jeho krvi se nacházejí paměťové T lymfocyty, které po stimulaci začnou produkovat IFN- γ (Mazurek *et al.*, 2005).



Obr. 3: Schématické znázornění krevního testu. Ke vzorku krve jsou přidány antigeny, které zpracují antigen-prezentující buňky a poté je vystaví na svém povrchu s MHC molekulou T lymfocytům. Stimulované T lymfocyty produkují IFN- γ , jehož množství je stanoveno imunochemickými metodami.

QFT-G je nepřímý test pro diagnostiku jak aktivní, tak latentní TB. K provedení se používá plná heparizovaná krev, a tudíž odpadá nutnost izolace buněk. Další výhodou je rychlost, protože výsledky mohou být dostupné za méně než 24 hodin od začátku testování.

Tento test je velice citlivý a specifický. Po zjištění pozitivního výsledku testu by měla následovat další vyšetření (např. přímá mikroskopie, kultivace, rentgenologické vyšetření), která určí, zda jde o aktivní TB. Falešné negativní výsledky mohou být způsobeny nedostatečnou funkčností imunitního systému, nedostatečným množstvím T lymfocytů ve vzorku krve, jejich špatnou manipulací nebo nesprávně provedeným testem. Falešné pozitivní výsledky mohou vznikat v důsledku předchozí infekce některými mykobakteriemi, jelikož používané antigeny ESAT-6 a CFP-10 se nachází i u *M. kansasii*, *M. szulgai* nebo *M. marinum* (Kobashi *et al.*, 2006).

Souprava **QuantiFERON-TB Gold In-Tube** vychází z QFT-G a využívá specifické mykobakteriální antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7. Výhody a nevýhody jsou stejné jako u QFT-G, změnilo se jen technické provedení, které zajišťuje méně práce s krví a jednodušší stimulaci krve.

Kit **T-SPOT.TB** využívá ke stimulaci krve také antigeny ESAT-6 a CFP-10, ale vyhodnocení je založeno na metodě ELISPOT, při které se stanoví množství aktivovaných T lymfocytů produkujících IFN- γ .

Test se vyznačuje velkou specificitou a citlivostí, v některých případech vyšší než u QuantiFERON-TB Gold (Lee *et al.*, 2006). Výhodou je i jeho rychlost, jelikož výsledky je možno získat do druhého dne. Navíc nejsou ovlivněny BCG vakcinací a infekcí environmentálními bakteriemi, kromě *M. kansasii*, *M. szulgai* nebo *M. marinum*.

Negativní výsledek však nevyklučuje možnost infekce TB nebo její latentní formy. Nevýhodou je jeho celkově složitější technické provedení, při kterém laboranti musí získat zkušenosti například s izolací mononukleárních buněk z krve (Barnes, 2001). K provedení testu je potřeba relativně velkého množství krve (až 20 ml), což může být problém zejména u dětí a některých pacientů.

5. Léčba tuberkulózy

Současná léčba tuberkulózy spočívá v podávání antibiotik, především isoniazidu a rifampicinu, dále pak streptomycinu, pyrazinamidu a etambutolu (Drobniewski *et al.*, 2007). Isoniazid disponuje baktericidními účinky a přispívá k rychlému uzdravení pacientů. Rifampicin působí i proti nerostoucím bakteriím a umožňuje zkrátit dobu léčby z 18–24 měsíců na přijatelných 6–9 měsíců (Di Perri and Bonora, 2004). Antibiotika se užívají v jedné denní dávce a nejúčinněji působí na mykobakterie ve stadiu množení. Jejich stálá hladina v krvi utlumuje metabolickou aktivitu bakterií, a proto se střídají podávané léky. Léčba probíhá dlouhodobě (6–12 měsíců), aby se zabránilo opakovanému výskytu nemoci v budoucnosti, kterou by mohly způsobit intracelulárně přežívající bakterie. Jedině správně vedená a pravidelná léčba může zajistit trvalé uzdravení.

Každá mykobakteriální kultura může obsahovat malé procento jedinců přirozeně rezistentních na podávaný lék, a proto se používá kombinace antibiotik, aby byly usmrceny veškeré bakterie. U většiny pacientů stačí kombinace rifampicinu a isoniazidu. Stále častěji se ovšem objevují multirezistentní kmeny (Wade and Zhang, 2004). Pacientům se musí podávat

jak primární (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, streptomycin, etambutol), tak sekundární léky, a léčení je dvakrát až čtyřikrát zdlouhavější (Chan and Iseman, 2002). Hlavní faktory komplikující léčbu jsou časová náročnost, vyšší cena a častější výskyt nepříznivých reakcí (Di Perri and Bonora, 2004).

6. Mykobakteriální antigeny ESAT-6 a CFP-10

Pro diagnostické účely bylo charakterizováno a studováno několik specifických mykobakteriálních antigenů. Acr1 (alpha-crystallin 1, HspX) a Acr2 (alpha-crystallin 2) patří do rodiny malých imunodominantních „heat-shock“ proteinů, které jsou schopné vyvolat T buněčnou odpověď (Wilkinson *et al.*, 2005). ESAT-6, CFP-10, TB7.7 a další jsou kódovány na lokusu RD1 (region of difference) o velikosti 9,5 kb, který se nachází u kmenů komplexu *M. tuberculosis*, ale chybí u všech testovaných BCG kmenů a environmentálních mykobakterií (Mahairas *et al.*, 1996), kromě *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum* (Kobashi *et al.*, 2006). Toho se využívá při přípravě nových atenuovaných vakcín a rozvoji diagnostických testů. Předpokládá se, že ztráta regulace díky delecí v RD1 oblasti má za následek atenuaci BCG kmenů (Mahairas *et al.*, 1996).

ESAT-6 (early secreted antigenic target) sestává z 95 aminokyselin (Sorensen *et al.*, 1995) a CFP-10 (culture filtrate protein) je tvořen 100 aminokyselinami (Berthet *et al.*, 1998). Oba antigeny se sekretují do extracelulárního prostoru, ale ani jeden nemá sekreční signál ve své sekvenci a přes membránu se tedy dostávají mechanismem nezávislým na signální sekvenci (Sorensen *et al.*, 1995).

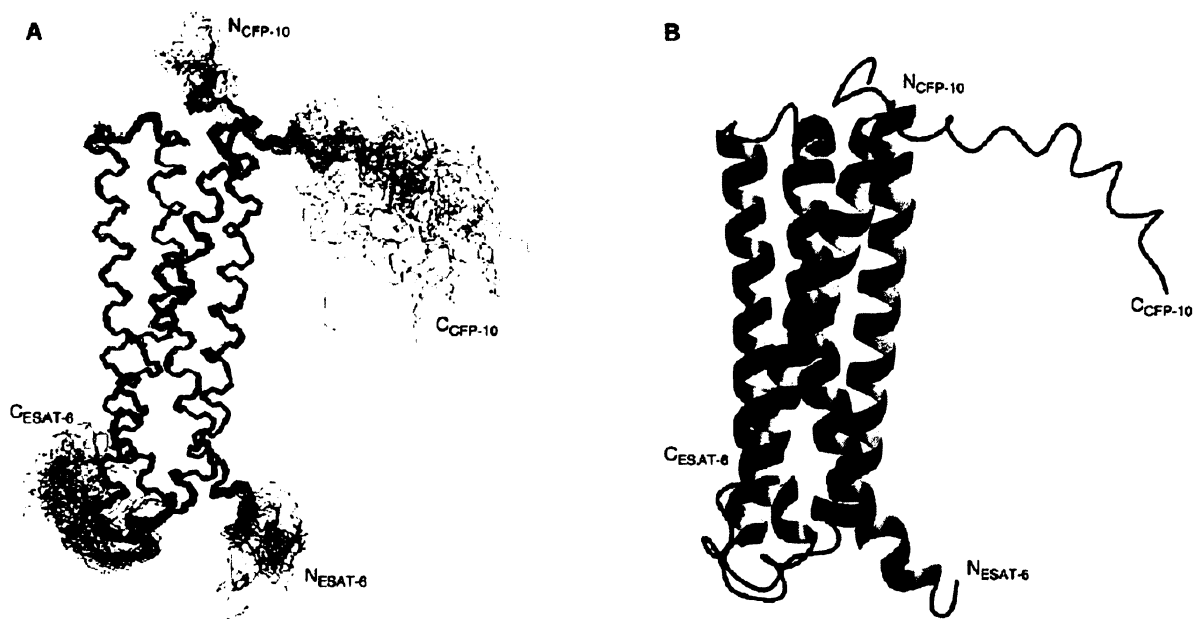
ESAT-6 a CFP-10 tvoří pevný 1:1 komplex ($K_d = 1,1 \times 10^{-8}$ M) (Renshaw *et al.*, 2002). Jádro komplexu sestává z dvou podobných „helix-turn-helix“ vlásenek jednotlivých proteinů, které jsou k sobě připojeny hydrofobně. Leží anti-paralelně naproti sobě a dohromady tvoří čtyř-šroubovici. Pozoruhodnou vlastností komplexu jsou vyčnívající N- a obzvláště C-konce obou proteinů, které tvoří flexibilní ramena na obou koncích čtyř-šroubovice. Dlouhé flexibilní C-koncové rameno CFP-10 je důležité pro vazbu na povrch buněk (Renshaw *et al.*, 2005).

Předpokládá se, že komplex dokáže vytvářet póry v plazmatické membráně buněk a tím je lyzovat (Hsu *et al.*, 2003). Nicméně po analýze rozložení nábojů na povrchu komplexu se zdá být nepravděpodobné, že by tvořil póry. Dále nebylo identifikováno žádné aktivní enzymové místo, což předpokládá nekatalyckou roli komplexu. Vlastnosti povrchu spíše

naznačují specifickou vazbu na jeden nebo více cílových proteinů. Předpokládá se, že komplex hraje klíčovou roli při signalizaci patogen-hostitelská buňka (Renshaw *et al.*, 2005).

Oblast RD1 a jeho okolí (extended RD1) kóduje proteinový sekreční systém ESX-1, který je zodpovědný za sekreci ESAT-6 a CFP-10 a zahrnuje vyvolání imunologické reakce a infekční nemoci. V kyselém pH se komplex 1:1 rozpadá a poté se ESAT-6 pravděpodobně zanořuje do lipidické dvouvrstvy, zatímco CFP-10 s ní zůstává jen těsně spojena (Meher *et al.*, 2006). CFP-10 funguje jako chaperon, který je důležitý pro transport a ochranu ESAT-6 před tím než se nedostane do fagozómu (de Jonge *et al.*, 2007).

Povrchové proteiny a proteiny aktivně sekretované *M. tuberculosis* jsou důležité cíle pro imunitní systém během počáteční fáze infekce. ESAT-6 a CFP-10 jsou imunodominantní antigeny, které vyvolávají produkci IFN- γ u paměťových T lymfocytů v krvi infikovaných jedinců (Sorensen *et al.*, 1995). Tato vlastnost se již využívá u některých typů diagnostických testů.



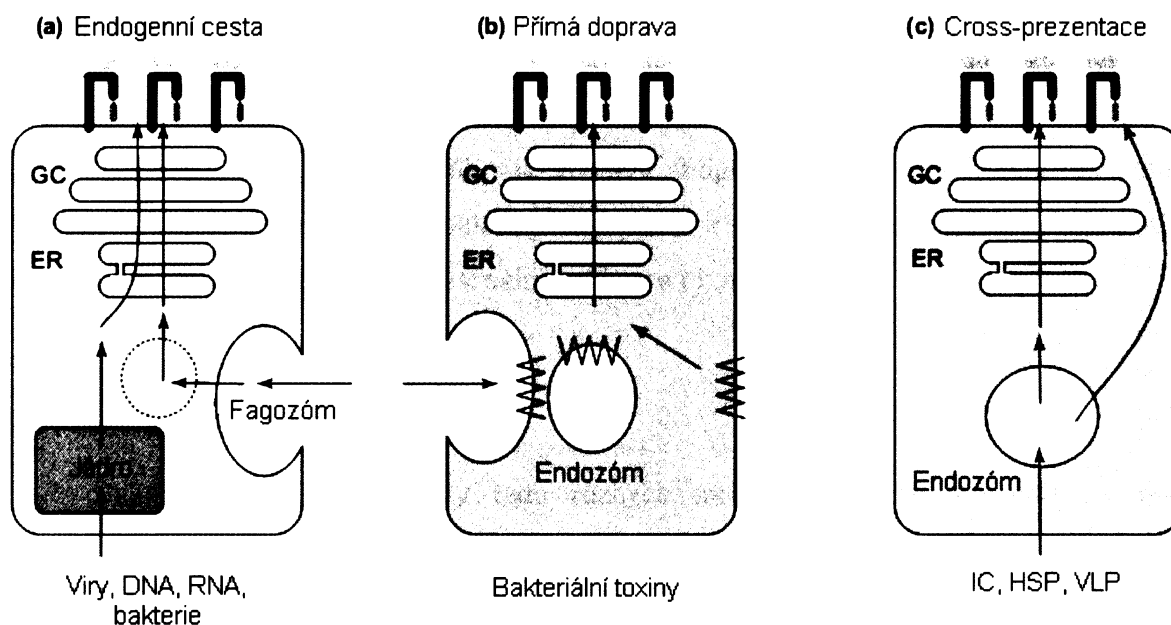
Obr. 4: Struktura komplexu CFP-10.ESAT-6 (Renshaw *et al.*, 2005). Červeně je znázorněn CFP-10 a modře ESAT-6. (A) nejvhodnější překrytí proteinového skeletu. (B) spojitě znázornění páteře komplexu CFP-10.ESAT-6

7. Prezentace antigenů

MHC (major histocompatibility complex) je genový komplex kódující MHC glykoproteiny, které jsou vystavované spolu s vlastními nebo cizími epitopy antigenů na povrch buněk.

MHC glykoproteiny I. třídy (MHC I) se vyskytují na všech buňkách, které mají jádro. Skládají se z transmembránového řetězce α a s ním nekovalentně připojené podjednotky β_2 -mikroglobulinu. Vazebné místo je na obou koncích uzavřeno, proto jsou schopny vázat peptidy o délce maximálně 8–10 aminokyselin. Vystavované peptidy pocházejí z proteinů syntetizovaných samotnou buňkou.

Existuje několik různých cest jak dopravit antigeny na molekulu MHC I a stimulovat tak cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty (CTL). Antigen může být vytvořen samotnou antigenprezentující buňkou nebo přímo dopraven do cytoplazmy APC a poté endogenní dráhou vystaven na povrchu buněk v komplexu s MHC I. Jiný způsob zahrnuje křížovou prezentaci (cross-presentation), pomocí které lze vystavovat exogenní a s buňkou asociované antigeny na molekule MHC I.



Obr. 5: Doprava antigenů na MHC I (Moron *et al.*, 2004). GC – Golgiho komplex. ER – endoplazmatické retikulum. IC – imunokomplexy. HSP – „heat-shock“ proteiny. VLP – „virus-like“ partikule. **(a)** Antigeny jsou buď antigenprezentující buňkou syntetizovány do cytozolu, nebo jsou přijímány fagocytózou. Poté jsou rozštěpeny v proteazómu, přeneseny přes TAP do endoplazmatického retikula, navázány na molekulu MHC I a vystaveny na povrchu buňky. **(b)** Bakteriální toxiny dopraví antigen přes cytoplazmatickou membránu přímo do cytoplazmy APC. Antigen poté postupuje klasickou cestou vystavení na povrchu buňky. **(c)** Antigen přijatý endocytózou je vystaven buď s molekulou MHC II, nebo pomocí procesu křížové prezentace s molekulou MHC I.

MHC glykoproteiny II. třídy (MHC II) se nacházejí především na APC. Skládají se ze dvou nekovalentně spojených transmembránových podjednotek α a β . Společně vytvářejí vazebné místo na obou koncích otevřené, proto jsou schopny vázat peptidy o délce 15–35 aminokyselin a delší. Vystavované peptidy pocházejí z vnějšího prostředí a jsou rozpoznávány $CD4^+$ T lymfocyty.

8. Doprava antigenu do antigen-prezentujících buněk

Cytotoxické $CD8^+$ T lymfocyty (CTL) rozpoznávají antigeny vystavené na povrchu APC v komplexu s molekulami MHC I a účinně vyvolávají imunitní reakce při infekčních a nádorových onemocněních. Aktivace CTL volnými antigeny z exogenních proteinů je často neefektivní, protože tyto antigeny jsou většinou vystavovány na molekulách MHC II. Tento typ molekul je rozeznáván pomocnými $CD4^+$ T lymfocyty, což vede k vyvolání jiných imunitních reakcí.

Úspěšné dopravení a správné vystavení antigenu na povrchu buněk lze využít pro navození imunitní odpovědi nebo naopak k jejímu potlačení. Další použití se naskytá při vývoji nových diagnostických metod a vakcinačních látek. Otázkou tedy zůstává, jak efektivně dopravit antigen, aby byl vystaven na požadovaných MHC glykoproteinech.

Existuje více různých technik, jak dopravit antigen do buněk. Lze využít lipozómy, virozómy, ISCOM (**immune stimulating complex**), rekombinantní protilátky, syntetické lipopeptidy, DNA vakcíny nebo bakteriální vektory a toxiny.

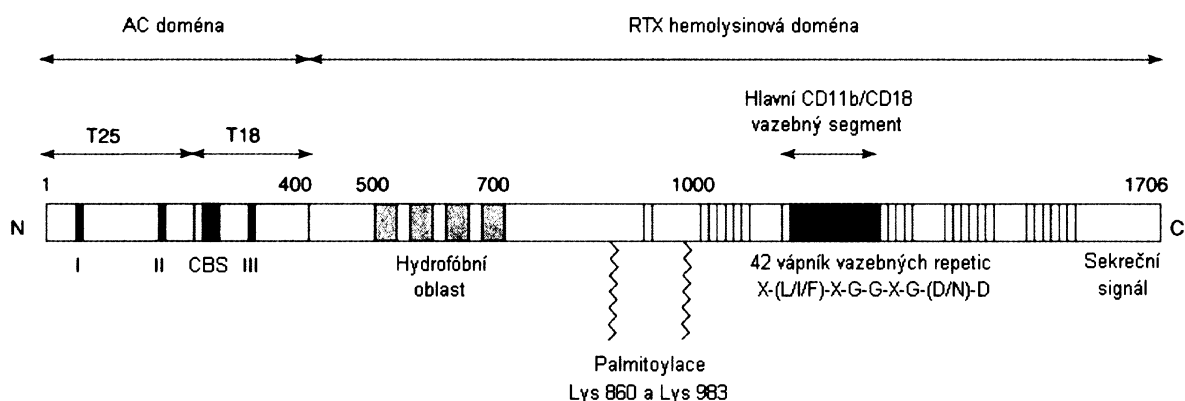
8.1. Bakteriální toxiny

Bakteriální toxiny vyvinuly řadu různých mechanismů, kterými pronikají přes plazmatickou membránu do buněk. Jejich vlastnosti jsou základem několika strategií jak dopravit antigen do buněk pro prezentaci na MHC molekulách a vyvolat imunitní reakce. Použití bakteriálních toxinů umožnila jejich molekulární charakterizace, nalezení funkčních domén a genetická modifikace. Získaly se tak nástroje, které ztratily své nežádoucí toxické vlastnosti. Jako příklad lze uvést toxiny bakterií *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* nebo *Bordetella pertussis* (Donnelly *et al.*, 1993; Sebo and Ladant, 1993; Goletz *et al.*, 1997; Sirard *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2000).

8.2. Adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*

Bakterie *Bordetella pertussis* produkuje unikátní adenylát cyklázový toxin (ACT, CyaA), který se specificky váže na receptor $\alpha_M\beta_2$ intergrin (CD11b/CD18) přítomného na povrchu antigen-prezentujících buněk. Pomocí detoxifikovaného ACT lze s úspěchem přesně dopravit antigeny do cílových buněk.

ACT sestává z N-koncové katalytické AC domény (~ 400 aminokyselin) a C-koncové RTX hemolytické domény (~ 1300 aminokyselin), která se skládá z hydrofóbní kanálotvorné domény (Benz *et al.*, 1994), cílového místa pro post-translační palmitoylaci (Hackett *et al.*, 1994), vápník-vazebnou doménou (30–40 kopií charakteristických sekvencí bohatých na glycin a aspartát typu X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D) (Rose *et al.*, 1995) a C-koncového sekrečního signálu (Sebo and Ladant, 1993).

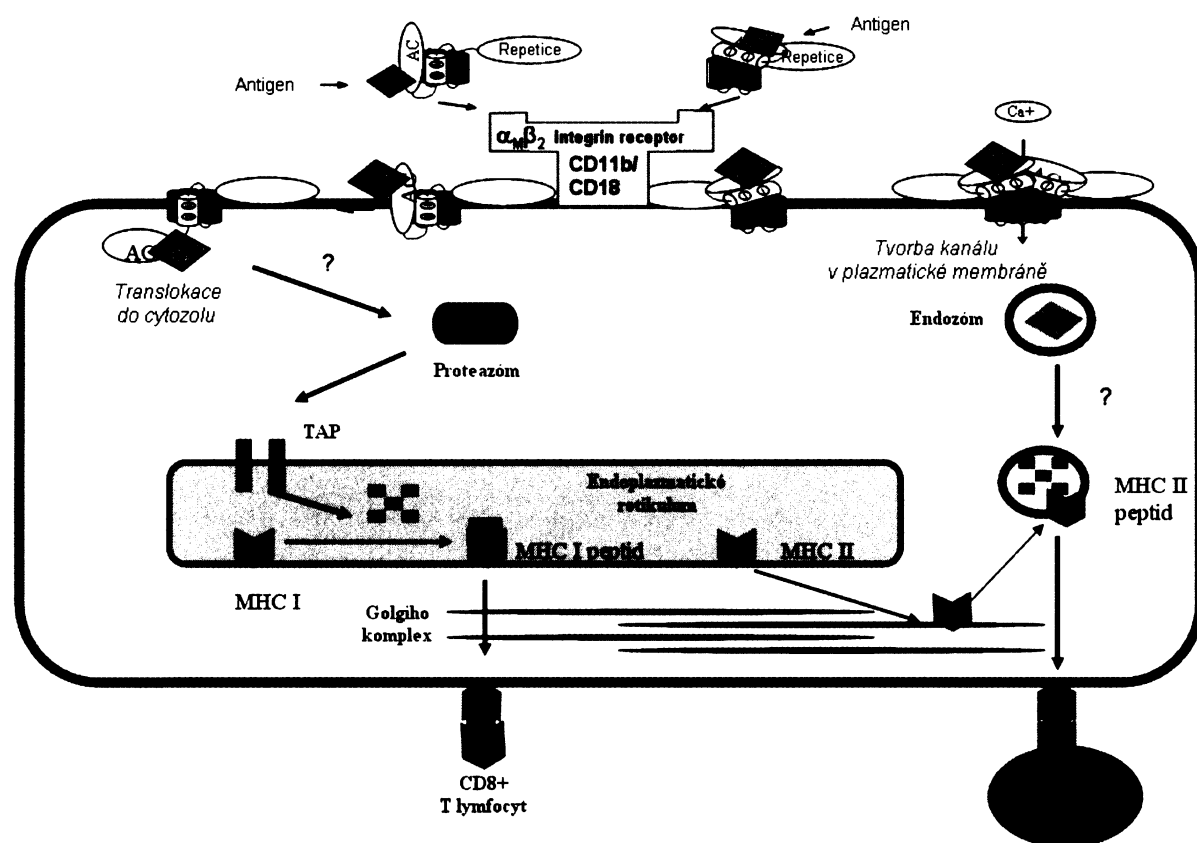


Obr. 6: Schématické znázornění ACT (Vojtova *et al.*, 2006). ACT tvoří 1706 aminokyselin a skládá se ze dvou hlavních částí – invazivní adenylát cyklázové AC domény a RTX hemolysinové domény.

RTX doména váže toxin na cílové buňky a zvyšuje propustnost membrány vznikem kation-selektivních pórů (Ladant and Ullmann, 1999). AC doména je schopna pronikat přímo přes cytoplazmatickou membránu do cytozolu (Guermonprez *et al.*, 1999), kde po navázání kalmodulinu katalyzuje přeměnu ATP na cAMP (Ladant and Ullmann, 1999). ACT tak spojuje dvě odlišné strategie manipulace s fyziologií hostitelské buňky. Ovlivňuje buněčné signální dráhy zvýšenou hladinou cAMP a zasahuje do iontové rovnováhy buňky změnou propustnosti cytoplazmatické membrány (Vojtova *et al.*, 2006).

Nezbytným dějem vedoucím k aktivaci toxinu je jeho posttranslační úprava, která spočívá v palmitoylaci ϵ -aminoskupin lyzinů 860 a 983 nacházejících se v RTX doméně (Hackett *et al.*, 1995). Modifikaci zajišťuje acyltransferáza kódována genem *cyaC* (Sebo *et al.*, 1991).

Genetickou manipulací je možno připravit ACT fúzní proteiny, které nesou ve své AC doméně peptidy nebo malé proteiny (Ladant *et al.*, 1992; Osicka *et al.*, 2000). Do cytozolu vnikají po navázání na receptor CD11b/CD18, který se nachází na povrchu makrofágů a dendritických buněk (Guermontprez *et al.*, 2001). Vnesené antigeny mohou být vystavené jak s molekulou MHC I, tak MHC II, a vyvolat tak příslušné CD4+ a CD8+ imunitní odpovědi (Sebo *et al.*, 1995; Dadaglio *et al.*, 2000; Osicka *et al.*, 2000; Loucka *et al.*, 2002; Simsova *et al.*, 2004).



Obr. 7: Doprava antigenu pomocí ACT (Simsova *et al.*, 2004). AC doména nesoucí antigen je přenesena do cytozolu, kde je zpracována v proteazómu. Peptidy jsou poté přemístěny přes TAP do endoplazmatického retikula a navázány na nově vznikající molekuly MHC I. Komplex MHC I-peptid je vystaven na povrchu CD8+ T lymfocytům. ACT s vloženým antigenem může být také endocytován a následně zpracován. Vzniklé peptidy jsou vystaveny s molekulou MHC II CD4+ T lymfocytům.

Fúzní proteiny ACT-ESAT-6 a ACT-CFP-10 jsou po vazbě na receptor CD11b/CD18 rychle endocytovány (Khelef *et al.*, 2001), což vede k 10ti až 20ti-násobnému snížení molárního množství antigenů potřebných k restimulaci T lymfocytů (Wilkinson *et al.*, 2005). Dále bylo ukázáno, že se zlepšilo samotné rozpoznání antigenu (Vordermeier *et al.*, 2004) a že restimulace probíhala u více než 90% pacientů s aktivní tuberkulózou a nakažených osob bez příznaků nemoci (Wilkinson *et al.*, 2005). Doprava pomocí ACT zvyšuje počet buněk produkujících IFN- γ , což zjednodušuje jeho detekci u lidí, kteří vykazují nízké nebo žádné reakce na nativní TB antigeny (Wilkinson *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006). Další výhodou využití ACT je snížení objemu krve (méně než 0,5 ml) oproti komerčním produktům (více než 4 ml) (Connell *et al.*, 2007).

9. Závěr

Rychlá a přesná detekce latentní infekce *M. tuberculosis* je doposud veliký problém. Stávající testy jsou buď příliš zdlouhavé, finančně náročné nebo málo specifické s falešnými výsledky. Jako vhodnou strategií se zdá být krevní test, který je založen na použití specifických mykobakteriálních antigenů CFP-10, ESAT-6 a TB7.7 produkovaných pouze virulentními kmeny *M. tuberculosis*. Jsou imunodominantní a vyvolávají produkci IFN- γ paměťovými T lymfocyty u lidí, kteří se setkali s *M. tuberculosis*. Toho využívají už stávající komerční testy QuantiFERON-TB Gold a T SPOT-TB, ale bohužel jsou příliš drahé pro rutinní aplikaci v rozvojových zemích. Proto je nutné dále hledat nové metody, které budou dostatečně citlivé, specifické, lehce použitelné a hlavně levné. Vhodnou pomocí při zdokonalování současných testů jsou jedinečné vlastnosti adenylát cyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis*, který se specificky váže na receptor přítomný na povrchu antigen-prezentujících buněk, zlepšuje prezentaci antigenů, snižuje jejich potřebné molární množství a zvyšuje počet buněk produkujících IFN- γ .

10. Seznam použité literatury

- Andersen, P., Munk, M. E., Pollock, J. M. and Doherty, T. M. (2000).** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099-104.
- Anderson, S. T., Williams, A. J., Brown, J. R., Newton, S. M., Simsova, M., Nicol, M. P., Sebo, P., Levin, M., Wilkinson, R. J. and Wilkinson, K. A. (2006).** Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* undetected by tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 1038-42.
- Arend, S. M., Ottenhoff, T. H., Andersen, P. and van Dissel, J. T. (2001).** Uncommon presentations of tuberculosis: the potential value of a novel diagnostic assay based on the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* **5**, 680-6.
- Arnold, C. (2007).** Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* **13**, 120-8.
- Barnes, P. F. (2001).** Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 807-8.
- Behr, M. A., Warren, S. A., Salamon, H., Hopewell, P. C., Ponce de Leon, A., Daley, C. L. and Small, P. M. (1999).** Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* **353**, 444-9.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P. (1994).** Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 27231-9.
- Berthet, F. X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., Andersen, P. and Gicquel, B. (1998).** A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **144 (Pt 11)**, 3195-203.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D. and Cole, S. T. (2002).** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3684-9.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V. and Mosteller, F. (1994).** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**, 698-702.
- Connell, T. G., Shey, M. S., Seldon, R., Rangaka, M. X., van Cutsem, G., Simsova, M., Marcekova, Z., Sebo, P., Curtis, N., Diwakar, L., Meintjes, G. A., Leclerc, C., Wilkinson, R. J. and Wilkinson, K. A. (2007).** Enhanced ex vivo stimulation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells in human immunodeficiency virus-infected persons via antigen delivery by the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase vector. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 847-54.

- Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P. and Leclerc, C. (2000).** Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**, 3867-72.
- de Jonge, M. I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M. M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., Honore, N., Marchal, G., Jiskoot, W., England, P., Cole, S. T. and Brosch, R. (2007).** ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* **189**, 6028-34.
- Di Perri, G. and Bonora, S. (2004).** Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? *J Antimicrob Chemother* **54**, 593-602.
- Dinnes, J., Deeks, J., Kunst, H., Gibson, A., Cummins, E., Waugh, N., Drobniewski, F. and Lalvani, A. (2007).** A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* **11**, 1-196.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Hawe, L. A., Friedman, A., Shi, X. P., Leander, K. R., Shiver, J. W., Oliff, A. I., Martinez, D., Montgomery, D. and et al. (1993).** Targeted delivery of peptide epitopes to class I major histocompatibility molecules by a modified *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3530-4.
- Drobniewski, F., Rusch-Gerdes, S. and Hoffner, S. (2007).** Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (EUCAST document E.DEF 8.1)--report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect* **13**, 1144-56.
- Drobniewski, F. A., Caws, M., Gibson, A. and Young, D. (2003).** Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **3**, 141-7.
- Goletz, T. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H., Keith, J. M. and Berzofsky, J. A. (1997).** Delivery of antigens to the MHC class I pathway using bacterial toxins. *Hum Immunol* **54**, 129-36.
- Gounder, C., De Queiroz Mello, F. C., Conde, M. B., Bishai, W. R., Kritski, A. L., Chaisson, R. E. and Dorman, S. E. (2002).** Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* **40**, 1989-93.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. and Leclerc, C. (2001).** The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* **193**, 1035-44.
- Guermontprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. and Leclerc, C. (1999).** Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* **162**, 1910-6.

- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Hewlett, E. L. (1994).** Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* **266**, 433-5.
- Hackett, M., Walker, C. B., Guo, L., Gray, M. C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hewlett, E. L. and Sebo, P. (1995).** Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 20250-3.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., Marks, C. B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R. G., Derrick, S. C., Collins, F. M., Morris, S. L., King, C. H. and Jacobs, W. R., Jr. (2003).** The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12420-5.
- Chan, E. D. and Iseman, M. D. (2002).** Current medical treatment for tuberculosis. *BMJ* **325**, 1282-6.
- Jarlier, V. and Nikaido, H. (1994).** Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**, 11-8.
- Jatana, S. K., Nair, M. N., Lahiri, K. K. and Sarin, N. P. (2000).** Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Pediatr* **37**, 375-82.
- Khelef, N., Gounon, P. and Guiso, N. (2001).** Internalization of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage cytotoxicity. *Cell Microbiol* **3**, 721-30.
- Kobashi, Y., Obase, Y., Fukuda, M., Yoshida, K., Miyashita, N. and Oka, M. (2006).** Clinical reevaluation of the QuantiFERON TB-2G test as a diagnostic method for differentiating active tuberculosis from nontuberculous mycobacteriosis. *Clin Infect Dis* **43**, 1540-6.
- Ladant, D., Glaser, P. and Ullmann, A. (1992).** Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem* **267**, 2244-50.
- Ladant, D. and Ullmann, A. (1999).** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**, 172-6.
- Lee, J. Y., Choi, H. J., Park, I. N., Hong, S. B., Oh, Y. M., Lim, C. M., Lee, S. D., Koh, Y., Kim, W. S., Kim, D. S., Kim, W. D. and Shim, T. S. (2006).** Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* **28**, 24-30.
- Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C. and Sebo, P. (2002).** Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* **70**, 1002-5.

- Lyashchenko, K., Colangeli, R., Houde, M., Al Jahdali, H., Menzies, D. and Gennaro, M. L. (1998).** Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun* **66**, 3936-40.
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. and Stover, C. K. (1996).** Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**, 1274-82.
- Marei, A., Ghaemmaghami, A., Renshaw, P., Wiselka, M., Barer, M., Carr, M. and Ziegler-Heitbrock, L. (2005).** Superior T cell activation by ESAT-6 as compared with the ESAT-6-CFP-10 complex. *Int Immunol* **17**, 1439-46.
- Mazurek, G. H., Jereb, J., Lobue, P., Iademarco, M. F., Metchock, B. and Vernon, A. (2005).** Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep* **54**, 49-55.
- Meher, A. K., Bal, N. C., Chary, K. V. and Arora, A. (2006).** *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS J* **273**, 1445-62.
- Moron, G., Dadaglio, G. and Leclerc, C. (2004).** New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol* **25**, 92-7.
- Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guermontprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Sebo, P. (2000).** Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* **68**, 247-56.
- Parrish, N. M., Dick, J. D. and Bishai, W. R. (1998).** Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **6**, 107-12.
- Parsa, S. and Pfeifer, B. (2007).** Engineering bacterial vectors for delivery of genes and proteins to antigen-presenting cells. *Mol Pharm* **4**, 4-17.
- Renshaw, P. S., Lightbody, K. L., Veverka, V., Muskett, F. W., Kelly, G., Frenkiel, T. A., Gordon, S. V., Hewinson, R. G., Burke, B., Norman, J., Williamson, R. A. and Carr, M. D. (2005).** Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J* **24**, 2491-8.
- Renshaw, P. S., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S. V., Hewinson, R. G., Williamson, R. A. and Carr, M. D. (2002).** Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem* **277**, 21598-603.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D. (1995).** Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* **270**, 26370-6.

- Ryan, E. T. and Calderwood, S. B. (2000).** Cholera vaccines. *Clin Infect Dis* **31**, 561-5.
- Sebo, P., Fayolle, C., d'Andria, O., Ladant, D., Leclerc, C. and Ullmann, A. (1995).** Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8⁺ cytotoxic T cells. *Infect Immun* **63**, 3851-7.
- Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H. and Ullmann, A. (1991).** High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene* **104**, 19-24.
- Sebo, P. and Ladant, D. (1993).** Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol Microbiol* **9**, 999-1009.
- Shen, L. and Rock, K. L. (2006).** Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **18**, 85-91.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. and Rock, K. L. (2004).** Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-65.
- Simsova, M., Sebo, P. and Leclerc, C. (2004).** The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*--a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *Int J Med Microbiol* **293**, 571-6.
- Sirard, J. C., Fayolle, C., de Chastellier, C., Mock, M., Leclerc, C. and Berche, P. (1997).** Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus anthracis* induces CD8-mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* **159**, 4435-43.
- Sorensen, A. L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. and Andersen, A. B. (1995).** Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**, 1710-7.
- Tortoli, E., Cichero, P., Piersimoni, C., Simonetti, M. T., Gesu, G. and Nista, D. (1999).** Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* **37**, 3578-82.
- van Pinxteren, L. A., Ravn, P., Agger, E. M., Pollock, J. and Andersen, P. (2000).** Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 155-60.
- Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2006).** Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* **9**, 69-75.
- Vordermeier, H. M., Simsova, M., Wilkinson, K. A., Wilkinson, R. J., Hewinson, R. G., Sebo, P. and Leclerc, C. (2004).** Recognition of mycobacterial antigens delivered by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by T cells from cattle with bovine tuberculosis. *Infect Immun* **72**, 6255-61.

- Wade, M. M. and Zhang, Y. (2004).** Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* **9**, 975-94.
- Welch, D. F., Guruswamy, A. P., Sides, S. J., Shaw, C. H. and Gilchrist, M. J. (1993).** Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* **31**, 2178-84.
- Wilkinson, K. A., Simsova, M., Scholvinck, E., Sebo, P., Leclerc, C., Vordermeier, H. M., Dickson, S. J., Brown, J. R., Davidson, R. N., Pasvol, G., Levin, M. and Wilkinson, R. J. (2005).** Efficient Ex vivo stimulation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase antigen toxoids. *Infect Immun* **73**, 2991-8.
- Wilkinson, K. A., Stewart, G. R., Newton, S. M., Vordermeier, H. M., Wain, J. R., Murphy, H. N., Horner, K., Young, D. B. and Wilkinson, R. J. (2005).** Infection biology of a novel alpha-crystallin of *Mycobacterium tuberculosis*: Acr2. *J Immunol* **174**, 4237-43.