

La toxina adenilato ciclasa – hemolisina de *Bordetella pertussis*: Función en la patogénesis y aplicaciones

Yunier Serrano-Rivero y Rafael Fando-Calzada

Dpto. Biología Molecular, Dirección Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional Investigaciones Científicas.
Apartado Postal. 6412 La Habana, Cuba

Recibido: 8 de junio de 2013.

Aceptado: 26 de septiembre de 2013.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*, tosferina, adenilato ciclasa, hemolisina.

Key words: *Bordetella pertussis*, whooping cough, adenylate cyclase, hemolysin.

RESUMEN. La toxina adenilato ciclasa – hemolisina (TAC) es uno de los principales factores de virulencia de *Bordetella pertussis*. Fue descubierta en 1973 por Wolff y Cook como un contaminante en las formulaciones vacunales contra este microorganismo. Perteneció a la familia de las toxinas que forman poros en la membrana plasmática de las células diana y alcanza su máxima expresión en la fase virulenta de la bacteria. Esta toxina posee 1706 residuos de aminoácidos y se compone de dos dominios: uno N-terminal, que presenta actividad adenilato ciclasa sensible a calmodulina y otro C-terminal, que promueve la formación de poros en la membrana de las células diana. Por otra parte, las moléculas $\alpha M\beta 2$ tipo integrina son los receptores naturales para la toxina, a los cuales se une por la porción extracelular N-glicosilada. TAC le permite a la bacteria inhibir la fagocitosis, la activación de las células T colaboradoras de tipo 1 y células T citotóxicas, así como la producción de interferón gamma por macrófagos. A pesar de sus efectos tóxicos, la forma inactivada de la toxina es empleada en la entrega de epítopos inmunogénicos a las células presentadoras de antígenos, en la identificación de proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III y en estudios de interacción proteína – proteína.

ABSTRACT. The adenylate cyclase - hemolysin toxin (ACT) is one of the main virulence factors in *Bordetella pertussis*. It was discovered in 1973 by Wolff and Cook as a contaminant in vaccine formulations against this microorganism. It belongs to the family of toxins that form pores at the plasma membrane of target cells and reaches the highest expression during the virulent phase of the bacteria. This toxin has 1706 amino acid residues and is composed of two domains: the N-terminal domain, with calmodulin-sensitive adenylate cyclase activity and the C-terminal domain that promotes the formation of pores at the membrane of target cells. Furthermore, the integrins type $\alpha M\beta 2$ molecules are natural receptors for the toxin, which binds to the N-glycosylated extracellular portion. ACT allows the bacteria to inhibit phagocytosis, activation of type 1 T-helper cells and cytotoxic T cells as well as gamma interferon production by macrophages. Despite of its toxic effects, the inactivated form of the toxin has been used in delivering immunogenic epitopes to antigen-presenting cells, in the identification of proteins secreted by the type III secretion system and in protein-protein interactions studies.

INTRODUCCIÓN

La tosferina es una enfermedad aguda que afecta al hombre es provocada fundamentalmente por la bacteria gram-negativa *Bordetella pertussis* y en menor medida, por *Bordetella parapertussis*.¹⁻⁴ Se plantea que la enfermedad se transmite a través de aerosoles producidos al toser por el individuo enfermo hacia el sano.¹⁻³ En niños menores de un año, la enfermedad tiende a ser fatal, la tos paroxística característica bloquea las vías respiratorias, lo que provoca la asfixia y la muerte. Otros eventos adversos o complicaciones serias de la enfermedad se observan, entre ellos, neumonías bacterianas secundarias, epilepsias, encefalopatía, apnea e hipertensión pulmonar.⁴ La infección por *B.*

pertussis constituye un problema de salud pública, incluso en países desarrollados con buenas coberturas de vacunación. La evidencia actual confirma que esta enfermedad continúa causando muertes en lactantes con esquemas de vacunación incompletos.⁵ Varios países reportaron un incremento en los casos de infección por *B. pertussis* durante la década pasada, asociada con cambios en la frecuencia reportada por grupos de edad. Se ha identificado un mayor porcentaje de esta enfermedad en adolescentes y adultos.⁶

Para llevar a cabo el proceso infeccioso, este microorganismo se adhiere a las células ciliadas del epitelio nasofaríngeo y del árbol traqueo-bronquial mediante moléculas de adhesión: hemaglutinina filamentosa (HFA), fimbrias, pertactina y otras proteínas de superficie. Estas, junto a la toxina pertúsica (TP), la citotoxina traqueal (CTT), la toxina dermonecrótica (TDN) y la toxina adenilato ciclasa-hemolisina (TAC) son sus principales determinantes de patogenicidad.⁷

La toxina adenilato ciclasa-hemolisina es también conocida como TAC, CyaA o AC-Hly.^{8,9} Fue primeramente descubierta en 1973 por Wolff y Cook como un contaminante en formulaciones vacunales de células completas contra *B. pertussis*.¹⁰ Tres años después, Hewlett y Wolff aislaron a partir del sobrenadante de cultivo de este microorganismo una proteína de aproximadamente 70 kDa que carecía de actividad catalítica.¹¹ En 1985, el grupo de Ladant purificó a partir de cultivo líquido tres proteínas de 70, 50, y 45 kDa, estructuralmente relacionadas y que eran reconocidas por el mismo anticuerpo.^{12,13} Estas, al escindir proteolíticamente daban origen al fragmento de 43 kDa, lo cual indicó que estos fragmentos procedían de una proteína común de mayor peso molecular, que luego de ser secretada al medio de cultivo era procesada por proteasas.¹⁴ Sin embargo, ninguna de ellas tenía la capacidad de producir adenosinmonofosfato-3',5'-cíclico (cAMP).¹² Luego, Hanski y Fardel corroboraron este hecho aislando proteínas de 190 a 200 kDa con actividad catalítica a partir de extractos crudos de *B. pertussis* y que además, eran reconocidas por el anticuerpo que había reconocido las proteínas purificadas por el grupo de Ladant en 1985.¹² TAC es una proteína bifuncional con un dominio N-terminal que presenta actividad adenilato ciclasa y un dominio C-terminal,^{15,16} que media la liberación del dominio catalítico dentro del citoplasma en células eucariotas y posee baja, pero detectable actividad hemolítica para glóbulos rojos.^{17,18} Esta toxina permanece asociada a la superficie celular, mientras que solo una pequeña parte es liberada al medio de cultivo.^{13,18} Según investigaciones realizadas por diversos autores, se ha demostrado que la hemaglutinina filamentosa la mantiene anclada a la superficie de la célula bacteriana.¹¹ La actividad catalítica de la toxina aumenta hasta 1000 veces cuando interactúa con la calmodulina (CaM) que se encuentra en el citoplasma de las células eucariotas.¹⁷ Dicha característica la ubica en el grupo de las adenilato ciclasas de clase II.¹⁹ CyaA también es miembro de la familia de las citotoxinas RTX (del inglés Repeat in Toxin), las cuales promueven la formación de poros en la membrana de las células diana y por lo tanto, producen su lisis. Esta familia de toxinas tiene la característica común de presentar secuencias repetidas en tándem de un nonapéptido rico en los aminoácidos glicina y aspartato, que se localizan cercanas al extremo C-terminal,^{16,20} se unen a la porción glicosilada del extremo N-terminal de los receptores $\alpha M\beta 2$ y son secretadas por un sistema de secreción tipo I.²¹⁻²³ El objetivo de este trabajo consistió en brindar una información lo más actualizada posible acerca de la toxina adenilato ciclasa-hemolisina de *Bordetella pertussis*, su estructura, el papel que desempeña en la patogénesis de la enfermedad, así como sus diferentes aplicaciones en la industria biofarmacéutica y en la investigación básica.

REGULACIÓN DE LA VIRULENCIA EN *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis posee un número importante de factores de virulencia. La expresión de la mayoría de estos factores está regulada o modulada en respuesta a cambios en las condiciones ambientales a través de un sistema de transducción de señales de dos componentes sensor/activador denominado BvgAS (*Bordetella* virulence gene activador / sensor, en el idioma inglés). Entre los factores de virulencia cuya expresión es controlada por este sistema se encuentran: adhesinas, autotransportadores y toxinas, entre las toxinas se encuentra la adenilato ciclasa-hemolisina. Asimismo, *B. pertussis* presenta algunos factores cuya expresión es independiente de dicho sistema de regulación. El sistema BvgAS está compuesto por un regulador transcripcional, BvgA de 23 kDa y un sensor híbrido anclado a la membrana externa, BvgS de 135 kDa. La activación del BvgAS implica un mecanismo de fosfotransferencia de cuatro pasos (Fig. 1 a). *In vitro*, el sistema se activa cuando la bacteria crece a 37 °C en un medio de cultivo estándar y se inactiva a temperaturas de incubación inferiores a 26 °C o en presencia de concentraciones milimolares de agentes moduladores como MgSO₄ (≥ 40 mmol/L) o ácido nicotínico (≥ 10 mmol/L). El sistema BvgAS funciona controlando la expresión diferencial de distintos genes asociados con la virulencia a lo largo de tres fases fenotípicas: i) La fase virulenta o Bvg⁺, caracterizada por la expresión de los genes *vag* (virulence activated genes), los cuales codifican factores de virulencia. Estos genes se pueden diferenciar de acuerdo con su expresión temporal en *vag* tempranos (codifican algunas adhesinas) y *vag* tardíos (codifican toxinas). Asimismo, esta fase se identifica por la ausencia de expresión de los genes *vrg* (virulence repressed genes), de función aún no esclarecida. ii) La fase avirulenta o Bvg⁻ se identifica por la ausencia de expresión de los genes *vag* y la expresión de los genes *vrg*. iii) La fase intermedia o Bvgⁱ (etapa de transición entre las fases Bvg⁺ y Bvg⁻) se caracteriza por la expresión de los genes *vag* tempranos, el gen *bvgAS* y el gen *bipA*, único gen de su clase identificado hasta ahora (Fig. 1 b). De este modo,

el sistema BvgAS funcionaría como un “reóstato”, controlando de manera ajustada y coordinada la expresión diferencial de varios perfiles de genes relacionados con la virulencia en al menos tres fases fenotípicas.¹⁸

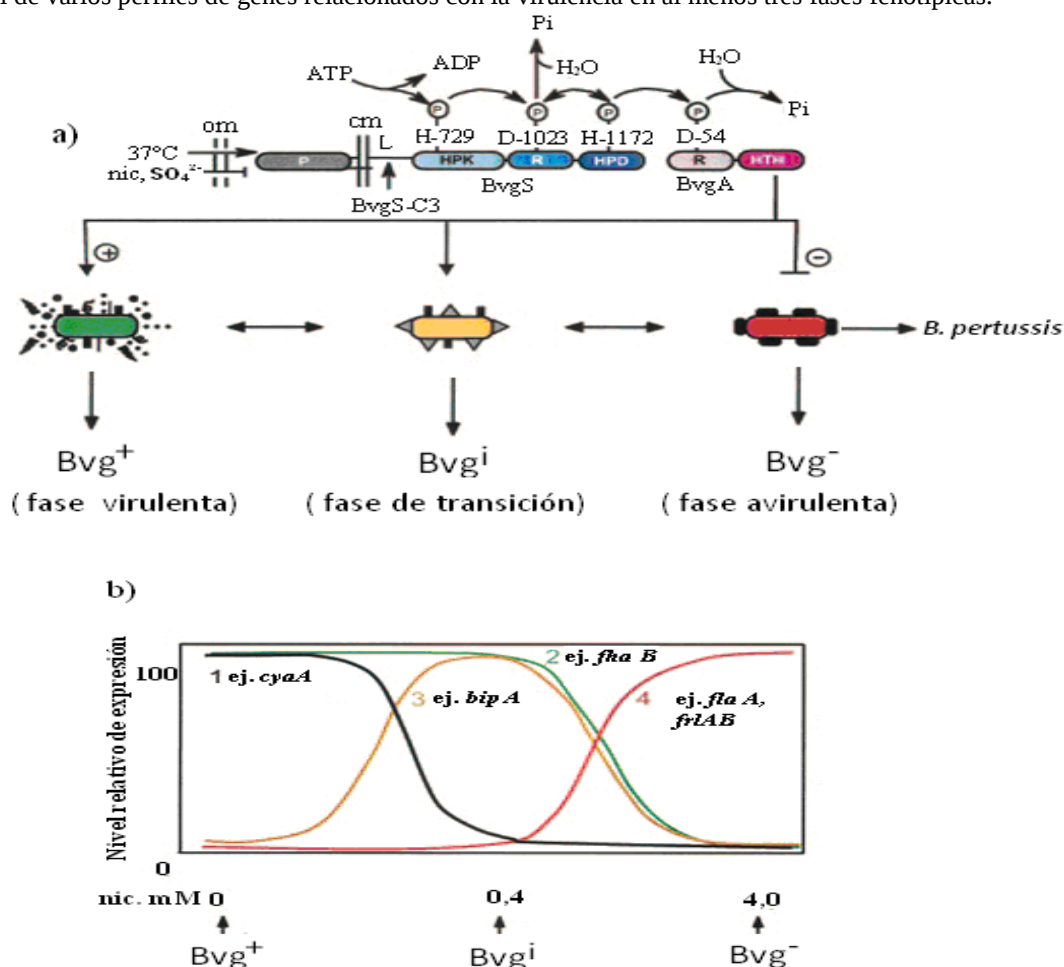


Fig. 1. a) Esquema del sistema de dos componentes BvgAS y de su mecanismo de activación. BvgS es una proteína sensora transmembrana integrada por: dominio periplásmico (P), región de unión (L), dominio con actividad histidina quinasa (HPK), dominio receptor (R) y dominio con actividad histidina fosfotransferasa (HPT). La proteína BvgA es un regulador de respuesta que contiene un dominio receptor (R) y un dominio hélice-giro-hélice (HTH) que permite la unión a ADN. In vitro, la proteína BvgS recibe la señal (paso 1), se autofosforila (paso 2) e inicia la fosfotransferencia que conduce a la activación de BvgA (pasos 3, 4 y 5). El sistema BvgAS controla cuatro clases de genes asociados con la virulencia, y que se expresan de modo diferencial definiendo tres fases fenotípicas: Bvg⁺, Bvgⁱ y Bvg⁻. b) Curvas de expresión relativa de las cuatro clases de genes. La fase Bvg⁺ se caracteriza por la expresión de los vag tardíos como *cyaA* que codifica la toxina AC (curva 1) y de los genes vag tempranos como *fhaB* que codifica la adhesina FHA (curva 2). La fase Bvgⁱ se identifica por la expresión de los genes vag tempranos y de los que se expresan en la transición entre Bvg⁺ y Bvg⁻, como *bipA* (curva 3). La fase Bvg⁻ se define por la expresión de los genes vrg (curva 4),¹⁸ con modificaciones.

Existen evidencias que sugieren que durante la transmisión de persona a persona hay factores ambientales que determinarían que *B. pertussis* se encuentre en fase Bvg⁻ o Bvgⁱ. De esta manera, durante los primeros estadios de colonización este patógeno no expresaría las proteínas codificadas por los genes vag (bacteria en fase Bvg⁻). Posteriormente, la expresión de adhesinas (fase Bvgⁱ) inducidas por un cambio en las condiciones del entorno, favorecería la interacción con las células del epitelio respiratorio. Luego de esta etapa, la expresión de toxinas propias de la fase Bvg⁺ generaría la alteración de los mecanismos de defensa del hospedero.^{18,24}

ESTRUCTURA DE LA ADENILATO CICLASA-HEMOLISINA

La toxina adenilato ciclasa - hemolisina presenta un peso molecular de 200 kDa, y es secretada como una cadena polipeptídica de 1706 aminoácidos (aa),^{20,25} que presenta dos dominios; uno con actividad adenilato ciclasa (AC), que se localiza dentro de los 400 aminoácidos próximos al extremo N-terminal y el dominio RTX ó hemolítico

(Hly) que involucra los 1306 aminoácidos restantes y promueve la formación de poros en la membrana.^{25,26} El dominio con actividad catalítica presenta estructuras secundarias en α -hélice y hojas β , y está compuesto por dos subdominios conocidos como T25 y T18, en el primero se localiza el sitio catalítico, mientras que en el segundo se haya el sitio principal de unión a CaM. Ambos subdominios pueden ser obtenidos *in vitro* mediante proteólisis limitada y son capaces de reasociarse con CaM para formar una estructura terciaria catalíticamente activa. A su vez, este dominio puede ser dividido en tres regiones RC1, RC2 y RC3 respectivamente. Estas regiones son altamente conservadas y estructuralmente idénticas. En ausencia de CaM, el dominio AC se encuentra desordenado, su estructura terciaria es compacta e hidratada. Cuando el extremo C-terminal de la CaM interactúa con el subdominio T18 de la toxina, el dominio catalítico adopta una conformación extendida y deshidratada, sin cambios significativos en la estructura, pero sí en sus propiedades hidrodinámicas.²⁷ Por otro lado, el dominio RTX de TAC, básicamente puede ser dividido en cuatro regiones: (1) la región en la que se ubican varios segmentos hidrofóbicos que se insertan en la membrana plasmática y adoptan estructuras en α -hélice, (2) la región en la que ocurre la palmitoilación de la Lys⁸⁶⁰ y la Lys⁹⁸³, (3) la región en la que hay de 38 a 42 repeticiones de los motivos RTX,^{21,28,29} y finalmente, (4) una señal de secreción carboxi-terminal no procesada.^{21,29,30} Los motivos RTX son secuencias formadas por el nonapéptido GGXGXDXUX, donde X puede ser cualquier aminoácido y U es ocasionalmente sustituido por V, I, F, ó Y. En presencia de calcio, el dominio C-terminal sufre un cambio conformacional, de modo que varios motivos adyacentes se pliegan, formando una hélice β . Todos los motivos RTX están constituidos por un giro β que involucra a los primeros seis aminoácidos de cada nonapéptido (GGXGXD) y una pequeña hoja β , formada por los aminoácidos (XUX) restantes. El calcio se une al grupo carbonilo de la cadena lateral del aspartato, presente en cada giro β .^{16,21} En la molécula TAC, los motivos RTX se encuentran organizados en cinco bloques (A-E), cada uno con 8-10 motivos RTX separados por regiones de enlace de longitud variable (23-49 residuos). La unión de 30 a 40 iones calcio es de vital importancia para el plegamiento y actividad de la toxina (Fig. 2.).

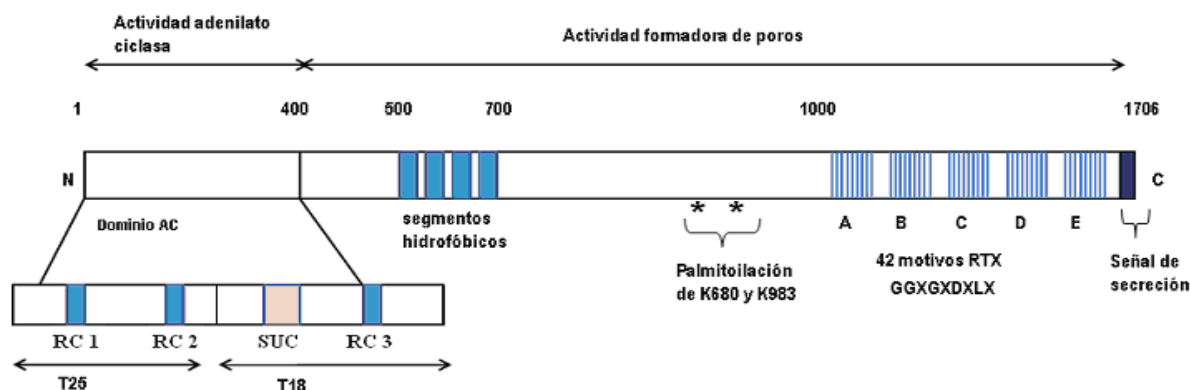


Fig .2. Organización estructural de la toxina Adenilato ciclase de *Bordetella pertussis* (CyaA). Los números representan los residuos de aminoácidos. El dominio catalítico (AC) se amplía para mostrar los subdominios T25 y T18. SUC se corresponde con el principal sitio de unión a calmodulina, RC1, RC2 y RC3 representan regiones que participan en la catálisis. A, B, C, D y E son los bloques que agrupan los motivos RTX,³⁰ con modificaciones.

Para la mayoría de las toxinas RTX, la función de los motivos RTX no se encuentra definida; sin embargo, se cree que estén involucrados en el proceso de secreción, debido a que la mayoría de los factores de virulencia que presentan dichos motivos son secretados por un sistema de secreción tipo I.¹⁶ Este dominio no se encuentra plegado durante la secreción de la toxina, lo que es de vital importancia para el proceso.^{16,31}

EL OPERÓN *cyaABDE*

El operón *cyaABDE* está compuesto por cuatro genes: el gen estructural *cyaA* y tres genes, *cyaB*, *D* y *E*, necesarios para la secreción de la toxina CyaA. Estos genes codifican para proteínas de 712 aa, 440 aa y 474 aa, respectivamente y se localizan a continuación del gen estructural.³² El gen *cyaC* no forma parte del operón y se transcribe en sentido inverso al mismo (Fig. 3). El producto del gen *cyaC* es una proteína de aproximadamente 21 kDa encargada de la activación de CyaA y actúa palmitoilando la Lys⁸⁶⁰ y la Lys.⁹⁸³



Fig .3. Organización de los genes en el operón *cyaABDE*. Las flechas son los genes e indican el sentido de la transcripción.

La palmitoilación de estos residuos es crucial para la actividad adenilato ciclasa y formadora de poros de la toxina.¹⁸ Investigaciones realizadas por Laoide y Ullmann demostraron que la transcripción del gen *cyaA* está regulada por un promotor que se encuentra 115 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción, la cual es activa solamente en cepas virulentas de *B. pertussis* y la terminación de la misma ocurre inmediatamente después del extremo 3'. Sin embargo, se han detectado transcritos de gran longitud que corresponden a la transcripción total del operón *cyaABDE*, lo cual indica que la maquinaria de transcripción no siempre reconoce el terminador de la transcripción entre el gen estructural y los genes que intervienen en la secreción de CyaB. En este operón también fue identificado un segundo sitio de inicio de la transcripción en la región intergénica *cyaA-cyaB* que se localiza 30 pb antes del gen *cyaB*. La transcripción de los genes involucrados en la secreción de la toxina ocurre de manera constitutiva, tanto en cepas virulentas como en las no virulentas. De esta manera, la expresión de la virulencia asociada a la toxina se encuentra controlada positivamente a través de una proteína que actúa en trans, codificada por el locus *bvg*, mientras que los genes de transporte muestran un bajo nivel de expresión constitutiva, independientemente del control de la virulencia.³² Por otra parte, CyaA, no contiene un sitio de alta afinidad para la proteína BvgA en su promotor; de modo que en su lugar tiene varios heptámeros de la secuencia consenso 5'-TTTCCTA-3' que se extiende desde los nucleótidos -137 y -51, a partir del sitio de inicio de la transcripción. La fosforilación de BvgA es absolutamente requerida para la unión a dichos sitios. La principal secuencia para la unión de BvgA~P se localiza entre los nucleótidos -100 y -80 y la unión a estos desencadena interacciones cooperativas de BvgA~P con los sitios vecinos de baja afinidad.¹⁸

RECEPTORES $\alpha M\beta 2$: GENERALIDADES

Los receptores $\alpha M\beta 2$ pertenecen a la subfamilia de los receptores leucocitarios, conocidos también como: receptores del complemento-3 (CR3,³³ CD11b/CD18,^{25,33} ó Mac-1.³⁴⁻³⁷) Esta subfamilia de receptores integra la matriz extracelular con el citoesqueleto mediante la transmisión bidireccional de señales.^{38,39} Estas moléculas constituyen un subgrupo de glicoproteínas heterodiméricas y transmembránicas que juegan un papel importante en diferentes funciones celulares como: la adhesión de leucocitos al endotelio,⁴⁰ la agregación y quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, así como la fagocitosis y lisis de eritrocitos. Todas estas funciones son mediadas por la interacción de la integrina con, al menos, uno de sus ligandos, los cuales incluyen moléculas de adhesión intercelular-1,2 (ICAM-1,2), factores inactivos del complemento (iC3b), factor X y fibrinógeno.⁴¹⁻⁴³ Adicionalmente, también son activados por otros componentes procedentes de microorganismos,³⁷ tales como lipopolisacáridos y proteínas.⁴⁴ La subfamilia de receptores-específico de leucocitos consta de cuatro miembros: $\alpha X\beta 2$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha D\beta 2$ y $\alpha M\beta 2$, respectivamente.³⁸ Todos presentan una estructura modular formada por tres regiones: (i) una región extracelular larga y glicosilada en la que se encuentra el sitio de unión al ligando, (ii) un segmento transmembránico y (iii) una corta región citoplasmática,³⁸ que requiere del concurso de proteínas adaptadoras para interactuar con el citoesqueleto.^{38,45,46} Las cadenas α y β de los receptores $\alpha M\beta 2$ corresponden a glicoproteínas transmembrana de 165 kDa y 95 kDa,⁴⁷ y están frecuentemente expresados en la superficie de linfocitos, células NK, monocitos, macrófagos y granulocitos.⁴⁴

MECANISMO DE ENTRADA DE TAC EN LAS CELULAS DIANA

El dominio catalítico (AC) de la toxina es conducido hacia el citoplasma de la célula diana a través del poro formado por el dominio RTX. Este proceso se conoce como internalización ó intoxicación. Varias evidencias apoyan el mecanismo de liberación del dominio catalítico: Primero, la aparición de la intoxicación es rápida; un incremento de los niveles de AMPc puede ser detectado dentro de segundos después de adicionada la toxina. Segundo, su entrada es independiente de la acidificación de las vesículas endocíticas.³⁰ Finalmente, y más importante TAC es capaz de invadir tipos celulares que no presentan receptores $\alpha M\beta 2$, tal como es el caso de los eritrocitos.⁴⁸ El mecanismo exacto por el cual la toxina es internalizada en la célula diana no se conoce con claridad. De manera general, en este proceso se pueden distinguir dos etapas. En la primera etapa, TAC se une a la superficie celular, posiblemente a gangliósidos. Esto requiere la integridad del extremo C-terminal de la toxina y de la palmitoilación de la Lys⁹⁸³. La unión de la toxina a los eritrocitos eventualmente conduce a su lisis, debido a la capacidad que presenta de formar poros en la membrana. El segundo paso consiste en la liberación del dominio catalítico dentro del citoplasma de la célula diana, a través del poro formado en la membrana plasmática por el dominio C-terminal (Fig. 4). Este proceso es dependiente de la temperatura, del potencial de membrana y de la presencia de concentraciones milimolares de iones calcio.³⁰

EFFECTOS DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA – HEMOLISINA EN LAS FUNCIONES CELULARES

La función celular es afectada primeramente por la actividad adenilato ciclasa de la toxina. En macrófagos, es suficiente con una de sus dos actividades. La actividad adenilato ciclasa y la formadora de poros pueden actuar sinérgicamente potenciando sus efectos en las células diana. Una de las consecuencias de estas actividades que contribuyen a los efectos citotóxicos de la toxina; es el agotamiento de ATP por la actividad AC y la entrada de calcio por la formación de poros en la membrana.⁴⁹⁻⁵¹

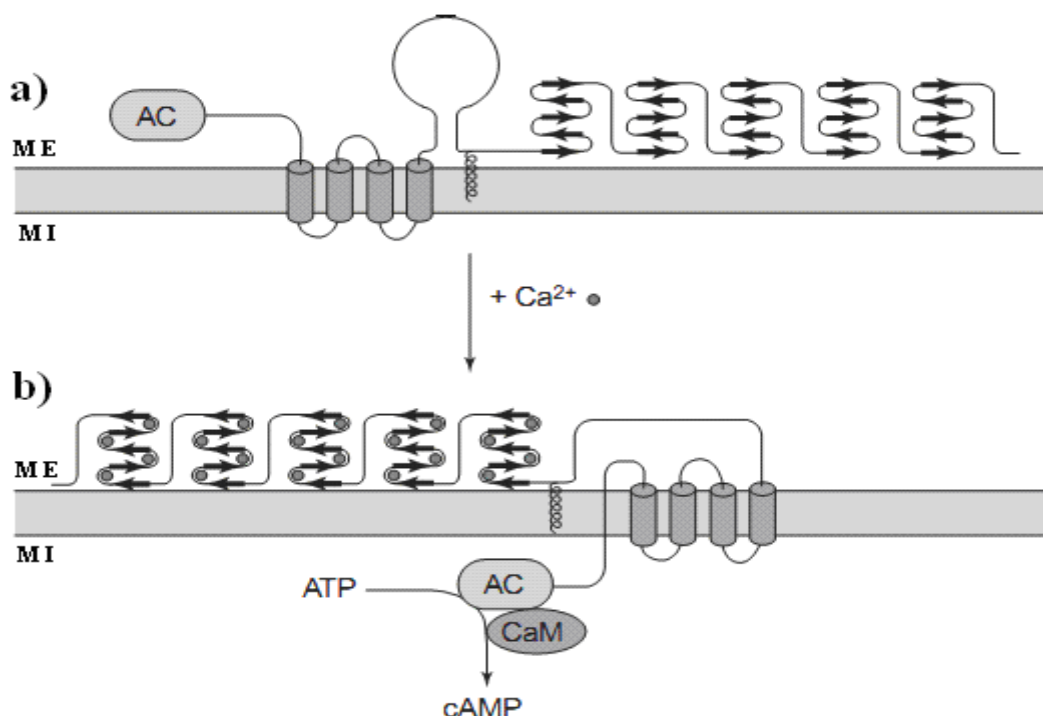


Fig .4. Mecanismo hipotético de liberación del dominio catalítico de la toxina adenilato ciclasa – hemolisina de *Bordetella pertussis* (TAC) a través de la membrana plasmática de la célula diana. Las flechas negras son las hojas β y las líneas continuas que unen a cada hoja son los giros β . (a) A bajas concentraciones de calcio ($<0,1\text{mmol/L}$), los dominios hidrofóbicos (cilindros) y las cadenas de ácido palmítico, son primeramente insertados en la membrana. (b) Con altas concentraciones de iones calcio ($>0,1\text{mmol/L}$) (círculos grises) se unen a los motivos RTX, lo cual induce un cambio conformacional en estos motivos que resulta en la liberación del dominio catalítico (AC) en el citoplasma. Luego de la unión de la calmodulina (CaM), AC cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP: Membrana externa (ME) y membrana interna (MI).³⁰

TAC provoca cambios en la morfología celular, incluyendo formación de vesículas en la membrana y en el tamaño de los eritrocitos a través de su actividad hemolítica. Este hecho se correlaciona con la acumulación de esta molécula en subdominios de la membrana.^{52,53} En macrófagos, la actividad AC provoca la inactivación de la GTPasa-RhoA, dando lugar a reordenamientos en el citoesqueleto y la inhibición de la fagocitosis, mediada por el complemento.⁹ Adicionalmente, la acumulación de AMPc induce apoptosis en diferentes células y puede potenciar los efectos apoptóticos de drogas anticancer en diferentes líneas de células cancerosas.^{49,54,55}

EFFECTOS DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA – HEMOLISINA EN LA MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE

TAC modula la respuesta del sistema inmunológico inhibiendo la fagocitosis y los mecanismos oxidativos en neutrófilos humanos.⁵⁶ Estudios en modelos animales demostraron que esta toxina es uno de los más importantes factores de virulencia de *B. pertussis*.⁵⁷⁻⁵⁹ Esta toxina puede inducir apoptosis en macrófagos *in vitro* e *in vivo*.⁶⁰⁻⁶² Se ha observado que las cepas mutantes de *B. pertussis* que no expresan esta toxina son eficientemente fagocitadas por neutrófilos humanos.^{49,63} Por otra parte, la toxina adenilato ciclasa también tiene un importante efecto inmunomodulador en el hospedero, lo que contribuye a la patogénesis y sus efectos parecen ser una mezcla de actividades estimuladoras e inhibitorias.⁶⁴ TAC también regula la expresión de las moléculas MHC clase II y co-estimuladoras en las células dendríticas, induciendo en éstas un estado semimaduro y como consecuencia disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias.⁶⁵⁻⁶⁸ Este efecto es consecuencia de la actividad enzimática de la toxina, cuya función citotóxica en células eucariota está asociada a su capacidad formadora de poros.⁶⁶ Otros estudios sugieren que la actividad adenilato ciclasa induce la producción de la citoquina IL-23 e inhibe la de IL-12,⁶⁹ esta última es esencial en la activación de las células T colaboradoras de tipo1(Th1), de las células T citotóxicas, células NK, y en la producción de interferón- γ por macrófagos.⁷⁰ Adicionalmente, la actividad enzimática de la toxina también promueve la producción de IL-10 en células dendríticas e impide la activación y quimiotaxis de los linfocitos T.^{71,72}

APLICACIONES DE LA TOXINA ADENILATO CICLASA- HEMOLISINA

Uso como herramienta de entrega de antígenos

A partir del hecho de que TAC es capaz de entregar epítopes a las células presentadoras de antígeno e introducir su sitio catalítico directamente en el citoplasma de las mismas, diversas versiones de la toxina inactivadas enzimáticamente han sido utilizadas como vector para la internalización de epítopes inmunogénicos, que luego son procesados y presentados por moléculas MHC clase I y II. Estos epítopes estimulan la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, confiriendo protección contra infecciones o tumores.^{73,74} Los epítopes inmunogénicos pueden ser fusionados al dominio catalítico de TAC de dos maneras; ya sea por métodos químico ó mediante ingeniería genética, siendo este último el más empleado.⁷⁵

En modelos animales, se estudió el efecto de la fusión de epítopes procedentes del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) al dominio catalítico de TAC, y como resultado de este experimento se indujo respuesta de células T CD8⁺ y anticuerpos anti-HIV en los animales estudiados.^{76,77} Resultados semejantes fueron obtenidos cuando se fusionó el dominio AC de la toxina a epítopes de *Plasmodium falciparum*.⁷⁸ Esta tecnología también se empleó en la fusión de epítopes de *Mycobacterium tuberculosis* al dominio catalítico de TAC, y como respuesta se estimuló la producción de IFN- γ por linfocitos T en pacientes enfermos con tuberculosis (TB), lo cual podría facilitar la detección de infecciones latentes en muestras de sangre de individuos infectados con TB e incluso en individuos infectados con HIV.^{73,79,80}

El uso como una herramienta para la detección de proteínas intracelulares y en estudios de interacción proteína-proteína

La toxina adenilato ciclasa es usada como herramienta en diversas investigaciones de Biología Celular.⁸¹ Por ejemplo, como reportero selectivo para la identificación de proteínas bacterianas secretadas por el sistema de secreción tipo III. Estas bacterias por lo general son patógenas de plantas y animales e insertan directamente sus toxinas en el citoplasma de células eucariota. Este mecanismo de secreción ha sido identificado en: *Salmonella* spp,⁸² *Yersinia* spp,⁸³ *Xanthomonas* spp,⁸⁴ *Shigella* spp, en *Escherichia coli* enteropatógena y *Pseudomonas aeruginosa*.⁸⁵

El sistema reportero consiste en fusionar la proteína acerca de la cual se quiere conocer el mecanismo de secreción al dominio catalítico de TAC mediante ingeniería genética. De modo que cuando la fusión es introducida en el citoplasma de las células eucariota por la bacteria el dominio catalítico se une a CaM e inmediatamente cataliza la síntesis de grandes cantidades de AMPc.³⁰ La CyaA, también se ha empleado en el desarrollo de ensayos colorimétricos que permiten determinar la viabilidad celular mediante el sistema de secreción tipo III.⁸⁶

La estructura modular del dominio AC de TAC se compone de dos fragmentos complementarios. Esta característica brinda la posibilidad de estudiar las interacciones proteína-proteína en mutantes de *E. coli* que no expresan adenilato ciclasa (*E. coli*-AC⁻) mediante la fusión por separado de dichos fragmentos a la proteína en estudio. La actividad adenilato ciclasa se encuentra asociada a la complementación de los fragmentos y la síntesis de AMPc. De este modo, es posible detectarla fenotípicamente en mutantes de *E. coli*-AC⁻, que pasan a ser (*E. coli*-AC⁺).²⁷

Por otra parte; la toxina ha sido empleada, con resultados alentadores en la caracterización de proteínas de *E. coli*, involucradas en la división celular,⁸⁷ y en la detección de codones de parada en genes prematuros.⁸⁸

Uso como un posible componente de las vacunas acelulares antipertúsicas

A pesar de que la toxina adenilato ciclasa constituye uno de los principales factores de virulencia para *B. pertussis*, esta no ha sido incluida como un componente en vacunas acelulares de nueva generación.²⁷ En ratones inmunizados con la toxina purificada se ha visto cierto grado de protección contra *B. pertussis*,⁸⁹ debido a que los anticuerpos anti-CyaA neutralizan a la toxina y por tanto estimulan la fagocitosis de la bacteria mediada por los neutrófilos.⁹⁰ Se ha reportado la posibilidad de incluir a la toxina como un nuevo componente de las vacunas contra el agente causal de la tosferina, ya que la inmunización con CyaA inactivada, en combinación con otros componentes de las vacunas acelulares, protege significativamente contra *B. pertussis*.⁹¹ Sin embargo, se encontró como un efecto no deseado, que la toxina bloquea temporalmente a los receptores CR3 e inhibe la fagocitosis dependiente del complemento por neutrófilos,^{64,92} por lo que, la posibilidad de su inclusión como un componentes en las vacunas acelulares se esta estudiando.⁶⁴

CONCLUSIONES

La toxina adenilato ciclasa – hemolisina de *Bordetella pertussis*, constituye uno de sus principales factores de virulencia. La estructura flexible de la toxina la convierten en una importante herramienta para la industria biofarmacéutica y la investigación. A pesar de la elevada respuesta humoral y celular inducida por la forma inactivada de la toxina en modelos animales, su inclusión como un componente adicional en las vacunas acelulares contra *B. pertussis* continúa en discusión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gentile A. Infección por *Bordetella pertussis*. Arch Argent Pediatr 2010;108:78-78.
2. Cotter A, Miller JF. *Bordetella*. In E.A. Groisman (ed.), Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom; 2001. p. 619-674.
3. Celso Pérez-Bolaños, Lourdes Proenza-Alonso, Rafael Fando-Calzada. La vacunación contra pertussis: Estado actual y perspectivas futuras. Revista CENIC Ciencias Biológicas 2012; 43: 29-36.
4. Dotres C, Vega D, Toraño G, Álvarez M, Broche A. Síndrome coqueluchoide y tos ferina. Revista Cubana de Medicina General Integral 2012; 28: 725-734.
5. Murphy TV, Slade BA, Broder KR, Kretsinger K, Tiwari T, Joyce PM, *et al*. Prevention of pertussis, tetanus, and diphtheria among pregnant and postpartum women and their infants recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2008; 57:1-51.
6. Halperin SA. The control of pertussis-2007 and beyond. N Engl J Med 2007; 356:110-113.
7. Moreno S. Consenso para el diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por *Bordetella pertussis*. Salud Publica Mex 2011; 53: 57-65.
8. Fiser R, Masin J, Bumba L, Pospisilova E, Fayolle C, Basler M, *et al*. Calcium Influx Rescues Adenylate Cyclase-Hemolysin from Rapid Cell Membrane Removal and Enables Phagocyte Permeabilization by Toxin Pores PLoS Pathogens 2012; 8: 1-20.
9. Kamanova J, Kofronova O, Masin J, Genth H, Vojtova J, Linhartova I, *et al*. Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling. J Immunol 2008; 181:5587-5597.
10. Wolff J, Cook G. H. Activation of Thyroid Membrane Adenylate Cyclase by Purine Nucleotides. J Biol Chem 1973; 248: 350-355.
11. Hewlett E, Wolf J. Soluble Adenylate Cyclase from the Culture Medium of *Bordetella pertussis*: Purification and Characterization. J. Bacteriol 1976; 127: 890-898.
12. Hanski E, Farfel Z. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. J Biol Chem 1985; 260: 5526-5532.
13. Ladant D, Brezin C, Alonso JM, Crenon J, Guiso N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Purification, characterization, and radioimmunoassay. J Biol Chem 1986; 261: 16264-16269.
14. Rogel A, Schultz E, Brownlie MR, Coote GJ, Parton R, Hanski E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. EMBO Journal. 1989; 8: 2755 – 2760.
15. Osickova A, Masin J, Fayolle C, Krusek J, Basler M, Pospisilova E, *et al*. Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. Molecular Microbiology 2010; 75:1550–1562.
16. Chenal A, Karst CJ, Sotomayor CA, Wozniak KA. Calcium-Induced Folding and Stabilization of the Intrinsically Disordered RTX Domain of the CyaA Toxin. Biophysical Journal 2010; 99: 3744–3753.
17. Espino AR, Gascon LF, Amor TJ, Mongil R, Garcia CF, Torre CC. Bacteremia caused by *Bordetella bronchiseptica* in the course of inflammatory tinea capitis. An Esp Pediatr 1992; 36 (4): 323-325.
18. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 326-382.
19. Guo Q, Shen Y, Zhukovskaya LN, Florian J, Tang Wei-Jen. Structural and Kinetic Analyses of the Interaction of Anthrax Adenylate Cyclase Toxin with Reaction Products cAMP and Pyrophosphate. J Biol Chem 2004; 279: 29427–29435.
20. Morova J, Osicka R, Masin J, Sebo P. RTX cytotoxins recognize $\beta 2$ integrin receptors through N-linked oligosaccharides. PNAS 2008;105: 5355–5360.
21. Blenner A.M, Shur O, Szilvay RG, Cropek MD, Banta S. Calcium-Induced Folding of a Beta Roll Motif Requires C-Terminal Entropic Stabilization. J Mol Biol 2010; 400: 244–256.
22. Linhartova I, Bumba L, Masin J, Basler M, Osicka R, Kamanova J, *et al*. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. FEMS Microbiol Rev 2010; 34: 1076–1112.
23. Eby JC, Ciesla WP, Hamman W, Donato GM, Pickles RJ, Hewlett EL, *et al*. Selective translocation of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells J Biol Chem 2010; 285: 10662–10670.
24. Donato MG, Hsia J, Hung-Lun, Green SC, Hewlett LE. Adenylate Cyclase Toxin (ACT) from *Bordetella hinzii*: Characterization and Differences from ACT of *Bordetella pertussis*. J Bacteriol 2005;187: 7579–7588.
25. Eby C J, Gray CM, Mangan RA, Donato MG, Hewlett LE. Role of CD11b/CD18 in the Process of Intoxication by the Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis*. Infection and Immunity 2012; 80: 850–859.

26. Martín C, Gómez-Bilbao G, Ostolaza H. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Promotes Calcium Entry into Both CD11b⁺ and CD11b⁻ Cells through cAMP-dependent L-type-like Calcium Channels. *J Biol Chem* 2010; 285: 357–364.
27. Karst CJ, Sotomayor CA, Guijarro IJ, Raynal B, Chenal A, Ladant D. Calmodulin-Induced Conformational and Hydrodynamic Changes in the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *Biochemistry* 2010; 49: 318–328.
28. Karst CJ, Barker R, Devi U, Swann JM, Davi M, J. Roser JS, et al. Identification of a Region That Assists Membrane Insertion and Translocation of the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* CyaA Toxin. *J Biol Chem* 2012; 28: 9200–9212.
29. Bauche C, Chenal A, Knapp O, Bodenreider C, Benz R, Chaffotte A, et al. Structural and Functional Characterization of an Essential RTX Subdomain of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *J Biol Chem* 2006; 281:16914–16926.
30. Ladant D, Ullmann A. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* 1999; 7:172-176.
31. Chenal A, J. Guijarro IJ, Delepierre BR, Ladant D. RTX Calcium-Binding Motifs are Intrinsically Disordered in the Absence of Calcium: Implication for Protein Secretion. *J Biol Chem* 2009; 284:1781–1789.
32. Laoide MB, Ullmann A. Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* cyaABDE operon. *EMBO J* 1990; 9: 999–1005.
33. Hadas S, Spira M, Hanisch Uwe-Karsten, Reichert F, Rotshenker S. Complement receptor-3 negatively regulates the phagocytosis of degenerated myelin through tyrosine kinase Syk and cofilin. *Journal of Neuroinflammation* 2012; 9:1-10.
34. Dupuy GA, Caron E. Integrin-dependent phagocytosis – spreading from microadhesion to new concepts. *Journal of Cell Science* 2008; 121: 1773-1783.
35. Barreiro O, Sánchez-Madrid F. Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62: 552-562.
36. Orrskog S, Rounioja S, Spadafina T, Gallotta M, Norman M, Hentrich K, et al. Pilus Adhesin RrgA Interacts with Complement Receptor-3, Thereby Affecting Macrophage Function and Systemic Pneumococcal Disease. *MBio* 2013; 4:1-13.
37. Dai S, Rajaram MV, Curry HM, Leander R, Schlesinger LS. Fine Tuning Inflammation at the Front Door: Macrophage Complement Receptor 3-mediates Phagocytosis and Immune Suppression for *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog* 2013; 9:1-17.
38. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 431- 444.
39. Hynes RO. Integrins: birectional, allosteric signalling machines. *Cell* 2002;110: 673- 687.
40. Rose DM, Alon R, Ginsberg, MH. Integrin modulation and signalling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 2007; 218: 126-134.
41. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 269-280.
42. Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* 2012; 135: 268-275.
43. Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 2011; 23: 607-614.
44. Xue ZH, Zhao CQ, Chua GL, Tan SW, Tang XY, Wong SC, et al. Integrin $\alpha M\beta 2$ Clustering Triggers Phosphorylation and Activation of Protein Kinase C δ that Regulates Transcription Factor Foxp1 Expression in Monocytes. *Journal of Immunology* 2010; 184:1-14.
45. Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 321-345.
46. Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R. The tail of integrins, talin and kindlins. *Science* 2009; 324: 895-899.
47. Reed JH, Jain M, Lee K, Kandimalla ER, Faridi MH, Buyon JP, et al. Complement Receptor 3 Influences Toll-like Receptor 7/8 Dependent Inflammation: Implications for Autoimmune Diseases Characterized by Antibody Reactivity to Ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 2013; 288:9077- 9083.
48. Basler M, Knapp O, Masin J, Fiser R, Maier E, Benz R, et al. Segments Crucial for Membrane Translocation and Pore-forming Activity of *Bordetella* Adenylate Cyclase *J Biol Chem* 2007; 282(17):12419-12429.
49. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP. *Mol Microbiol* 2006; 59: 447–459.
50. Basler M, Masin J, Osicka R, Sebo P. Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* 2006; 74: 2207–2214.
51. Fiser R, Masin J, Basler M, Krusek J, Spuláková V, Konopásek I, Sebo P, et al. Third activity of *Bordetella adenylate cyclase* (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes

- calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 2007; 282: 2808–2820.
52. Vojtova J, Kofronova O, Sebo P, Benada O. *Bordetella* adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes. *Microsc Res Tech* 2006; 69:119–129.
 53. Ohnishi H, Miyake M, Kamitani S, Horiguchi Y. The morphological changes in cultured cells caused by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 279:174–179.
 54. Johansson D, Bergström P, Henriksson R, Grankvist K, Johansson A, Behnam-Motlagh P, *et al.* Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* enhances cisplatin-induced apoptosis to lung cancer cells *in vitro*. *Oncol Res* 2006;15: 423–430.
 55. Cheung GY, Kelly SM, Jess TJ, Prior S, Price NC, Parton R, *et al.* Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 2009; 46: 36–42.
 56. Confer D, Eaton J. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 1982; 217: 948–950.
 57. Goodwin MS, Weiss AA. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun* 1990; 58: 3445–3447.
 58. Gross MK, Au DC, Smith AL, Storm DR. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4898 – 4902.
 59. Khelef N, Sakamoto H, Guiso N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* 1992; 12: 227–235.
 60. Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, Guiso N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun* 1998; 66:1718– 1725.
 61. Khelef N, Guiso N. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* 1995;134: 27–32.
 62. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 1993; 61:4064–4071.
 63. Mobberley-Schuman PS, Weiss AA. Influence of CR3 (CD11b/CD18) expression on phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73: 7317–7323.
 64. Carbonetti N. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiology* 2010; 5: 455-469.
 65. Veal-Carr WL, Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation *in vivo* in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* 2005; 55:788–798.
 66. Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KH. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol* 2005;175: 730–738.
 67. Skinner JA, Reissinger A, Shen H, Yuk MH. *Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. *J Immunol* 2004; 173: 1934–1940.
 68. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH, Boyd AP. 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* 2004; 72: 1568–1579.
 69. Spensieri F, Fedele G, Fazio C, Nasso M, Stefanelli P, Mastrantonio P, *et al.* *Bordetella pertussis* inhibition of interleukin-12 (IL-12) p70 in human monocyte-derived dendritic cells blocks IL-12 p35 through adenylate cyclase toxin-independent cyclic AMP induction. *Infect Immun* 2006; 74: 2831–2838.
 70. HamzaT, Barnett, JB, Li B. Interleukin-12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications Int. *J. Mol. Sci* 2010; 11: 789-806.
 71. Hickey FB, Brereton CF, Mills KH. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2008; 84:234–243.
 72. Paccani SR, Dal Molin F, Benagiano M, Ladant D, D'Elis MM, Montecucco C, *et al.* Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2008; 76: 2822– 2832.
 73. Schlecht G, Loucka J, Najjar H, Sebo P, Leclerc C. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes and *in vivo* Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 2004; 173: 6089–6097.
 74. Simsova M, Sebo P, Leclerc C. The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* – a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 571–576.
 75. Fayolle C, Bauche C, Ladant D, Leclerc C. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase delivers chemically coupled CD8⁺ T-cell epitopes to dendritic cells and elicits CTL *in vivo*. *Vaccine* 2004; 23: 604–614.

76. Mascarell L, Bauche C, Fayolle C, Diop OM, Dupuy M, Nougarede N, *et al.* Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates. *Vaccine* 2006; 24: 3490–3499.
77. Mascarell L, Fayolle C, Bauche C, Ladant D, Leclerc C. 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* 2005; 79: 9872–9884.
78. Tartz S, Rüssmann H, Kamanova J, Sebo P, Sturm A, Heussler V, *et al.* Complete protection against *P. berghei* malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing *Salmonella* type III secretion system and *Bordetella* adenylate cyclase toxoid. *Vaccine* 2008; 26: 5935–5943.
79. Connell TG, Shey MS, Seldon R, Rangaka MX, van Cutsem G, Simsova M, *et al.* 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* 2007; 14: 847–854.
80. Wilkinson KA, Simsova M, Schölvinck E, Sebo P, Leclerc C, Vordermeier HM, *et al.* Efficient ex vivo stimulation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase antigen toxoids. *Infect Immun* 2005; 73: 2991–2998.
81. Dautin N, Karimova G, Ladant D. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a versatile screening tool. *Toxicon* 2002; 40: 1383–1387.
82. Geddes K, Worley M, Niemann G, Heffron F. Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2005; 73: 6260–6271.
83. Gendlina I, Held KG, Bartra SS, Gallis BM, Doneanu CE, Goodlett DR, *et al.* Identification and type III-dependent secretion of the *Yersinia pestis* insecticidal-like proteins. *Mol Microbiol* 2007; 64:1214–1227.
84. Furutani A, Takaoka M, Sanada H, Noguchi Y, Oku T, Tsuno K, *et al.* Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 2009; 22: 96–106.
85. Lee, C.A. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells. *Trends Microbiol.*1997; 5: 148–156.
86. Miyake M, Sakane S, Kobayashi C, Hanajima-Ozawa M, Fukui A, Kamitani S, *et al.* A colorimetric assay for studying effector secretion through the bacterial type III secretion system. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 278: 36–42.
87. Karimova G, Robichon C, Ladant D. Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery. *J Bacteriol* 2009; 191: 333–346.
88. Real SM, Marzese DM, Gomez LC, Mayorga LS, Roque M. Development of a premature stop codon-detection method based on a bacterial two-hybrid system. *BMC Biotechnol* 2006; 6(38):1-12.
89. Guiso N, Szatanik M, Rocancourt M. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microb Pathog* 1991; 11: 423–431.
90. Weingart CL, Mobberley-Schuman PS, Hewlett EL, Gray MC, Weiss AA. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* 2000; 68: 7152–7155.
91. Cheung GY, Xing D, Prior S, Corbel MJ, Parton R, Coote JG. 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* 2006; 74: 6797–6805.
92. Prior S, Fleck RA, Gillett ML, Rigsby PR, Corbel MJ, Stacey GN, *et al.* Evaluation of adenyl cyclase toxin constructs from *Bordetella pertussis* as candidate vaccine components in an in vitro model of complement-dependent intraphagocytic killing. *Vaccine* 2006; 24: 4794–4803.