

Charles University in Prague

**Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Dissertation Thesis Summary



Mgr. Martina Švédová (Kosová)

***Mechanism of action of adenylate cyclase toxin
on immune function of dendritic cells***

Supervisor: prof. Ing. Peter Šebo, CSc.

Institute of Microbiology AS CR

Prague, 2017

Abstract

The adenylate cyclase toxin (CyaA) is a key virulence factor of the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. CyaA primarily penetrates CR3-expressing myeloid phagocytes and subverts cellular signaling by a rapid conversion of ATP to cAMP. In parallel, CyaA can form cation-selective pores within cellular membrane, provoking massive potassium efflux from cell cytosol. An enzymatically inactive adenylate cyclase toxoid (CyaA-AC⁻) has then been abundantly used as an efficient antigen delivery tool over the past 20 years.

This work focused mainly on the mechanism of action of CyaA toxin and of its toxoid on dendritic cells. We studied the potency of the CyaA toxoid to act as adjuvant, its penetration capacity and its potential use in delivery of influenza epitopes. We show that the pore-forming activity and the activation of MAP kinases JNK and p38 were crucial for the adjuvant effects of the CyaA-AC⁻, which provokes maturation of dendritic cells (DC) independently of Toll-like receptor (TLR) or inflammasome signaling. Furthermore, such CyaA-AC⁻-stimulated DC acquired the ability to induce CD8⁺ and CD4⁺ T cells responses, as was determined both *in vitro* and *in vivo*. We further showed that the first 371 amino acids are dispensable for the capacity of CyaA to deliver its AC domain with inserted epitopes into cytosol of DC, implicating that the role of the AC domain polypeptide in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of cells is rather passive. Our CyaA toxoid construct with an inserted antigen from the HA2 subunit of the hemagglutinin of influenza A viruses then induced both humoral and cellular immune responses in mice without the need for any added adjuvant and the responses protected mice against challenge with both homologous and heterologous influenza A viruses.

We further examined the role of the CyaA toxin in virulence of *B. pertussis*. We analysed the modulatory effects of CyaA action on TLR-activated murine and human DC. CyaA enhanced TLR-induced dissolution of cell adhesive contacts and chemotactic migration of DC *in vitro*, while it decreased the capacity of DC to present protein antigens and induce proliferation of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Manipulation of mouse DC by CyaA *in vitro* was shown to depend solely on the cAMP signaling and not on the pore-forming activity of the toxin. We further demonstrated in the mouse respiratory challenge model that the pore-forming activity of CyaA was not required for bacterial colonization. It, however, provoked neutrophil infiltration and the pore-forming activity importantly contributed to the overall pathology of lungs infected by *B. pertussis*.

Introduction

Adenylate cyclase toxin - CyaA

The adenylate cyclase toxin (CyaA, ACT) is a key virulence factor of the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. In the murine respiratory model, CyaA was found to be critical for the initiation of lung colonization by the bacteria (Goodwin & Weiss, 1990; Khelef et al., 1992; Harvill et al., 1999). CyaA consists of 1706 amino acids and belongs to the RTX (repeat in toxin) family of bacterial pore-forming toxins (Linhartova et al., 2010). It is a bi-functional toxin possessing two independent activities: an enzymatic cell-invasive adenylate cyclase (AC) domain, consisting of the first 400 residues, whereas a pore-forming RTX 'cytolysin' moiety comprises the remaining 1306 residues (Fig. 1).

CyaA primarily targets myeloid phagocytes expressing the $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18, CR3 or Mac-1) (Guermonprez et al., 2001) and translocates into their cytosol the adenylate cyclase enzymatic domain. Within the cell, the AC domain binds endogenous calmodulin and catalyses unregulated conversion of cellular ATP to cAMP, a key second messenger signalling molecule (Wolff et al., 1980; Confer & Eaton, 1982; Ladant & Ullmann, 1999). Through elevation of cytosolic cAMP levels the toxin disrupts cellular signaling pathways and significantly modulates host immune responses for the benefit of bacteria (Vojtova et al., 2006; Carbonetti, 2010).

In parallel, the pore-forming conformer of ACT makes cation-selective pores into host cell membrane, promoting efflux of cytosolic potassium ions (Basler et al., 2006; Osickova et al., 2010), which significantly interferes with a host ion homeostasis. Besides, the potassium efflux was shown to contribute to activation of the NALP3 inflammasome complex, which after priming by the LPS signal triggers production of IL-1 β by DC (Dunne et al., 2010; Osickova et al., 2010).

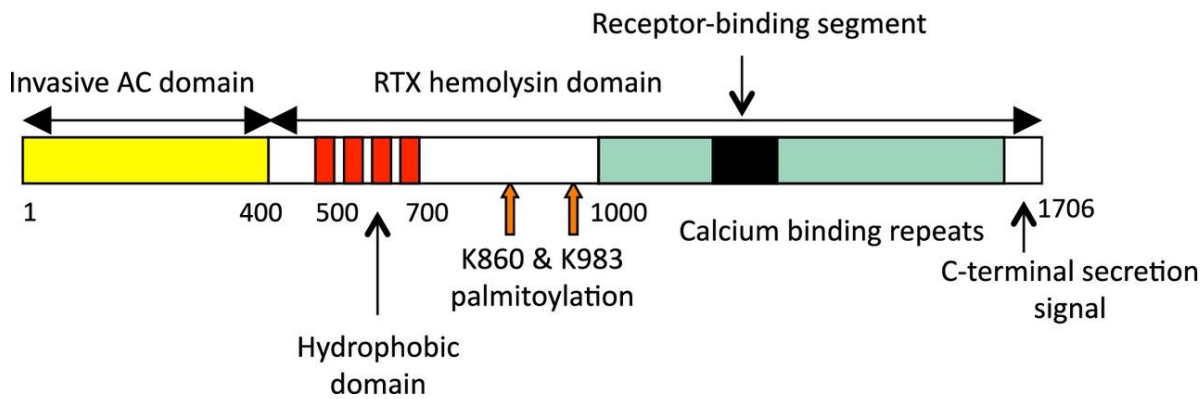


Fig. 1: Structural organization of the CyaA molecule. CyaA (1706 aa) consists of an N-terminal enzymatic adenylate cyclase (AC) domain (~400 residues) and a C-terminal pore-forming RTX hemolysin moiety (~1300 residues). The RTX cytolysin contains several specific sites: a hydrophobic pore-forming domain, sites of post-translational palmitoylation, an integrin binding domain, a calcium binding RTX repeats domain and a C-terminal secretion signal (Masin et al., 2015).

Adenylate cyclase toxoid – CyaA-AC⁻

CyaA-AC⁻ is a recombinant toxoid that is devoid of the enzymatic adenylate-cyclase activity of the toxin due to the insertion of a GlySer dipeptide into the ATP binding site of the AC domain (Osicka et al., 2000; Fayolle et al., 2001). The capacity of CyaA to effectively penetrate professional antigen presenting cells (APC), bearing the receptor CD11b/CD18 and to deliver heterologous antigens for both MHC class I and II presentation pathways (Fig. 2), allowed to use the CyaA-AC⁻ toxoid as an antigen delivery tool for induction of specific immune responses against various CD8⁺ and CD4⁺ T cells epitopes over the past 20 years (Sebo et al., 1995; Osicka et al., 2000; Loucka et al., 2002; Simsova et al., 2004; Adkins et al., 2012). Numerous CyaA constructs harbouring heterologous antigens have been shown to stimulate the immunity in particular against viruses, such as the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) (Sebo et al., 1995; Fayolle et al., 1996; Saron et al., 1997; Dadaglio et al., 2000; Fayolle et al., 2001), or human immunodeficiency virus (HIV) (Fayolle et al., 1996; Mascarell et al., 2005; Fayolle et al., 2001), the cytomegalovirus (CMV) (Jelinek et al., 2011) and influenza virus A (Stanekova et al., 2013). Most importantly, CyaA-AC⁻ was demonstrated to elicit both protective and therapeutic immune responses against HPV-16(18)-induced tumors (Preville et al., 2005; Mackova et al., 2006) and melanoma in mice (Dadaglio et al., 2003). The phase I clinical

trial testing CyaA for the delivery of the E7 oncoantigen from HPV 16 and 18 for immunotherapy of cervical cancer proved safety, immunogenicity and clinical efficacy (Van Damme et al., 2016). However, phase II clinical trial failed to prove clinical efficacy of the vaccine (www.gentice.com). This will need to be repeated with an improved vaccine design. Besides, there is another Phase I/II clinical trial underway in which CyaA is delivering a tyrosinase epitope into dendritic cells of patients with advanced metastatic melanoma (www.centerwach.com).

CyaA is also a potent immunoprotective antigen. The immunogenic properties of CyaA were first detected as the presence of high-titre anti-CyaA antibodies in either pertussis patients or in vaccinated infants and adults (Farfel et al., 1990; Arciniega et al., 1991).

Besides the ability to deliver antigens into professional antigen presenting cells (APC), the potency of CyaA-AC⁻ or previously used CyaA in inducing antigen-specific T cell responses appears to depend on the adjuvant capacity of the toxin/toxoid. The CyaA-AC⁻ toxoid lacks the adenylate cyclase activity, but it is still able to act as an adjuvant and is even more potent than the enzymatically active toxin (MacDonald-Fyall et al., 2004; Orr et al., 2007; Cheung et al., 2006).

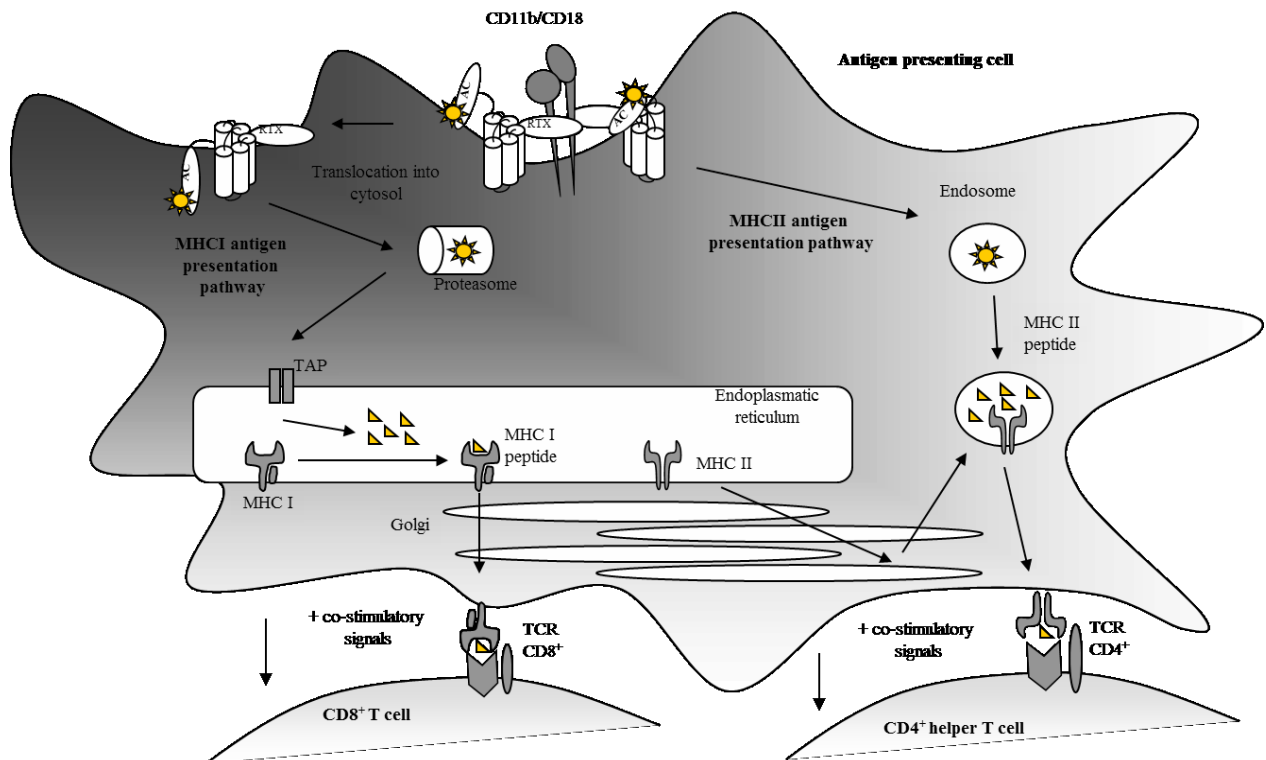


Fig. 2: CyaA as an antigen delivery tool. Numerous heterologous T-cell antigens could be inserted into the enzymatically inactive AC domain of CyaA. The purified CyaA toxoid carrying foreign antigens binds to CD11b/CD18 on the surface of antigen-presenting cells, in particular of dendritic cells. The toxoid penetrates the cellular membrane in two different conformations: the AC domain translocates across the cytoplasmic membrane into cell cytosol, or the molecules form oligomeric membrane channels that permeabilize cells, with the AC domain stuck at the external face of cellular membrane. The translocated AC domain bearing the inserted antigen is processed inside the cytosol by proteasome, the peptide epitopes are then transported by TAP1 into the endoplasmic reticulum and bind to newly synthesized MHC I glycoprotein molecules. The MHC I – peptide complexes are transported to the cell surface and are presented to CD8⁺ T lymphocytes. In parallel, upon CD11b/CD18 receptor-mediated endocytosis, the membrane-associated molecules with passenger antigens are processed to antigenic peptides in endosomes and bind to MHC II molecules. The MHC II complexes are next exposed on cell surface and presented to CD4⁺ T cells. (Sebo et al., 2014).

Aims

Despite many studies on the CyaA toxin and toxoid, the mechanisms of their action are still poorly understood. Therefore we wanted to address several issues, particularly concerning the adjuvant effect of the toxoid and its capacity to deliver antigens and induce specific immune responses against selected inserted epitopes. Besides, we wanted to examine the role of CyaA toxin (and its adenylate cyclase and pore-forming activity) under infectious conditions.

Hence, our experimental work had the following aims:

- Identify the mechanism of action of the adenylate cyclase toxoid which is responsible for its adjuvanticity. Characterize the CyaA-AC-induced maturation, migratory and T cell stimulatory capacity of DC.
- Characterize the antigen delivery capacity of mutants of adenylate cyclase toxin with shortened AC domain, in order to determine which parts of the AC domain are necessary for its translocation across the cell plasma membrane.
- Prepare and purify the recombinant adenylate cyclase toxoids bearing the CD8⁺ and CD4⁺ T cells epitopes of the HA2 subunit of hemagglutinin of influenza A viruses. These toxoids will further be tested in mouse model for the ability to induce effective protection against different variants of influenza A viruses.
- Determine how active adenylate cyclase toxin modulates the functions of LPS-stimulated dendritic cells.
- Test if the pore-forming activity of adenylate cyclase toxin contributes to virulence of *Bordetella pertussis* during infection (lethality and pathogenesis)

Results and discussion

CyaA as an antigen delivery tool and potent adjuvant

(Publication 1, 4, 3)

Publication 1

In our work we deciphered a novel intrinsic adjuvant activity of the adenylate cyclase toxoid (CyaA-AC⁻). We show that a low concentration (300 ng/ml) of almost LPS-free (lower than 120 EU/mg) CyaA toxoid induces maturation of CD11b-expressing DC (Fig. 3). By using BMDC from various knock-out mice, we excluded the dependence of this maturation process on several important TLR or inflammasome signaling pathways. The results allow to postulate that the maturation process of CyaA-AC⁻-treated DC is driven by the potassium efflux caused by the pore-forming activity of the toxoid and is regulated via JNK and p38 MAPKs (Fig. 5). Moreover, CyaA-AC⁻-activated DC are able to stimulate T cell responses both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 4).

The studies demonstrated that in line with the previously described ability to act as a good antigen delivery tool, the CyaA-AC⁻ toxoid induces DC maturation, which is required for an efficient antigen-specific priming of naïve T cells (Fayolle et al., 1996; Adkins et al., 2012). Importantly, the toxoid was shown to induce a prominently Th1-polarized type of immune responses (Dadaglio et al., 2003; Ross et al., 2004; Mascarell et al., 2005), which is an observation potentially relevant also for the use of the toxoid as a new antigen and adjuvant in the next generation of acellular pertussis vaccines. Indeed, shifting of the predominantly Th2-polarized immune response to the currently used acellular pertussis vaccines (Ausiello et al., 1997; Ryan et al., 1998) towards induction of more Th1/Th17-polarized responses appears to be highly desirable in view of induction of longer-lasting and more efficient protective immunity against *B. pertussis* infection (Ross et al., 2004; Mills et al., 2014). It is noteworthy that genetically fully detoxified CyaA-AC⁻-Hly⁻ (CyaA-QR-AC⁻) toxoid (Osickova et al., 2010), protected by a patent portfolio, awaits evaluation as a novel aP vaccine component in the baboon weanling immunization model and *B. pertussis* challenge studies (Sebo et al., 2014).

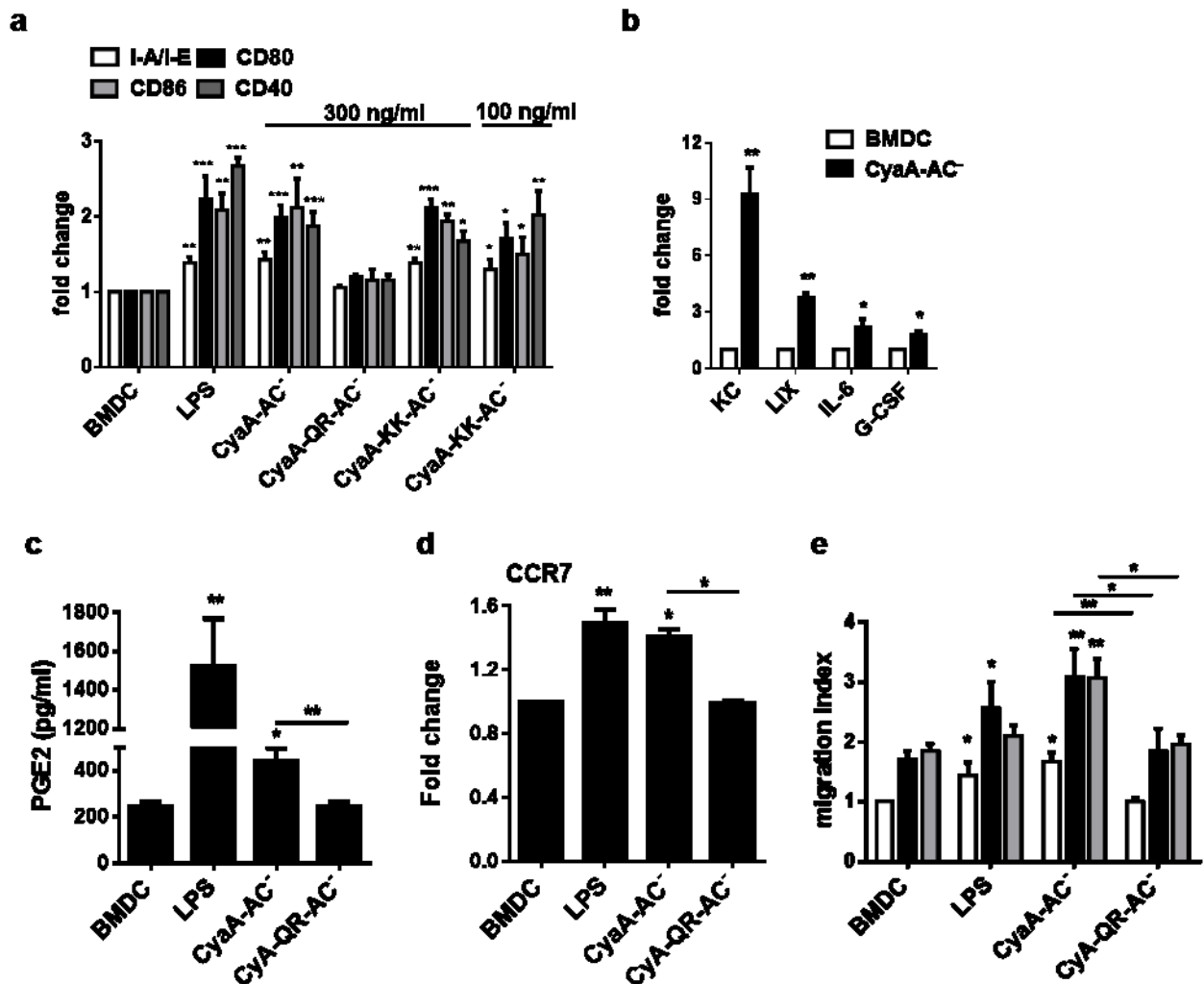


Fig. 3: Pore-forming activity-dependent K⁺ efflux determines the capacity of CyaA-AC⁻ toxoid to trigger phenotypic maturation and migration of BMDC. a) BMDC (1 × 10⁶/ml) were left untreated, or were incubated with LPS (100 ng/ml) or with CyaA-AC⁻, mutant toxoid with reduced pore-forming activity CyaA-QR-AC⁻ or toxoid with enhanced pore-forming activity CyaA-KK-AC⁻ at indicated concentrations for 24 h. The expression of I-A/I-E, CD80, CD86 and CD40 was detected in CD11c⁺Hoechst⁻ cells by flow cytometry. Graphs represent fold change of marker expression on mock-treated BMDC. b) BMDC (1 × 10⁶/ml) were left untreated, or incubated with CyaA-AC⁻ (300 ng/ml) for 24 h. The inflammatory cytokines and chemokines were evaluated from cell culture supernatant using cytokine array kit with chemiluminescence detection. Graph represent fold change of chemiluminiscent signal for each cytokine obtained in mock-treated BMDC. BMDC (1 × 10⁶/ml) were incubated with LPS (100 ng/ml) or CyaA-AC⁻ or CyaA-QR-AC⁻ mutant (300 ng/ml) for 24 h (c, d and f). c) PGE2 production in BMDC culture supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay after 24 h. d) The expression of CCR7 detected by flow cytometry in CD11c⁺Hoechst⁻ cells after 24 h. e) After 24 h of toxoids treatments, cells were washed and allowed to migrate for 4 h across Transwell membrane towards medium alone or containing CCL19 or

CCL21 (200 ng/ml) chemokines. Transmigrated cells (Hoechst⁺) were counted by flow cytometry. The number of transmigrated mock-treated BMDC was set as 1 (migration index). All values represent the means \pm s.e. of at least n=3 (*P<0.05, **P<0.005 and ***P<0.001).

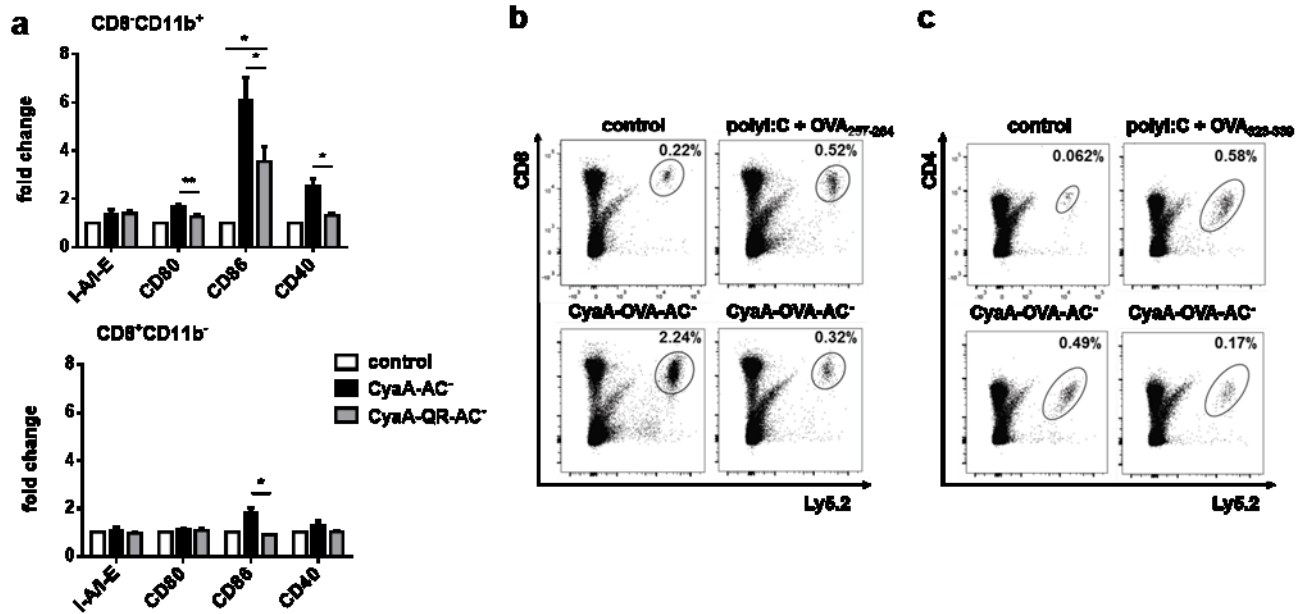


Fig. 4: Pore-forming capacity of CyaA-AC⁻ toxoid induces maturation of splenic DC and expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vivo*. a) Mice received i.v. PBS with 1M urea (control) or 25 μ g of CyaA-AC⁻ or CyaA-QR-AC⁻ toxoid. After 24 h mice were killed, total splenocytes were isolated and expression of splenic DC maturation markers was determined by flow cytometry in CD8⁺CD11b⁺ and CD8⁺CD11b⁻ subpopulations of CD3⁺CD11c⁺Hoechst⁺ cells. a) Graphs represent means \pm s.e. from n=3 expressed as marker fold change of control CD8⁺CD11b⁺ and CD8⁺CD11b⁻ DC (*P<0.05, **P<0.005). (b and c) Expansion of adoptively transferred OVA-specific CD8⁺ (b) and CD4⁺ (c) T cells by i.v. administered toxoids was determined after 4 days by flow cytometry as a percentage of CD8⁺Ly5.2⁺ or CD4⁺Ly5.2⁺T cells, respectively, using 2×10^6 counted spleen cells. Dot plots are representative of n=2, 3 mice per group. (Corresponding graphs are in publication).

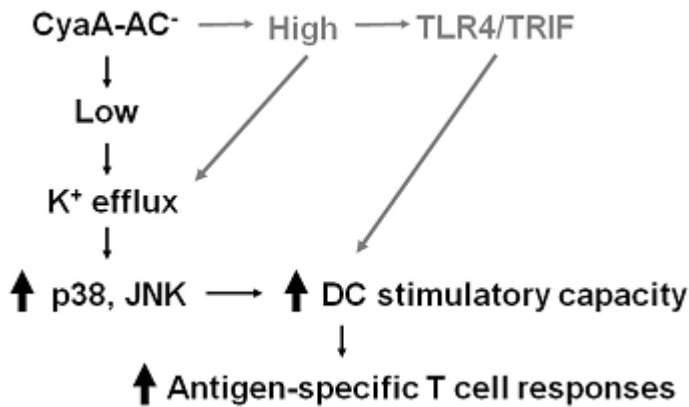


Fig. 5: Proposed mechanism of adjuvanticity of CyaA-AC⁻. A model of CyaA-AC⁻ mediated enhancement of T-cell stimulatory functions of DC which depends on pore-forming-dependent K⁺ efflux at low toxoid concentrations and it is potentiated by TLR4/TRIF signaling (Dadaglio et al., 2014) at higher toxoid concentrations. Gray untested hypotheses in this study.

Publication 4

Our study deciphered the contribution of the AC domain to the mechanism of its translocation across the cytoplasmic membrane by using a set of 18 CyaA mutants deleted in portions of their AC domain. We analyzed the capacity of all these CyaA deletion mutants to deliver ovalbumin antigen into the MHC class I presentation pathway. As a result we have shown that up to 371 amino acids in the AC domain are unnecessary for it to reach the cell cytosol. This was determined by the delivery of the MHC class I restricted T cell epitope of ovalbumin into DC followed by a successful stimulation of specific CD8⁺ T cell response. It is thus plausible to suppose that the AC domain plays a rather passive role during the process of membrane penetration and does not contain any essential sequences needed for its penetration into cells. Moreover, the Hly moiety was able to deliver two large artificial polypeptides (146 and 203 amino acid residues long) into cell cytosol and to stimulate specific mouse and human CTL responses.

The self-adjuvanting capacity of the CyaA toxoid together with the possibility to replace the entire portion of the AC domain for the delivery of larger polypeptide antigens appear to be quite useful features of the CyaA toxoid, thus encouraging the design of a next generation of CyaA based vaccines.

Publication 3

As an application of the above discussed results, we tested CyaA-AC⁻ toxoids as a tool for delivery of an influenza vaccine. The HA2 antigen (residues 23-185), which we chose for our study, was from H3 subtype and contained several conserved T and B cell epitopes of influenza A virus (Saikh et al., 1995; Jackson et al., 1994).

Vaccination with CyaA-AC⁻-HA2 provided earlier clearance of influenza virus from mice lungs and protected mice against a lethal infection with homologous human influenza virus A/Miss H3N2 and importantly also against the heterologous highly pathogenic avian influenza virus A/Chick H7N1. Interestingly, our report was the first one to show a heterosubtypic protection against influenza A infection mediated by an HA2-based vaccine that can stimulate both arms of protective immunity without the need of adjuvant. This was previously possible only after vaccination with live attenuated influenza vaccines, which is not safe for everyone (Stropkovska et al., 2010). Influenza vaccines should be designed to elicit both antibody and T cell responses, as also T cell immunity plays an important role in clearance of the virus and contributes to the milder course of infection (Wang & Palese, 2009). There is a possibility to design new CyaA-based vaccines that would be efficient against a broader spectrum of influenza A viruses. This might be achieved by a combination of selected conserved HA2 peptides from each subtype group. Such vaccines with a broadened protective efficacy would be important particularly to prevent possible worldwide influenza pandemic.

CyaA and its role in *Bordetella pertussis* infection

(Publication 2 and 5)

Publication 2

We found that cAMP signaling of CyaA enhanced TLR-induced dissolution of cell adhesive contacts and migration of DC towards the lymph node-homing chemokines CCL19 and CCL21 *in vitro*. Using adoptive transfer experiments, we showed that CyaA has the ability to interfere also with the induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses by TLR-stimulated DC. Upon CyaA treatment, the LPS-activated DC exhibited a decreased capacity to present a protein antigen to CD4⁺ T cells, while an increased capacity to

promote CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells *in vitro* was observed. Furthermore, CyaA also decreased the capacity of LPS-stimulated DC to induce CD8⁺T cell proliferation. This was accompanied by decreased induction of IFN- γ , while increased IL-17 and IL-10 production by CD8⁺ T cells was observed.

As the key function of DC is to induce the adaptive immune response, the results of our study support the hypothesis that the CyaA toxin prevents the onset of the effective adaptive immune response during *B. pertussis* infection possibly by promoting migration of incompletely matured DC into draining lymph nodes. Such manipulated DC are then unable to stimulate adequate T cell responses not only by inhibition of their induction, but also by shaping the resulting T cell profile towards more tolerogenic type and thereby delay the clearance of bacteria and prolong the persistence of *B. pertussis* infection.

Publication 5

We constructed a unique *B. pertussis* mutant that produces a cell-invasive but non-hemolytic variant of the CyaA toxin (AC⁺Hly⁻). We showed that the pore-forming activity of the secreted CyaA is not required for the capacity of *B. pertussis* to colonize mouse lungs. However, it significantly contributes to the virulence and lethality of *B. pertussis* infection in the mouse respiratory challenge model.

Such AC⁺Hly⁻ bacteria still skewed the TLR-triggered maturation of co-incubated mouse dendritic cells towards a tolerogenic phenotype and inhibited their antigen-presenting capacities *in vitro*. This CyaA capacity was shown to be dependent solely on the cAMP signaling of CyaA. However, the cell-permeabilizing and cell-invasive AC enzyme activities of CyaA synergized in provoking neutrophil recruitment and inflammatory damage of infected lung tissue. Moreover, the pore-forming activity synergized with the cAMP-elevating activity in downregulation of MHC II molecule expression levels on myeloid cells that infiltrated the infected tissue, which indicates that also the pore-forming activity of CyaA contributes to immune subversion of host defenses. Such subversion of intraepithelial DC function would then be plausibly expected to hamper also adaptive responses of B lymphocytes. Delaying and restricting efficacy of the antibody response and limiting development of the of B and T cell immune memory to *B. pertussis* antigens, may thus represent another immunosubversive activity of CyaA.

Review

Publication 6

Bacterial toxins are important virulence factors endowed by specific activities which enable them to manipulate the host immune responses. As useful molecular biology tools, they helped to discover various cellular mechanisms. Moreover, due to their abilities to enter host cells, bacterial toxins or their less toxic mutant variants have been explored for possibility to be used in the field of medicine: to deliver antigens and stimulate the adaptive T cell immune response, to stimulate the immunity as adjuvants, or to eliminate cancer cells. Bacterial toxins usually enter host cells via receptor-mediated endocytosis, except from *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, which translocates its adenylate cyclase domain directly across the cellular membrane. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, *Bacillus anthracis* lethal and edema toxins, *Shigella dysenteriae* shiga toxin and *Escherichia coli* shiga-like toxin are good examples of toxins which were reported to have the capacity to transport antigens into host dendritic cells for stimulation of specific T cell responses. *B. pertussis* pertussis toxin, *Vibrio cholera* cholera toxin, *E. coli* heat-labile enterotoxin, or the Cry1A protein of *Bacillus thuringiensis* have the potential to act as adjuvants and stimulate mucosal as well as systemic immune responses. *Corynebacterium diphtheriae* diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-based immunotoxins appear to be very promising tools in cancer immunotherapy, moreover, the DT immunotoxin (DAB(389)IL-2) is already used for treatment of cutaneous T cell lymphoma. Furthermore, currently there are several clinical trials to evaluate the safety and the effectiveness of bacterial toxins derived vaccines, such as *Bordetella adenylate* cyclase toxoid used as a vaccine delivery tool for immunotherapy of cervical tumors and metastatic melanoma.

Conclusions

Mechanism of CyaA-AC⁻ adjuvanticity (Publication 1)

- We show that non-enzymatic but pore-forming CyaA-AC⁻ toxoid at low concentration of 300 ng/ml induces the maturation of CD11b-expressing dendritic cells by a TLR- and inflammasome-unrelated mechanism. This depends on the cell-permeabilizing capacity of CyaA-AC⁻ and involves the activation of the JNK and p38 protein kinases.
- Upon toxoid treatment, bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) increased the expression of co-stimulatory molecules, production of IL-6, KC, LIX, GCSF, and PGE2 and exhibited increased chemotactic migration
- Moreover, we show that CyaA-AC⁻-mediated K⁺ efflux induces the maturation of splenic DC and their capacity to expand antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vivo*
- It is therefore plausible to propose that it is the capacity of the CyaA-AC⁻ toxoid to trigger the maturation and migration of DC that accounts for its adjuvant capacity *in vivo*.

CyaA modulates TLR-induced maturation and T cell stimulatory capacity of DC (Publication 2)

- We examined the ability of close-to-physiological concentration of the CyaA toxin to modulate LPS-induced maturation and T cell stimulatory capacity of mice and human DC through activation of cAMP signaling pathway
- CyaA supports LPS-induced cell detachment and migration towards the lymph node homing chemokines CCL19 and CCL20
- We showed that CyaA decreased the capacity of TLR-activated DC to present soluble antigens to CD4⁺ T cells and increased their capacity to promote expansion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells *in vitro*
- Moreover, CyaA also decreased the capacity of LPS-stimulated DC to induce CD8⁺ T cell proliferation. In addition, it resulted in the reduced induction of IFN- γ production while it enhanced the induction of IL-17 and IL-10 production by CD8⁺ T cells.

Protection against influenza A induced by CyaA-AC-HA2 (Publication 3)

- The prepared CyaA-AC-HA2 toxoid induces HA2 specific T and B cell responses in BALB/c mice. The presence of specific antibodies was detected by ELISA in the sera of immunized mice. The isotype composition of the specific antibodies suggested an induction of mixed Th1 and Th2 polarized immune response.
- We further show that HA2-specific antibodies induced by CyaA- AC-HA2 were cross-reactive with influenza A viruses of the H3, H4 and H7 subtypes. In addition, they were shown to reduce the virus replication.
- CyaA- AC-HA2 immunization accelerated virus elimination from mice infected with homologous H3 and heterologous H7 influenza viruses and protected them against a lethal dose of these viruses.

Delivery of truncated AC domain across the cytoplasmic membrane of APCs (Publication 4)

- Deletion mapping results showed that the first 371 amino acids of the AC domain are dispensable for the capacity of CyaA to translocate its N-terminal portion across the cytoplasmic membrane of dendritic cells. This was determined by delivery of an OVA epitope into DC for *in vitro* stimulation of OVA-specific CD8⁺ T cells.
- Toxoids in which the first 371 residues of the AC domain were replaced by long heterologous polyepitope were still capable to induce effective antigen-specific CD8⁺ CTL responses *in vivo* in mice and *ex vivo* in human peripheral blood mononuclear cell cultures.
- The results suggest that the AC domain participates in the membrane penetration only as a passive passenger. Importantly, its ability to deliver large heterologous polypeptides across the cytoplasmic membrane of antigen presenting cells paves the way for the construction of a new generation of CyaA-based vaccines.

The role of the pore-forming activity of CyaA in Bordetella infection (Publication 5)

- Hemolytic (pore-forming) activity of CyaA is not required for immunomodulatory shaping of dendritic cell phenotype by *B. pertussis*

- Hemolytic activity of CyaA is not required for mouse lung colonization by *B. pertussis*, however, it contributes to exacerbation of inflammatory damage of mouse lungs in the course of infection
- Moreover, the pore-forming activity of CyaA accounts for recruitment of myeloid cells into infected lungs
- The pore-forming activity synergized with the cAMP-elevating activity in downregulation of MHC II molecule expression levels on infiltrated myeloid cells

Curriculum Vitae

Mgr. Martina Švédová (born Kosová)

Born: 8th July 1984, Plzeň

Email: svedova.martina@gmail.com

Education

2008-now

Doctoral studies in Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Dissertation thesis: Mechanism of action of adenylate cyclase toxin on immune function of dendritic cells under supervision of prof. Ing. Peter Šebo, CSc. at the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences

2006-2008

Master's degree in Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Diploma thesis: Preparation of hen antibodies against selected antigens of Pseudomonas aeruginosa under supervision of prof. RNDr. Petr Hodek, CSc. at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

2003-2006

Bachelor's degree in Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Bachelor thesis: Selection of antigens for passive immunization against virulence factors of Pseudomonas aeruginosa under supervision of prof. RNDr. Petr Hodek, CSc. at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague

Language

English (FCE exam: First Certificate in English)

Conferences

The 2nd Prato Conference on Pore Forming Proteins 2012, Italy

M. Kosova, I. Adkins, R. Fiser, O. Cerny, J. Masin, L. Sadilkova and P. Sebo: Pore-forming activity of adenylate cyclase toxoid triggers dendritic cell maturation (poster presentation)

XII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2012, Počátky u Pelhřimova)

M. Kosová, I. Adkins, R. Fišer, O. Černý, J. Mašín, L. Sadílková, P. Šebo: Adjuvant activity of adenylatcyclase toxoid: Mechanism of dendritic cells activation (talk)

ETOX 16 European Workshop on Bacterial Protein Toxins (2013), Freiburg, Germany

M. Kosova, I. Adkins, R. Fiser, O. Cerny, J. Tomala, J. Masin, L. Sadilkova and P. Sebo: Pore-forming activity of adenylate cyclase toxoid triggers dendritic cell maturation (poster presentation)

XIII. Interdisciplinary Meeting of Young Biologists, Biochemists and Chemists (2013, Žďár nad Sázavou)

M. Kosová, I. Adkins, R. Fišer, J. Tomala, O. Černý, J. Mašín, L. Sadílková, P. Šebo: Adjuvant activity of adenylatcyclase toxoid: Mechanism of dendritic cells activation (poster presentation)

Univerzita Karlova v Praze

**Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Mgr. Martina Švédová (Kosová)

***Mechanismus působení adenylátcyklázového toxinu
na imunitní funkce dendritických buněk***

Školitel: prof. Ing. Peter Šebo, CSc.

Mikrobiologický ústav AV ČR

Praha, 2017

Abstrakt

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) je klíčovým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertusis*, která je původcem černého kašle. CyaA se váže na fagocyty, které exprimují na svém povrchu komplementový receptor 3 a poté katalyzuje rychlou přeměnu ATP na cAMP, které rozvrací buněčnou signalizaci. Zároveň CyaA tvoří uvnitř buněčné membrány kation-selektivní póry, které zapříčiňují únik draslíku z buněčného cytosolu. Enzymaticky neaktivní forma CyaA toxinu, adenylátcyklázový toxoid (CyaA-AC⁻), se používá jako nástroj pro dopravu antigenů již 20 let.

Tato práce se zaměřila především na studium mechanismu působení CyaA toxoidu a toxinu. Zkoumali jsme adjuvantní účinky CyaA toxoidu, jeho kapacitu nořit se do buněčné membrány a možnost jeho využití pro dopravu epitopů z chřipkového viru. Ukázali jsme, že pórotvorná aktivita toxoidu a následná aktivace MAP kináz JNK a p38 jsou klíčové pro adjuvantní účinek toxoidu CyaA-AC⁻ a způsobují maturaci dendritických buněk (DC - z angl. dendritic cells), nezávislou na signalizaci TLR (z angl. Toll-like receptor) drah a inflamazómu. K stimulaci dendritických buněk dochází dokonce i *in vivo* a toxoidem aktivované DC jsou pak schopné navodit CD8⁺ a CD4⁺ T buněčné odpovědi *in vitro* a *in vivo*. Dále jsme ukázali, že prvních 371 aminokyselin je postradatelných pro schopnost CyaA dopravovat vložené epitopy do buněčného cytosolu, a že tudíž role AC domény při procesu penetrace toxinu do buňky je spíše pasivní. Konstrukt CyaA toxoidu s vloženým antigenem HA2 podjednotky hemaglutininu chřipkového viru A navodil látkovou i buněčnou imunitní odpověď v myších bez použití dalšího adjuvans a ochránil je proti infekci homologním i heterologním chřipkovým virem.

Také jsme zkoumali roli CyaA toxinu při infekci. CyaA manipuluje lidské a myší DC stimulované TLR tak, že dochází ke zvýšenému zániku buněčných adhezivních kontaktů, následnému zvýšení chemotaktické migrace a snížení schopnosti dendritických buněk předkládat bílkovinné antigeny a navodit tak proliferaci antigen-specifických CD4⁺ a CD8⁺ T buněk. Ukázali jsme, že CyaA manipulace myších DC *in vitro* je závislá výhradně na cAMP signalizaci, nikoli na pórotvorné aktivitě CyaA. Na myším modelu jsme dále prokázali, že pórotvorná aktivita CyaA není nutná pro bakteriální kolonizaci, avšak zvyšuje infiltraci neutrofilů a významně přispívá k plicní patologii během pertusové infekce.

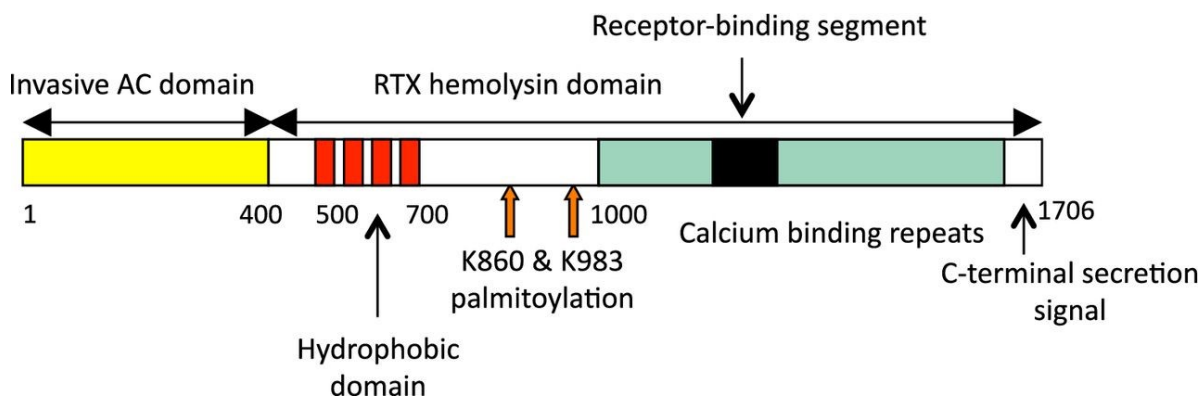
Úvod

Adenylátcyklázový toxin - CyaA

Adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT) je klíčovým faktorem virulence původce černého kašle, bakterie *Bordetella pertussis*. V myším modelu bylo zjištěno, že CyaA je kritický pro zahájení kolonizace plic bakteriemi (Goodwin & Weiss, 1990. Khelef et al, 1992, Harvill et al, 1999). CyaA se skládá z 1706 aminokyselin a patří do tzv. RTX (z angl. Repeat in ToXin) rodiny bakteriálních toxinů tvořících póry (Linhartova et al., 2010). Jedná se o bi-funkční toxin, který je vybaven dvěma nezávislými aktivitami: enzymatická adenylátcyklázová doména (AC) je tvořena prvními 400 aminokyselinami, zatímco pórotvorná RTX (cytolysinová) část obsahuje zbývajících 1306 aminokyselin (Obr. 1).

CyaA se primárně váže na myeloidní fagocyty exprimující $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18, CR3 nebo Mac-1) (Guermonprez et al., 2001) a poté přemísťuje do jejich cytosolu svoji enzymatickou AC doménu. Uvnitř buňky se AC doména váže na endogenní kalmodulin a katalyzuje neregulovanou přeměnu buněčného ATP na cAMP, který hraje v buněčné signalizaci úlohu tzv. „druhého posla“ (Wolff et al, 1980. Confer & Eaton 1982, Ladant & Ullmann, 1999). Prostřednictvím zvýšení buněčné koncentrace cAMP toxin narušuje buněčné signální dráhy a významně ovlivňuje imunitní odpověď hostitele ve prospěch bakterií (Vojtova et al, 2006, Carbonetti, 2010).

Souběžně s tím pórotvorný CyaA konformer vytváří kation-selektivní póry do hostitelské buněčné membrány, a způsobuje tak únik draselných iontů z buňky (Basler et al, 2006; Osickova et al, 2010), což významně zasahuje do iontové homeostázy hostitele. Kromě toho bylo prokázáno, že únik draslíku přispívá k aktivaci NALP3 inflamazomového komplexu, který po předchozí stimulaci pomocí LPS spouští v dendritických buňkách produkci IL-1 β (Dunne et al, 2010, Osickova et al, 2010).



Obr. 1: Strukturální organizace molekuly CyaA. CyaA (1706 AK) se skládá z N-koncové enzymatické adenylátcyklázové (AC) domény (~ 400 AK) a C-koncové pórtvorné RTX hemolysinové domény (~ 1300 AK). RTX hemolytická doména obsahuje několik specifických míst: hydrofobní pórtvornou doménu, místa posttranslační modifikace (palmitoylace), vazebné místo pro integrin, místa RTX (z angl. Repeat in ToXin) domény pro vazbu vápníku a C-koncový sekreční signál (Masin et al., 2015).

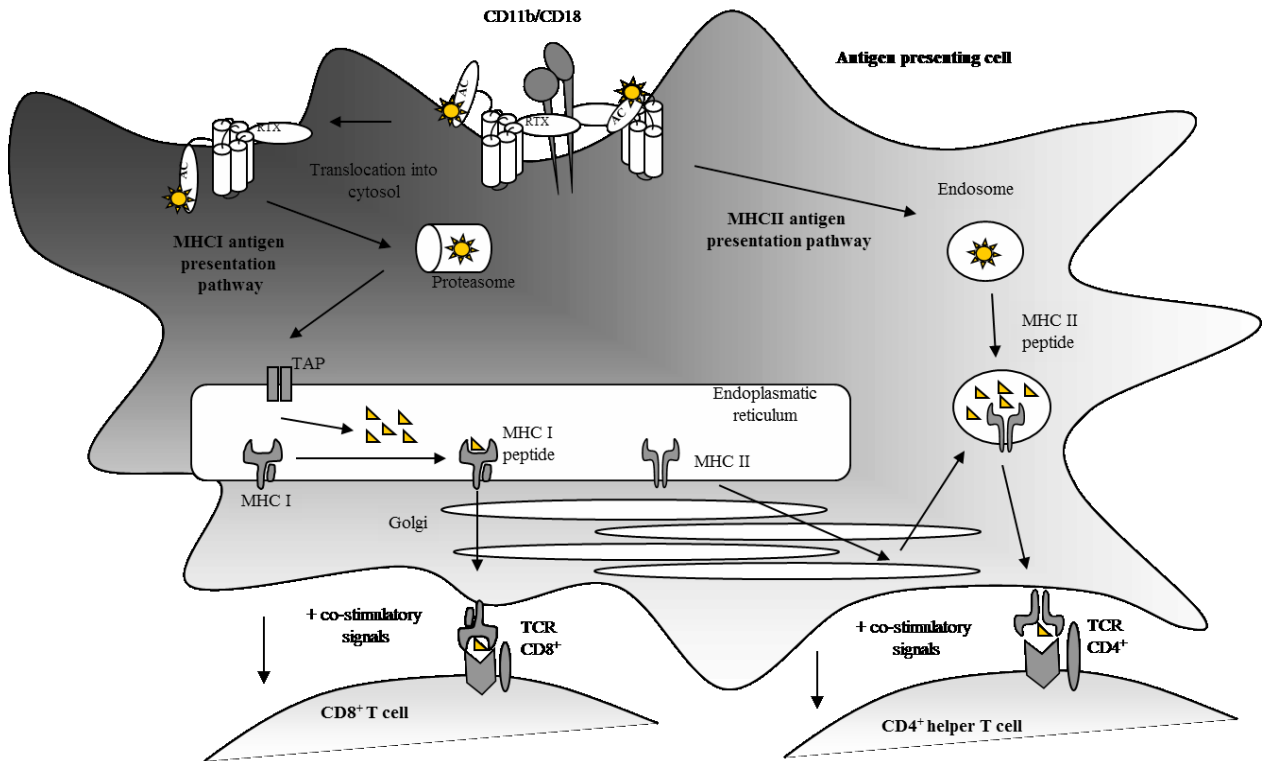
Adenylátcyklázový toxoid – CyaA-AC⁻

CyaA-AC⁻ je rekombinantní toxoid zbavený enzymatické adenylátcyklázové aktivity toxinu díky vložení dipeptidu GlySer do vazebného místa pro ATP uvnitř AC domény (Osicka et al., 2000; Fayolle et al., 2001). Schopnost CyaA efektivně penetrovat profesionální antigen prezentující buňky nesoucí receptor CD11b/CD18 a dopravovat heterologní antigeny pro obě třídy MHC I a II prezentační dráhy (Obr. 2) umožňuje využití CyaA-AC⁻ toxoidu jako nástroje pro dopravu antigenů pro indukci specifické imunitní odpovědi proti různým CD8⁺ a CD4⁺ T-buněčným epitopům už více jak 20 let (Sebo et al., 1995; Osicka et al., 2000; Loucka et al., 2002; Simsova et al., 2004; Adkins et al., 2012). Četné CyaA konstrukty nesoucí heterologní antigeny prokázaly schopnost stimulovat imunitu, zejména proti virům jako je například virus lymfatické choriomeningitidy (LCMV) (Sebo et al, 1995, Fayolle et al, 1996, Saron et al, 1997; Dadaglio et al, 2000; Fayolle et al, 2001), nebo virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) (Fayolle et al, 1996; Mascarell et al, 2005; Fayolle et al, 2001), cytomegalovirus (CMV) (Jelínek et al., 2011) a virus chřipky a (Stanekova et al., 2013). Co je ale velmi důležité, že CyaA-AC⁻ je schopné vyvolat ochranné a terapeutické imunitní odpovědi proti nádorům indukovaným HPV-16(18) (Preville et al, 2005; Mackova et al, 2006) a melanomům u myší (Dadaglio et al., 2003). Fáze I klinické studie, která testovala schopnost CyaA doručit onkoantigen E7 z

HPV 16 a 18 pro imunoterapii rakoviny děložního čípku prokázala jeho bezpečnost, imunogenicitu a klinickou účinnost (Van Damme et al., 2016). Nicméně v druhé fázi klinické studie se nepodařilo potvrdit klinickou účinnost této vakcíny (www.gentice.com). To bude nutné znovu opakovat s vylepšenou variantou vakcíny. Kromě toho probíhá další fáze I/II klinické studie, kde CyaA dodává tyrozinázový epitop dendritickým buňkám pacientů s pokročilým metastatickým melanomem (www.centerwach.com).

CyaA je také účinný imunoprotektivní antigen. Imunogenní vlastnosti CyaA byly prvně detekovány jako přítomnost vysokého titru protilátek proti CyaA u pacientů prodávajících pertusovou infekci nebo u očkovaných malých dětí a dospělých (Farfel et al., 1990; Arciniega et al., 1991).

Kromě schopnosti dopravovat antigeny do profesionálních antigen prezentujících buněk, účinnost CyaA-AC⁻ (nebo předtím používaného CyaA) pro indukci antigenně specifických T-buněčných odpovědí se zdá být závislá na adjuvantním účinku toxoidu/toxinu. CyaA-AC⁻ toxoid postrádá adenylátcyklázovou aktivitu, ale funguje jako adjuvans a dokonce dosahuje lepšího účinku než enzymaticky aktivní toxin (MacDonald-Fyall et al., 2004; Orr et al., 2007; Cheung et al., 2006).



Obr. 2: CyaA jako nástroj pro dopravu antigenů. Mnoho heterologních T-buněčných antigenů může být vloženo do enzymaticky inaktivované AC domény CyaA toxinu. Purifikovaný CyaA toxoid nesoucí cizorodé antigeny se pak váže na CD11b/CD18 na povrchu buněk prezentujících antigen, především dendritických buněk. Toxoid proniká do buněčné membrány ve dvou odlišných konformacích: AC doména se prochází přes cytoplazmatickou membránu do buněčného cytosolu nebo molekuly vytváří oligomerní membránový kanál, který permeabilizuje buňku, přičemž AC doména zůstává vně od buněčné membrány. Přenesená AC doména nesoucí vložené antigeny je pak uvnitř cytosolu zpracovaná pomocí proteasomu a vzniklé peptidové epitopy jsou následně transportovány TAP1 do endoplazmatického retikula, kde se vážou na nově syntetizované glykoproteinové molekuly MHC I. Tyto MHC I komplexy jsou dále transportovány na buněčný povrch a prezentovány CD8⁺ T lymfocytům. Paralelně, po endocytóze zprostředkované receptorem CD11b/CD18, molekuly asociované s membránou s vloženými antigeny jsou zpracovány do podoby antigenních peptidů v endozomech a vážou se pak na molekuly MHC II. Tyto MHC II komplexy jsou následně exponovány na buněčném povrchu a prezentovány CD4⁺ T buňkám (Sebo et al., 2014).

Cíle

Navzdory mnoha studiím o CyaA toxinu a toxoidu, mechanismy jejich působení jsou stále nedostatečně chápány. Proto jsme se chtěli v naší práci zaměřit na několik témat, především na adjuvantní účinek toxoidu a jeho schopnost dopravovat antigeny a indukovat specifické imunitní odpovědi proti vybraným vloženým epitopům. Kromě toho jsme také chtěli prozkoumat roli CyaA toxinu (a jeho adenylátcyklázové a pórtvorné aktivity) za podmínek simulujících infekci.

Z toho důvodu jsme si definovali tyto cíle pro naši experimentální práci:

- Identifikovat mechanismus účinku adenylátcyklázového toxoidu, který je zodpovědný za jeho adjuvantní působení. Charakterizovat maturaci, migraci a T buněčnou stimulační kapacitu DC po indukci toxoidem CyaA-AC⁻.
- Charakterizovat kapacitu dopravovat antigeny u mutant adenylátcyklázového toxinu se zkrácenou AC doménou, za účelem zjištění, které části AC domény jsou nezbytné pro její translokaci přes buněčnou plazmatickou membránu.
- Připravit a purifikovat rekombinantní adenylátcyklázové toxoidy nesoucí CD8⁺ a CD4⁺ T buněčné epitopy z HA2 podjednotky hemaglutininu chřipkového viru. Tyto toxoidy budou dále testovány v myším modelu, zda jsou schopné vyvolat účinnou ochranu proti různým variantám chřipkového viru A.
- Zjistit jak aktivní adenylátcyklázový toxin moduluje funkce dendritických buněk stimulovaných LPS.
- Zjistit, zda pórtvorná aktivita adenylátcyklázového toxinu přispívá k virulenci *Bordetella pertussis* během infekce (letalitě a patogenezi).

Výsledky a diskuse

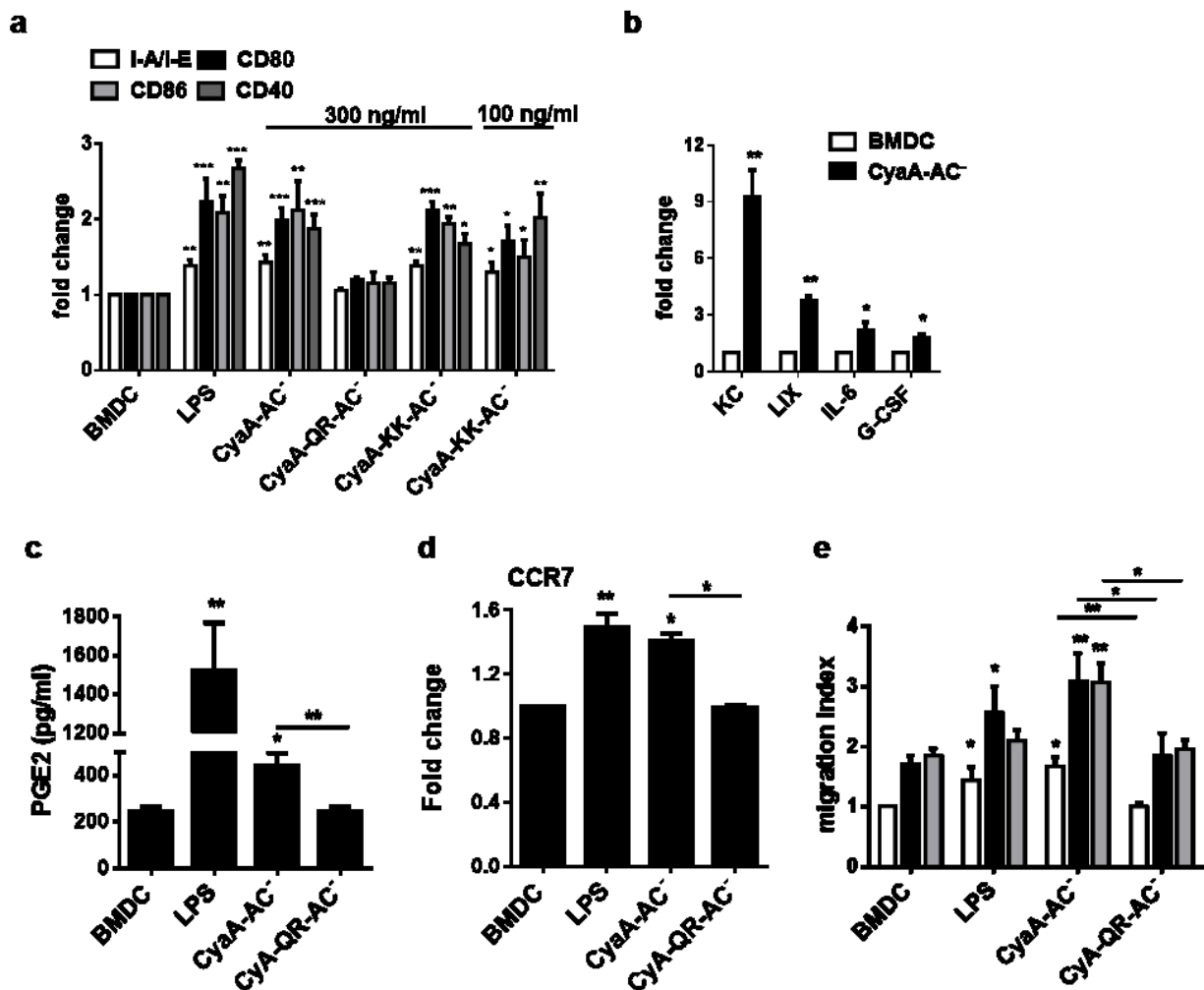
CyaA jako nástroj pro dopravu antigenů a účinné adjuvans

(Publikace 1, 4, 3)

Publikace 1

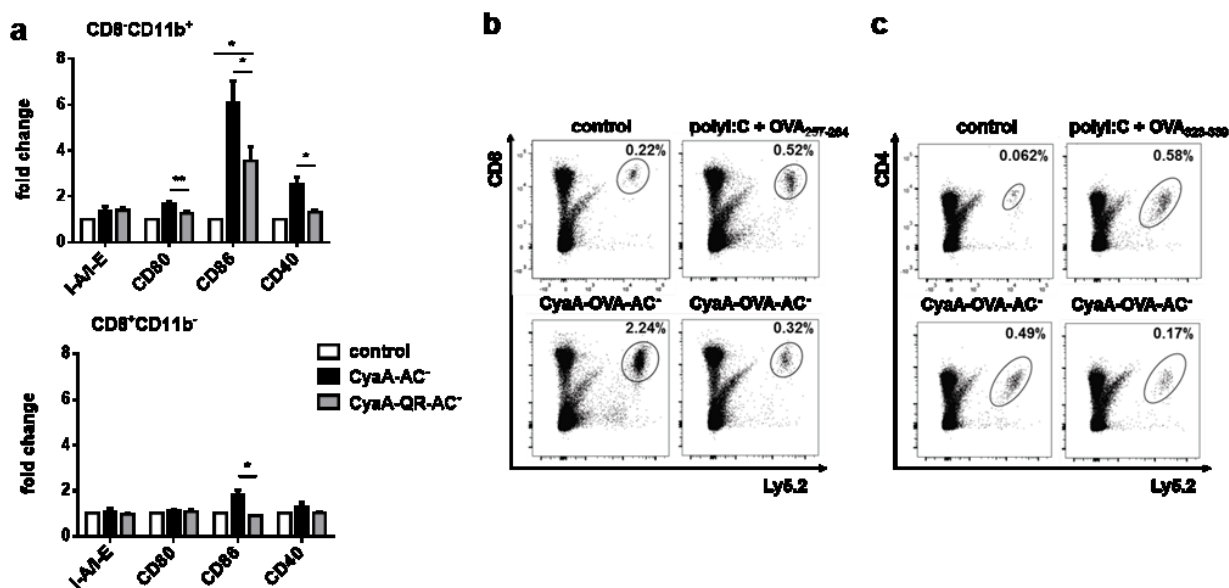
V naší práci jsme charakterizovali adjuvantní aktivitu adenylátcyklázového toxoidu (CyaA-AC⁻). Ukázali jsme, že nízká koncentrace (300 ng/ml) téměř LPS prostého (méně než 120 EU/mg) CyaA toxoidu vyvolává maturaci CD11b-exprimujících DC (Obr. 3). Použitím BMDC z různých knock-outovaných myší jsme vyloučili závislost tohoto maturačního procesu na několika důležitých TLR nebo inflamazomových signalizačních drahách. Výsledky umožňují předpokládat, že proces zrání DC ošetřených CyaA-AC⁻ je poháněn únikem draslíku způsobeným pórtvornou aktivitou toxoidu a je regulován pomocí JNK a p38 MAPK (Obr. 5). Kromě toho, DC aktivované toxoidem CyaA-AC⁻ jsou schopny stimulovat odpovědi T lymfocytů a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Obr. 4).

Tyto studie prokázaly, že v souladu s výše popsanou schopností působit jako dobrý nástroj pro podání antigenu, CyaA-AC⁻ toxoid indukuje zrání dendritických buněk, které je nezbytné pro efektivní antigen specifickou stimulaci naivních T buněk (Fayolle et al., 1996; Adkins et al., 2012). Důležité je, že toxoid indukuje výrazně Th1 polarizované imunitní odpovědi (Dadaglio et al., 2003; Ross et al., 2004; Mascarell et al., 2005), což může být relevantní pro použití toxoidu jako nového antigenu a adjuvans v příští generaci nebuněčných pertusových vakcín. Posunutí převážně Th2 polarizované imunitní odpovědi na v současné době používanou vakcínu proti dávivému kašli (Ausiello et al., 1997; Ryan et al., 1998) směrem k indukci spíše Th1/Th17-polarizovaných odpovědí se zdá být velmi žádoucí, protože tato odpověď navozuje déle trvající a účinnější ochrannou imunitu proti infekci *B. pertussis* (Ross et al., 2004, Mills et al., 2014). Za zmínku stojí, že geneticky plně detoxifikovaný CyaA-AC-Hly⁻ (CyaA-QR-AC⁻) toxoid (Osickova et al., 2010), chráněný patentovým portfoliem, čeká na testování v pozici nové složky nebuněčné pertusové vakcíny v modelu imunizace odstavených paviánů a v infekčních studiích *B. pertussis* (Sebo et al., 2014).

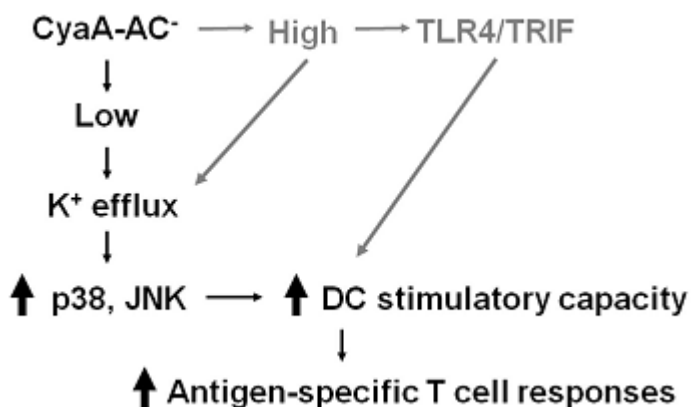


Obr. 3: Pórotvorná aktivita odpovědná za únik K^+ určuje schopnost CyaA-AC⁻ toxoidů spustit fenotypovou maturaci a migraci BMDC. a) BMDC (1×10^6 /ml) byly ponechány bez inkubace, nebo byly inkubovány s LPS (100 ng/ml) nebo s CyaA-AC⁻ nebo s mutantou toxoidu s omezenou pórotvornou aktivitou CyaA-QR-AC⁻ nebo s toxidem se zvýšenou pórotvornou aktivitou CyaA-KK-AC⁻ při uvedených koncentracích po dobu 24 h. Expresce I-A/I-E, CD80, CD86 a CD40 byla detekována v CD11c⁺Hoechst buňkách pomocí průtokové cytometrie. Grafy představují násobnou změnu exprese markeru oproti kontrolním BMDC. b) BMDC (1×10^6 /ml) byly ponechány bez ošetření nebo inkubovány s CyaA-AC⁻ (300 ng/ml) po dobu 24 h. Zánětlivé cytokiny a chemokiny byly hodnoceny z buněčné kultury supernatantu za použití cytokinového kitu s detekcí chemiluminiscence. Graf představuje násobnou změnu chemiluminiscenčních signálů pro každý cytokin oproti kontrolním BMDC. BMDC (1×10^6 /ml) byly inkubovány s LPS (100 ng/ml) nebo CyaA-AC⁻ nebo CyaA-QR-AC⁻ mutantou (300 ng/ml) po dobu 24 h (c, d a f). c) produkce PGE2 v supernatantech BMDC kultury byla stanovena pomocí enzymatického imunitního testu po 24 h. d) Expresce CCR7 byla detekována průtokovou cytometrií v CD11c⁺Hoechst buňkách po 24 h. e) Po 24 h byly toxoidy ošetřené buňky promyty a ponechány migrovat po dobu 4 h přes Transwell

membránu směrem k samotnému médiu nebo k chemokinům CCL19 nebo CCL21 (200 ng/ml). Buňky, které migrovaly (Hoechst⁺) byly počítány pomocí průtokové cytometrie. Počet kontrolních buněk BMDC, které migrovaly, byl stanoven jako 1 (migrační index). Všechny hodnoty představují průměr ± směrodatná odchylka z alespoň n=3 (*P<0.05, **P<0.005 a ***P<0.001).



Obr. 4: Pórotvorná kapacita CyaA-AC⁻ toxoidu indukuje zránění DC ze sleziny a expanzi antigen specifických CD8⁺ T buněk *in vivo*. a) Myši dostaly i.v. PBS s 1M močoviny (kontrola) nebo 25 ug CyaA-AC⁻ nebo CyaA-QR-AC⁻ toxoidu. Po 24 h byly myši zabity, jejich splenocyty izolovány a exprese maturačních markerů u slezinných DC byla stanovena průtokovou cytometrií v CD8⁺CD11b⁺ a CD8⁺CD11b⁻ subpopulacích CD3⁺CD11c⁺Hoechst⁺ buněk. a) Grafy představují průměr ± směrodatná odchylka z n=3, vyjádřeno jako změna markeru oproti kontrolním CD8⁺CD11b⁺ a CD8⁺CD11b⁻ (* p <0,05, ** P <0,005). (b a c) Expanze adoptivně přenesených OVA-specifických CD8⁺ (b) a CD4⁺ (c) T buněk po i.v. podání toxoidů byla stanovena po 4 dnech pomocí průtokové cytometrie jako procento CD8⁺Ly5.2⁺ nebo CD4⁺Ly5.2⁺ T buněk, v daném pořadí, s použitím 2 x 10⁶ počítaných slezinných buněk. Dot ploty jsou reprezentativní pro n=2, 3 myši na skupinu. (Odpovídající grafy jsou v publikaci).



Obr. 5: Navrhovaný mechanismus adjuvantního působení CyaA-AC⁻. Model toxoidem způsobeného zvýšení T stimulační schopnosti dendritických buněk, které závisí při nízkých koncentracích toxoidu na jeho pórotvorné aktivitě způsobující únik K⁺ a při vyšších koncentracích také na jeho schopnosti aktivovat signalizaci TLR4/TRIF (Dadaglio et al., 2014). Šedě je hypotéza netestovaná v této práci.

Publikace 4

Naše studie objasnila, jakým způsobem AC doména přispívá k procesu svého přemístění přes cytoplazmatickou membránu. Za použití sady 18 mutantů CyaA s různě dlouhou (částečně zkrácenou) AC doménou jsme analyzovali kapacitu všech těchto delečních mutantů CyaA dodávat ovalbuminový antigen do MHC I prezentační dráhy. V důsledku toho jsme ukázali, že až 371 aminokyselin v AC doméně není nutných k tomu, aby se přenesla do buněčného cytosolu. To bylo stanoveno na základě schopnosti CyaA mutant dopravit T buněčný ovalbuminový epitop pro MHC I prezentaci v DC a následnou úspěšnou stimulací specifické CD8⁺ T-buněčné odpovědi. Je možné tedy předpokládat, že AC doména hraje poměrně pasivní roli v procesu pronikání membránou a neobsahuje žádné podstatné sekvence potřebné pro proniknutí do buněk. Kromě toho Hly zbytek byl schopen dopravovat dva velké umělé polypeptidy (146 a 203 aminokyselinových zbytků) do buněčného cytosolu a stimulovat specifické myší a lidské CTL odpovědi.

Adjuvantní kapacita CyaA toxoidu spolu s možností vyměnit celou část AC domény za větší polyepitopové antigeny za účelem jejich dopravy do dendritických buněk se zdají být velmi užitečné vlastnosti CyaA toxoidu, které vybízejí ke konstrukci nové generace vakcín odvozených od CyaA.

Publikace 3

Jako aplikace výše diskutovaných výsledků jsme testovali CyaA-AC⁻ toxoidy jako nástroj pro dopravu vakcíny proti chřipce. HA2 antigen (AK zbytky 23 až 185), který jsme vybrali pro naši studii, byl odvozen od H3 podtypu a obsahoval několik konzervovaných T a B buněčných epitopů viru chřipky typu A (Saikh et al, 1995, Jackson et al, 1994).

Vakcinace CyaA-AC⁻-HA2 způsobila dřívější odstranění chřipkového viru z myších plic a ochránila myši proti letální infekci homologním lidským chřipkovým virem A/Miss H3N2 a především také proti infekci heterologním vysoce patogenním virem ptačí chřipky A/Chick H7N1. Zajímavé je, že naše zpráva byla první, která ukázala heterosubtypickou ochranu proti chřipkové infekci A zprostředkovanou vakcínou s HA2, která dokáže stimulovat obě složky ochranné imunity bez potřeby adjuvans. To bylo dříve možné pouze po očkování živou vakcínou oslabeného chřipkového viru, která není bezpečná pro každého (Stropkovská et al., 2010). Chřipkové vakcíny by měly být navrženy tak, aby vyvolaly protilátkové i T buněčné odpovědi, protože bylo prokázáno, že také T buněčná imunita hraje důležitou roli v eradikaci viru a přispívá k mírnějšímu průběhu infekce (Wang & Palese, 2009). To otvírá možnost navrhovat nové vakcíny na CyaA bázi, které by byly účinné proti širšímu spektru chřipkových virů A. To by mohlo být dosaženo kombinací vybraných konzervovaných HA2 peptidů z každé skupiny podtypu. Takové vakcíny s rozšířenou protektivní účinností by mohly být důležitou prevencí proti možné celosvětové chřipkové pandemii.

CyaA a jeho role v infekci *Bordetella pertussis*

(Publikace 2 a 5)

Publikace 2

Zjistili jsme, že cAMP signalizace CyaA zvýšila TLR-indukované rozvolnění buněčných adhezivní kontaktů a migraci DC vůči chemokinům CCL19 a CCL21 navádějícím do lymfatických uzlin při pokusech *in vitro*. Při experimentu adoptivního přenosu jsme ukázali, že CyaA má schopnost interferovat také s indukcí CD4⁺ a CD8⁺ T-buněčné imunitní odpovědi dendritickými buňkami stimulovanými TLR. Po působení CyaA, DC aktivované LPS vykazovaly sníženou schopnost prezentovat proteinový

antigen CD4⁺ T buňkám, zatímco měly zvýšenou kapacitu podporovat vznik regulačních T buněk typu CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ při pokusu *in vitro*. Kromě toho, CyaA také snížil schopnost LPS-stimulovaných DC indukovat proliferaci CD8⁺ T buněk. To bylo doprovázeno sníženou indukcí IFN- γ , zatímco produkce IL-17 a IL-10 CD8⁺ T buňkami byla zvýšena.

Jelikož klíčová funkce DC je zahájit adaptivní imunitní odpověď, výsledky naší studie podporují hypotézu, že CyaA toxin zabraňuje vzniku efektivní adaptivní imunitní odpovědi při infekci *B. pertussis*, pravděpodobně tím, že podporuje migraci neúplně zralých DC do přilehlých lymfatických uzlin. Takto manipulované DC nejsou pak schopny adekvátně stimulovat T buňky, a to nejen celkovou inhibicí jejich indukce, ale také ovlivněním výsledného profilu T buněk směrem k více tolerogenním typům, a tím oddálit eradikaci bakterií a prodloužit trvání infekce *B. pertussis*.

Publikace 5

Připravili jsme unikátní mutantu *B. pertussis*, která produkuje buněčně-invazivní, ale nehemolytickou variantu CyaA toxinu (AC⁺Hly⁻). Ukázali jsme, že pórtvorná aktivita sekretovaného CyaA není nutná pro schopnost *B. pertussis* kolonizovat plíce myši. Avšak významně přispívá k virulenci a letalitě pertusové infekce v myším modelu.

Takové AC⁺Hly⁻ bakterie byly stále schopny zabránit maturaci myších dendritických buněk vyvolané TLR stimulací. Maturace dendritických buněk se vychýlila směrem k tolerogennímu fenotypu a zároveň byla inhibována jejich kapacita prezentovat antigeny *in vitro*. Bylo prokázáno, že tato schopnost CyaA je závislá pouze na cAMP signalizaci CyaA. Nicméně, obě aktivity CyaA toxinu společně vyvolávají infiltraci neutrofilů a zánětlivé poškození infikované plicní tkáně. Kromě toho, pórtvorná a enzymatická aktivita vedoucí k zvýšení koncentrace cAMP jsou také společně odpovědné za snížení hladiny exprese MHC II na povrchu myeloidních buněk, které se dostaly do infikované tkáně, což znamená, že také pórtvorná aktivita CyaA přispívá k negativnímu ovlivnění imunitní obrany hostitele. Taková manipulace funkce intraepiteliálních DC by pak byla pravděpodobně schopna zabránit také adaptivní imunitní odpovědi B lymfocytů. Oddálení a omezení účinnosti protilátkové odpovědi a omezení rozvoje B a T buněčné imunitní

paměti reagující na *B. pertusové* antigeny tak může představovat další způsob jak CyaA podvrací imunitní odpověď.

Review

Publikace 6

Bakteriální toxiny jsou důležitými faktory virulence obdařené konkrétními schopnostmi, které jim umožňují manipulovat imunitní odpovědí hostitele. Jsou to ale také užitečné nástroje molekulární biologie, které pomohly k objevení různých buněčných mechanismů. Kromě toho, díky jejich schopnosti dostat se do hostitelské buňky, jsou bakteriální toxiny nebo jejich méně toxické mutované varianty zkoumány pro možnost použití v oblasti medicíny: pro dopravu antigenů a stimulaci adaptivní T buněčné imunitní odpovědi, k adjuvantní stimulaci imunity, nebo k eliminaci rakovinných buněk. Bakteriální toxiny obvykle vstupují do hostitelských buněk pomocí endocytózy zprostředkované receptorem, adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertusis* však přemísťuje svoji AC doménu přímo přes buněčnou membránu. Adenylátcyklázový toxin *Bordetella pertusis*, edémový a letální toxin *Bacillus anthracis*, Shiga toxin *Shigella dysenteriae* a Shiga-like toxin *Escherichia coli* jsou dobrými příklady toxinů schopných dopravy antigenů do dendritických buněk hostitele pro stimulaci specifických T-buněčných odpovědí. Pertusový toxin *Bordetella pertusis*, cholerový toxin *Vibrio cholera*, teplotně-labilní enterotoxin *E. coli* nebo Cry1A protein *Bacillus thuringiensis* mají zase potenciál působit jako adjuvans a stimulovat mukózní, jakož i systémové imunitní odpovědi. Difterický toxin *Corynebacterium diphtheriae* a exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa* jsou základem imunotoxinů, které se zdají být velmi slibnými nástroji v imunoterapii rakoviny. DT imunotoxin (DAB(389)IL-2) se dokonce již používá k léčbě kožního T buněčného lymfomu. Kromě toho v současné době existuje několik klinických studií s cílem vyhodnotit bezpečnost a účinnost vakcín odvozených od bakteriálních toxinů, například adenylátcyklázového toxoidu *Bordetelly*, který je použit jako nástroj pro dopravu antigenů pro imunoterapii nádorů děložního čípku a metastazujícího melanomu.

Závěry

Mechanismus adjuvantní aktivity toxoidu CyaA-AC⁻ (Publikace 1)

- Ukázali jsme, že CyaA-AC⁻ toxoid, který postrádá svoji enzymatickou, ale zachovává si pórotvornou aktivitu při nízké koncentraci 300 ng/ml vyvolává maturaci CD11b exprimujících dendritických buněk způsobem nesouvisejícím s TLR a inflamazomovou signalizací. Ta závisí na schopnosti toxoidu permeabilizovat buňky a zahrnuje aktivaci JNK a p38 proteinových kináz.
- Po ošetření toxoidem, dendritické buňky z kostní dřeně (BMDC) zvýšily expresi kostimulačních molekul, produkci IL-6, KC, LIX, GCSF a PGE2 a vykazovaly zvýšenou chemotaktickou migraci
- Kromě toho jsme ukázali, že únik K⁺ způsobený CyaA-AC⁻ toxoidem indukuje maturaci slezinných DC a jejich schopnost expandovat antigen specifické CD4⁺ a CD8⁺ T buňky *in vivo*
- Je proto možné předpokládat, že právě kapacita CyaA-AC⁻ toxoidu vyvolat zrání a migraci DC zodpovídá za jeho adjuvantní účinky *in vivo*.

CyaA moduluje TLR-indukovanou maturaci a kapacitu DC stimulovat T buňky (Publikace 2)

- Zkoumali jsme schopnost CyaA toxinu (v koncentracích blízkých koncentraci fyziologické) modulovat zrání indukované LPS a kapacitu stimulovat T buňky myších a lidských DC skrze aktivaci cAMP signální dráhy
- CyaA napomáhá odpojení buněk indukované LPS a jejich migraci směrem k chemokinům CCL19 a CCL20 navádějícím do lymfatických uzlin
- Ukázali jsme, že CyaA snížil kapacitu TLR-aktivovaných DC prezentovat rozpustné antigeny CD4⁺ T buňkám a zvýšil jejich schopnost podporovat expanzi CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulačních T buněk *in vitro*
- Kromě toho, CyaA také snížil schopnost LPS-stimulovaných DC indukovat proliferaci CD8⁺ T buněk. A navíc měl za následek snížení produkce IFN- γ , zatímco IL-17 a IL-10 produkce byla u CD8⁺ T buněk zvýšena.

Ochrana proti chřipce A indukované CyaA-AC-HA2 (Publikace 3)

- Připravený toxoid CyaA-AC-HA2 indukuje HA2 specifické odpovědi u T a B lymfocytů v myší linii BALB/c. Přítomnost specifických protilátek byla detekována metodou ELISA v séru imunizovaných myší. Izotypové složení specifických protilátek ukazuje na smíšenou indukci polarizované imunitní odpovědi Th1 a Th2.
- Dále ukazujeme, že HA2-specifické protilátky indukované CyaA-AC-HA2 byly schopné reagovat i s chřipkovými viry A podtypu H3, H4 a H7. Navíc bylo prokázáno, že snižují replikaci viru.
- CyaA-AC-HA2 imunizace urychlila eradikaci viru z myší infikovaných homologním H3 a heterologním H7 virem chřipky a chránila je proti letální dávce těchto virů.

Doprava AC domény přes cytoplazmatickou membránu APC (Publikace 4)

- Výsledky delečního mapování AC domény ukázaly, že prvních 371 aminokyselin AC domény je postradatelných pro schopnost CyaA přenést svoji N-terminální část přes cytoplazmatickou membránu dendritických buněk. To jsme zjišťovali pomocí schopnosti toxoidu doručit vložený OVA epitop do DC pro *in vitro* stimulaci OVA-specifických CD8⁺ T buněk.
- Toxoidy, ve kterých bylo prvních 371 zbytků AC domény nahrazeno dlouhými heterologními polyepitopy byly stále schopny vyvolat účinnou antigen specifickou odpověď u CD8⁺ CTL buněk *in vivo* u myší, a *ex vivo* u lidských mononukleárních buněk z periferní krve.
- Tyto výsledky naznačují, že AC doména se podílí na pronikání membránou pouze jako pasivní cestující. Důležité je, že její schopnost dopravovat velké heterologní polypeptidy přes cytoplazmatickou membránu buněk prezentujících antigen otvírá cestu ke konstrukci nové generace vakcín na CyaA bázi.

Úloha pórtvorné aktivity CyaA při infekci *Bordetella pertussis* (Publikace 5)

- Hemolytická (pórtvorná) aktivita CyaA není potřebná pro imunomodulační ovlivňování fenotypu dendritických buněk bakterií *B. pertussis*

- Hemolytická aktivita CyaA není nutná pro kolonizaci plic myší bakterií *B. pertussis*, avšak přispívá k exacerbaci zánětlivého poškození plic myší v průběhu infekce
- Kromě toho, pórotvorná aktivita CyaA je odpovědná za příliv myeloidních buněk do infikovaných plic
- Pórotvorná aktivita spolu s aktivitou zvyšující koncentraci cAMP synergizují a vedou ke snížení hladin exprese molekuly MHC II na infiltrovaných myeloidních buňkách

Curriculum Vitae

Mgr. Martina Švédová (rozená Kosová)

Narozena: 8. července 1984, Plzeň

Email: svedova.martina@gmail.com

Vzdělání

2008-nyní

Doktorské studium Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Disertační práce: Mechanismus působení adenylátcyklázového toxinu na imunitní funkce dendritických buněk pod vedením prof. Ing. Peter Šebo, CSc. v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České Republiky

2006-2008

Magisterské studium Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Diplomová práce: Příprava slepičích protilátek proti vybraným antigenním strukturám Pseudomonas aeruginosa pod vedením prof. RNDr. Petr Hodek, CSc. na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

2003-2006

Bakalářské studium Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Bakalářská práce: Vytypování antigenů virulenčních faktorů Pseudomonas aeruginosa pro účely pasivní imunizace pod vedením prof. RNDr. Petr Hodek, CSc. na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Jazykové znalosti

Anglický jazyk (zkouška FCE - First Certificate in English)

Konference

The 2nd Prato Conference on Pore Forming Proteins 2012, Italy

M. Kosova, I. Adkins, R. Fiser, O. Cerny, J. Masin, L. Sadilkova and P. Sebo: Pore-forming activity of adenylate cyclase toxoid triggers dendritic cell maturation (plakátové sdělení)

XII Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků (2012, Počátky u Pelhřimova)

M. Kosová, I. Adkins, R. Fišer, O. Černý, J. Mašín, L. Sadílková, P. Šebo: Adjuvantní účinek adenylátcyklázového toxoidu: Mechanismus aktivace imunitních funkcí dendritických buněk (přednáška)

ETOX 16 European Workshop on Bacterial Protein Toxins (2013), Freiburg, Germany

M. Kosova, I. Adkins, R. Fiser, O. Cerny, J. Tomala, J. Masin, L. Sadilkova and P. Sebo: Pore-forming activity of adenylate cyclase toxoid triggers dendritic cell maturation (plakátové sdělení)

XIII Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků (2013, Žďár nad Sázavou)

M. Kosová, I. Adkins, R. Fišer, J. Tomala, O. Černý, J. Mašín, L. Sadílková, P. Šebo: Adjuvantní účinek adenylátcyklázového toxoidu: Mechanismus aktivace imunitních funkcí dendritických buněk (plakátové sdělení)

Seznam publikací / List of publications

Svedova, M., Masin, J., Fiser, R., Cerny, O., Tomala, J., Freudenberg, M., Tuckova, L., Kovar, M., Dadaglio, G., Adkins, I., & Sebo, P. (2016). Pore-formation by adenylate cyclase toxoid activates dendritic cells to prime CD8+ and CD4+ T cells. *Immunol Cell Biol*, 94(4), 322-333. doi:10.1038/icb.2015.87

Adkins, I., Kamanova, J., Kocourkova, A., **Svedova, M.**, Tomala, J., Janova, H., Masin, J., Chladkova, B., Bumba, L., Kovar, M., Ross, P. J., Tuckova, L., Spisek, R., Mills, K. H., & Sebo, P. (2014). Bordetella adenylate cyclase toxin differentially modulates toll-like receptor-stimulated activation, migration and T cell stimulatory capacity of dendritic cells. *PLoS One*, 9(8), e104064. doi:10.1371/journal.pone.0104064

Stanekova, Z., Adkins, I., **Kosova, M.**, Janulikova, J., Sebo, P., & Vareckova, E. (2013). Heterosubtypic protection against influenza A induced by adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin. *Antiviral Res*, 97(1), 24-35. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.008

Holubova, J., Kamanova, J., Jelinek, J., Tomala, J., Masin, J., **Kosova, M.**, Stanek, O., Bumba, L., Michalek, J., Kovar, M., & Sebo, P. (2012). Delivery of large heterologous polypeptides across the cytoplasmic membrane of antigen-presenting cells by the Bordetella RTX hemolysin moiety lacking the adenylyl cyclase domain. *Infect Immun*, 80(3), 1181-1192. doi:10.1128/IAI.05711-11

Skopova K., Tomalova B., Kanchev I., Rossmann P., **Svedova M.**, Adkins I., Bibova I., Tomala J., Masin J., Guiso N., Osicka R., Sedlacek R., Kovar M., Sebo P. (2017) Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin is not required for lung colonization and subversion of dendritic cell function but contributes to virulence of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*, in press

Adkins, I., Holubova, J., **Kosova, M.**, & Sadiilkova, L. (2012). Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 13(8), 1446-1473.

Použitá literatura / References

- Adkins, I., Holubova, J., Kosova, M., & Sadilkova, L. (2012). Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 13(8), 1446-1473.
- Arciniega, J. L., Hewlett, E. L., Johnson, F. D., Deforest, A., Wassilak, S. G., Onorato, I. M., Manclark, C. R., & Burns, D. L. (1991). Human serologic response to envelope-associated proteins and adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*, 163(1), 135-142.
- Ausiello, C. M., Urbani, F., la Sala, A., Lande, R., & Cassone, A. (1997). Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infect Immun*, 65(6), 2168-2174.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R., & Sebo, P. (2006). Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun*, 74(4), 2207-2214.
- Carbonetti, N. H. (2010). Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol*, 5, 455-469.
- Cheung, G. Y., Xing, D., Prior, S., Corbel, M. J., Parton, R., & Coote, J. G. (2006). Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect Immun*, 74(12), 6797-6805. doi:10.1128/IAI.01104-06
- Confer, D. L., & Eaton, J. W. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*, 217(4563), 948-950.
- Dadaglio, G., Fayolle, C., Zhang, X., Ryffel, B., Oberkamp, M., Felix, T., Hervas-Stubbs, S., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., & Leclerc, C. (2014). Antigen targeting to CD11b+ dendritic cells in association with TLR4/TRIF signaling promotes strong CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 193(4), 1787-1798. doi:10.4049/jimmunol.1302974
- Dadaglio, G., Morel, S., Bauche, C., Moukrim, Z., Lemonnier, F. A., Van Den Eynde, B. J., Ladant, D., & Leclerc, C. (2003). Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes. *Int Immunol*, 15(12), 1423-1430.
- Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P., & 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(7), 3867-3872.
- Dunne, A., Ross, P. J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C. E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P., & Mills, K. H. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*. *J Immunol*, 185(3), 1711-1719. doi:10.4049/jimmunol.1000105
- Farfel, Z., Konen, S., Wiertz, E., Klapmuts, R., Addy, P. A., & Hanski, E. (1990). Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase are produced in man during pertussis infection and after vaccination. *J Med Microbiol*, 32(3), 173-177. doi:10.1099/00222615-32-3-173
- Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M. J., Saron, M. F., Sebo, P., & Leclerc, C. (2001). Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol*, 75(16), 7330-7338.
- Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., & Leclerc, C. (1996). In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J Immunol*, 156(12), 4697-4706.
- Goodwin, M. S., & Weiss, A. A. (1990). Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun*, 58(10), 3445-3447.

- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., & 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*(9), 1035-1044.
- Harvill, E. T., Cotter, P. A., Yuk, M. H., & Miller, J. F. (1999). Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect Immun*, *67*(3), 1493-1500.
- Jackson, D. C., Drummer, H. E., & Brown, L. E. (1994). Conserved determinants for CD4+ T cells within the light chain of the H3 hemagglutinin molecule of influenza virus. *Virology*, *198*(2), 613-623. doi:10.1006/viro.1994.1073
- Jelinek, J., Adkins, I., Mikulkova, Z., Jagosova, J., Pacasova, R., Michlickova, S., Sebo, P., & Michalek, J. (2012). In vitro activation of CMV-specific human CD8(+) T cells by adenylate cyclase toxoids delivering pp65 epitopes. *Bone Marrow Transplant*, *47*(2), 243-250. doi:10.1038/bmt.2011.68
- Khelef, N., Sakamoto, H., & Guiso, N. (1992). Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog*, *12*(3), 227-235.
- Ladant, D., & Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*, *7*(4), 172-176.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., & Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(6), 1076-1112. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x
- Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C., & 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*(2), 1002-1005.
- Macdonald-Fyall, J., Xing, D., Corbel, M., Baillie, S., Parton, R., & Coote, J. (2004). Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* towards co-administered antigens. *Vaccine*, *22*(31-32), 4270-4281.
- Mackova, J., Stasikova, J., Kutinova, L., Masin, J., Hainz, P., Simsova, M., Gabriel, P., Sebo, P., & Nemeckova, S. (2006). Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by *Bordetella* adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother*, *55*(1), 39-46.
- Mascarell, L., Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D., & Leclerc, C. (2005). Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8+ T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *J Virol*, *79*(15), 9872-9884.
- Masin, J., Osicka, R., Bumba, L., & Sebo, P. (2015). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog Dis*, *73*(8), ftv075. doi:10.1093/femspd/ftv075
- Mills, K. H., Ross, P. J., Allen, A. C., & Wilk, M. M. (2014). Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol*, *22*(2), 49-52. doi:10.1016/j.tim.2013.11.007
- Orr, B., Douce, G., Baillie, S., Parton, R., & Coote, J. (2007). Adjuvant effects of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* after intranasal immunisation of mice. *Vaccine*, *25*(1), 64-71.
- Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C., & 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*(1), 247-256.
- Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R., & Sebo, P. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol Microbiol*.

- Preville, X., Ladant, D., Timmerman, B., & Leclerc, C. (2005). Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res*, *65*(2), 641-649.
- Ross, P. J., Lavelle, E. C., Mills, K. H., & Boyd, A. P. (2004). Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun*, *72*(3), 1568-1579.
- Ryan, M., Murphy, G., Ryan, E., Nilsson, L., Shackley, F., Gothefors, L., Oymar, K., Miller, E., Storsaeter, J., & Mills, K. H. (1998). Distinct T-cell subtypes induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology*, *93*(1), 1-10.
- Saikh, K. U., Martin, J. D., Nishikawa, A. H., & Dillon, S. B. (1995). Influenza A virus-specific H-2d restricted cross-reactive cytotoxic T lymphocyte epitope(s) detected in the hemagglutinin HA2 subunit of A/Udorn/72. *Virology*, *214*(2), 445-452. doi:10.1006/viro.1995.0055
- Saron, M. F., Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., & Leclerc, C. (1997). Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from Bordetella pertussis carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(7), 3314-3319.
- Sebo, P., Fayolle, C., d'Andria, O., Ladant, D., Leclerc, C., & 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*(10), 3851-3857.
- Sebo, P., Osicka, R., & Masin, J. (2014). Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*, *13*(10), 1215-1227. doi:10.1586/14760584.2014.944900
- Simsova, M., Sebo, P., & 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*(7-8), 571-576. doi:10.1078/1438-4221-00291
- Stanekova, Z., Adkins, I., Kosova, M., Janulikova, J., Sebo, P., & Vareckova, E. (2013). Heterosubtypic protection against influenza A induced by adenylate cyclase toxoids delivering conserved HA2 subunit of hemagglutinin. *Antiviral Res*, *97*(1), 24-35. doi:10.1016/j.antiviral.2012.09.008
- Stropkova, A., Janulikova, J., & Vareckova, E. (2010). Trends in development of the influenza vaccine with broader cross-protection. *Acta Virol*, *54*(1), 7-19.
- Van Damme, P., Bouillette-Marussig, M., Hens, A., De Coster, I., Depuydt, C., Goubier, A., Van Tendeloo, V., Cools, N., Goossens, H., Hercend, T., Timmerman, B., & Bissery, M. C. (2016). GTL001, A Therapeutic Vaccine for Women Infected with Human Papillomavirus 16 or 18 and Normal Cervical Cytology: Results of a Phase I Clinical Trial. *Clin Cancer Res*, *22*(13), 3238-3248. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0085
- Vojtova, J., Kamanova, J., & Sebo, P. (2006). Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol*, *9*(1), 69-75.
- Wang, T. T., & Palese, P. (2009). Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins? *Nat Struct Mol Biol*, *16*(3), 233-234. doi:10.1038/nsmb.1574
- Wolff, J., Cook, G. H., Goldhammer, A. R., & Berkowitz, S. A. (1980). Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(7), 3841-3844.