

**PŘÍRODOVĚCKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

# **Úloha signalizace cAMP v migraci fagocytů**

Klára Dáňová

Školitel: Jana Kamanová, Ph.D.

Prostředky vynaložené na tuto práci byly hrazeny z Výzkumného záměru AV0Z50200510, a grantů IAA500200914 z Grantové agentury AV ČR, GA310/08/0447 z Grantové agentury České republiky, a 1M0506 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Praze, 27. 4. 2010

Děkuji především své školitelce Janě Kamanové, Ph.D. za trpělivé vedení, veškeré rady a ochotnou pomoc, kterou mi při sepisování mé bakalářské práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Peteru Šebovi za to, že mi umožnil u něj v laboratoři mou práci vypracovat. A nakonec svým rodičům, kteří za mnou stojí a podporují mě.

## Souhrn

Migrace buněk sehrává klíčovou úlohu v mnoha biologických procesech. Velmi důležitá je migrace fagocytických buněk imunitního systému, která slouží pro přesun těchto buněk do místa zánětu nebo do lymfatických uzlin, a tím umožňuje zahájení vrozené i adaptivní imunitní odpovědi. Komplexní systém signálních drah, jež migraci řídí, zahrnuje mnoho proteinů, které jsou nezřídka pod kontrolou adenosin-3',5'-cyklického monofosfátu (cAMP) a jeho dvou efektorů, protein kinázy A (PKA) a proteinu Epac. Mezi proteiny, které jsou aktivovány proteinem Epac a řídí migraci fagocytů, patří malá GTPáza Rap, jež dále aktivuje proteiny RAPL a RIAM. Z širokého repertoáru proteinů, jejichž aktivitu ovlivňuje PKA a zároveň se podílejí na signalizaci v procesu migrace, jsou to zejména aktin, integriny, malé GTPázy Rho, Rac a Cdc42 a protein VASP. Významným faktorem, který má na signalizaci cAMP vliv, je časová regulace působení cAMP. Tato práce je tedy kromě obecných mechanismů signalizace a migrace zaměřena také na to, jak změna hladiny cytozolického cAMP v čase ovlivňuje PKA a protein Epac a jak se tyto změny následně projeví v aktivitě dalších proteinů a pohybu buňky.

**Klíčová slova:** migrace fagocytických buněk, adenosin-3',5'-cyklický monofosfát (cAMP), protein kináza A (PKA), protein Epac

## Summary

Cell migration plays a key role in a wide diversity of biological processes. Migration enables phagocytic cells to localize into the site of inflammation and to lymph nodes, thereby leading to initiation of innate and adaptive immune responses, respectively. The signal transduction that coordinates phagocyte migration consist of diverse signaling proteins, being often under control of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and its two effectors, protein kinase A (PKA) and Epac (exchange protein activated by cAMP). Small GTPase Rap is activated by Epac and controls phagocyte migration via activation of RAPL and RIAM proteins. On the other hand, PKA regulates cell migration via modulation of activity of other proteins, which comprise actin, integrins, small GTPases Rho, Rac, Cdc42 as well as protein VASP. A prominent feature of cAMP signalization is its spatio-temporal organization. Therefore, besides description of cAMP-regulated signaling cascades in cell migration, this bachelor thesis also depicts how changes of activity of cAMP effectors in time and place are involved in regulation of cell movement.

**Key words:** migration of phagocytes, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), protein Epac (exchange protein activated by cAMP)

# Obsah

1. Seznam použitých zkratek .....	6
2. Úvod .....	8
3. Význam migrace fagocytů.....	9
3.1. Makrofágy a neutrofilů .....	9
3.2. Dendritické buňky .....	10
4. Migrace buněk a signální dráhy, které ji ovlivňují.....	12
5. Adenosin-3',5'-cyklický monofosfát (cAMP) .....	16
5.1. Regulace hladiny cAMP v buněčném cytozolu.....	16
5.2. Proteiny zprostředkovávající signalizaci cAMP .....	17
5.2.1. Protein kináza A (PKA).....	17
5.2.2. Protein Epac.....	18
5.3. Signalizace cAMP v buněčné migraci.....	19
5.3.1. Role PKA v buněčné adhezii a migraci.....	19
5.3.2. Proteiny účastnící se buněčné migrace a jejich regulace PKA.....	20
5.3.3. Role proteinu Epac v buněčné migraci a adhezii.....	24
5.3.4. Proteiny účastnící se buněčné migrace a jejich regulace proteinem Epac .....	25
6. Signalizace cAMP prostaglandinu E2 a její vliv na buněčnou migraci .....	27
7. Bakteriální toxiny zvyšující cytozolickou hladinu cAMP a ovlivnění buněčné migrace	30
7.1. Edema faktor <i>Bacillus anthracis</i> .....	30
7.2. Adenylát cyklázový toxin <i>Bordetella pertussis</i> .....	32
7.3. Další toxiny ovlivňující hladinu cytozolického cAMP .....	34
8. Diskuze .....	35
9. Závěr.....	36
10. Použitá literatura.....	37

## 1. Seznam použitých zkratek

AC	adenylát cykláza
AK	aminokyselina
AKAP	protein ukotvující protein kinázu A (z angl. A kinase anchoring protein)
AKT (PKB)	protein kináza B
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BMDM	makrofág odvozený z kostní dřeně (z angl. bone marrow-derived macrophage)
cADPR	cyklická adenosin difosfát ribóza
CaM	kalmodulin
CamK	kináza aktivovaná kalmodulinem
cAMP	adenosin-3',5'-cyklický monofosfát
COX	cyklooxygenáza
CPM	cytoplazmatická membrána
CR	komplementový receptor
CREB	cAMP-dependentní vazebný protein (z angl. cAMP response element-binding)
CyaA	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
DC	dendritická buňka
ECM	extracelulární matrix
ET	edema toxin <i>B. anthracis</i>
FcγR	receptor pro Fc oblast imunoglobulinů
GAP	protein urychlující GTPázovou aktivitu (z angl. GTPase-activating protein)
GDP	guanosin-5'-difosfát
GEF	faktor vyměňující GDP za GTP (z angl. guanosine exchange factor)
GM-CSF	faktor stimulující diferenciaci granulocytů a makrofágů (z angl. granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)
GPCR	receptor spojený s G proteinem (z angl. G protein-coupled receptor)
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HEV	endoteliální venuly (z angl. high endothelial veins)
Hly doména	hemolysinová doména
HSP	z angl. heat shock protein
IFN	interferon

Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JNK	Jun N-terminální kináza
LT	letální toxin <i>B. anthracis</i>
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza (z angl. mitogen-activated protein kinase)
MAPKK	kináza MAPK (z angl. mitogen-activated protein kinase kinase)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
MLC	lehký řetězec myosinu (z angl. myosin light chain)
MLCK	kináza lehkého řetězce myosinu (z angl. myosin light chain kinase)
MLCP	fosfatáza lehkého řetězce myosinu (z angl. myosin light chain phosphatase)
MoDC	dedritická buňka odvozená z monocytu (z an. monocyte-derived dendritic cell)
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NF- κB	jaderný faktor κB (z angl. nuclear factor- κB)
PA	protektivní antigen <i>B. anthracis</i>
PBDC	dendritická buňka z periferní krve (z angl. peripheral blood dendritic cell)
PDE	fosfodiesteráza
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLC	fosfolipáza C
cGMP	guanosin-3',5'-cyklický monofosfát
Pyk2	z angl. proline-rich tyrosine kinase 2
RhoGDI	z angl. Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor
RNI	reaktivní dusíkové intermediáty
ROI	reaktivní kyslíkové intermediáty
RTX	označení skupiny cytotoxinů (z angl. repeat-in-toxin)
Th	pomocný T-lymfocyt (z angl. helper T-cell)
TNF	faktor nekrotizující nádory (z angl. tumor necrosis factor)
Tr	regulační T-lymfocyt (z angl. regulatory T-cell)
VASP	z angl. vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)



## 2. Úvod

Pohyb buněk je komplexní proces, který nás provází celým životem. Během vývoje plodu řídí stavbu těla. V dospělosti je migrace základem pro děje udržující homeostázu organismu, imunitní reakce a uzdravení poškozených tkání. Selhání migrační schopnosti nebo nesprávný pohyb buněk může vést k závažným problémům. Porozumění základním mechanismům buněčné migrace by mohlo přinést nový směr do možností transplantací, léčby nádorů nebo přípravy buněčných vakcín. Díky tomu, že adenosin-3',5'-cyklický monofosfát (cAMP) sehrává ústřední úlohu právě v oněch základních mechanismech migrace a adheze leukocytů, se samotný cAMP a jím řízené signální dráhy nabízejí jako vhodné potenciální cíle pro výzkum, který by umožnil vytvoření úspěšných terapeutických přístupů.

V laboratoři Dr. Petera Šeba, kde jsem svoji práci vypracovala, je studován adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertusis*. Tento toxin díky svojí adenylát cyklázové aktivitě zvyšuje hladinu cAMP v buňce. Jeho cílem jsou především fagocytické buňky imunitního systému (neutrofilů, monocytů a jejich tkáňová forma makrofágy) a také dendritické buňky. cAMP, které v buňkách účinkem adenylát cyklázového toxinu vzniká, má za následek omezení antibakteriálních funkcí a také změnu migrační schopnosti těchto buněk.

Cílem mé práce je popsání úlohy cAMP v signálních drahách řídících migraci fagocytických buněk imunitního systému s detailním zaměřením na účinky jeho dvou efektorů, proteinu kinázy A (PKA) a proteinu Epac. Prostaglandin E2 a vybrané bakteriální toxiny jsem zařadila z důvodu, že se jedná o látky, které hladinu cAMP v buňce ovlivňují, a nabízejí tak příležitost sledovat, jakou roli sehrává cAMP v signálních drahách migrace buněk.

Práci jsem strukturovala do pěti částí. První shrnuje migraci a funkce fagocytických buněk v imunitním systému. Druhá popisuje obecné mechanismy a signální dráhy řídící migraci fagocytů. Třetí část je věnována cAMP a podrobnějšímu zmapování jeho signalizace prostřednictvím PKA a proteinu Epac v migraci. Čtvrtá část se zabývá vlivem prostaglandinu E2 na hladinu cytozolického cAMP a následně na migraci. A poslední pátá část se zabývá otázkou, jak bakteriální toxiny, které ovlivňují hladinu cytozolického cAMP, mění migraci fagocytů.

### 3. Význam migrace fagocytů

Profesionální fagocyty jsou buňky vyšších organismů, které zabezpečují obranyschopnost mechanismem fagocytózy. Patří mezi ně zejména neutrofilny a monocyty a jejich tkáňová forma – makrofágy. Zvláštním typem fagocytujících buněk jsou buňky dendritické, které hrají hlavní úlohu ve zpracování a prezentaci antigenu. Migrace fagocytických buněk je klíčová pro správnou funkci vrozené i adaptivní imunity.

#### 3.1. Makrofágy a neutrofilny

Makrofágy a neutrofilny jsou hlavní součástí vrozeného imunitního systému, jejich úkolem je rozpoznat, pohlit a degradovat patogenní částice, které proniknou do těla.

Jako profesionální fagocytické buňky se vyznačují schopností produkovat sadu fagocytických receptorů, které jim umožňují rozeznat, vázat a zahájit pohlcení patogenní částice nebo apoptotické buňky. Fagocytické receptory můžeme rozdělit na ty, které rozeznávají opsonizované částice – Fc $\gamma$  receptory (Fc $\gamma$ R) – rozeznávají částice s navázanou IgG protilátkou, nebo komplementové receptory (CR1, CR3 a CR4) – rozeznávají částice s navázaným komplementem, a na ty, které rozeznávají motivy přímo na povrchu mikroorganismů – např. manóзовé receptory (rozeznávají D-manózu), scavengerové receptory typu A (rozeznávají polyanionické struktury např. kyseliny teichoové na mikroorganismech a negativně nabitě fosfolipidy na apoptotických buňkách). Pohlcená částice je zpracována v degradační endocytické dráze končící fagolysozómem. Během této dráhy jsou mikroorganismy zneškodněny produkcí reaktivních kyslíkových intermediátů (ROI), reaktivních dusíkových intermediátů (RNI) a pomocí fagolysozomálních enzymů (Celli and Finlay, 2002; Serbina *et al.*, 2008).

Menší počet klidových fagocytů, především makrofágů, zaujímá strategicky výhodnou polohu pod povrchem sliznic a v tkáních. Při napadení tkáně mikroorganismy do místa zánětu pronikají i další neutrofilny a monocyty, které běžně cirkulují v krvi, kam jsou vyplavovány z kostní dřeně. Samy pak následně lákají další buňky imunitního systému sekrecí chemokinů a následnou sekrecí cytokinů mají dále možnost aktivitu těchto buněk regulovat (Serbina *et al.*, 2008).

Monocyty odpovídají na mikrobiální stimuly také expresí receptoru CCR2, který je důležitý pro pohyb ve směru chemického gradientu – vytvořeného chemotaktickým proteinem CCL2 (MCP-1) (Tangirala *et al.*, 1997). Hlavní chemokinové receptory neutrofilů jsou CXCR1 a CXCR2, které odpovídají na gradient interleukinu 8 (IL-8 neboli CXCL8) (Murphy and Tiffany,

1991). Migrace indukovaná chemokiny zahrnuje adhezi cirkulujících leukocytů k endotelu, polarizaci ve směru zdroje chemokinu a prostoupení leukocytů přes endoteliální buňky cév do tkání (diapedéza/extravazace). Extravazace leukocytů z krve je klíčový proces pro potlačení zánětu, a musí proto být přísně regulována. Nadměrná leukocytární extravazace doprovází chronicky zánětlivá onemocnění, jako revmatoidní artritidu, astma nebo aterosklerózu (Springer, 1994). Naopak ztráta schopnosti pohybu fagocytů by vedla k omezení jejich zásadní funkce v imunitním systému – obraně před bakteriálními, protozoálními a houbovými patogeny.

### **3.2. Dendritické buňky**

Dendritické buňky (DC) jsou profesionální antigen prezentující buňky schopné transportovat antigen do sekundárních lymfatických orgánů, kde stimulují naivní T-buňky. Z takto aktivovaných T-buněk se stávají efektorové T-buňky, které napomáhají potlačení infekce. Schopnost migrace je tedy důležitou vlastností dendritických buněk pro iniciaci a udržení imunitní odpovědi zprostředkované T-buňkami (Banchereau and Steinman, 1998).

Progenitory dendritických buněk pocházejí z kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Mohou se diferencovat v cirkulující prekurzory, které se později usídlí v periferních tkáních jako nezralé myeloidní DC, nebo v plazmocytoidní DC, které vstupují přímo do lymfatických uzlin přes endoteliální venuly HEV (z angl. high endothelial veins) (Colonna *et al.*, 2004).

Nezralé myeloidní DC zůstávají v kůži, orgánech a sliznicích dýchacího a trávicího traktu, kde receptorem zprostředkovanou endocytózou, fagocytózou a pinocytózou pohlcují vzorky antigenů z okolního prostředí. V tomto stavu vykazují malou schopnost stimulovat T-buňky. Pokud ale rozpoznají podnět představující nebezpečí (poškození tkáně, pro-zánětlivé cytokiny nebo patogeny), je u nich odstartován proces maturace (Banchereau and Steinman, 1998). Během maturace DC podstupují jak fenotypové, tak funkční změny – ztrácí schopnost endocytózy, dochází k zvýšení počtu molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z anglického major histocompatibility complex) a kostimulačních molekul na jejich povrchu (Gagliardi *et al.*, 2000). DC navíc sekretují množství pro-zánětlivých cytokinů, jako TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), a IL-6 a stejně tak chemokinů (např. CCL3 (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  /MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) a CCL5 (RANTES)). Tyto molekuly poté lákají další nezralé DC a monocyty do postižené tkáně (Sallusto *et al.*, 1999). Velmi důležité ale je, že DC také získávají schopnost migrovat z periferní tkáně do lymfatických uzlin. Tato jejich schopnost je zásadní pro zahájení imunitní odpovědi, a je tedy regulována

mnoha mechanismy. Migrující leukocyty produkují adhezivní molekuly: selektiny a integriny, pro interakci s endotelem, a chemokinové receptory, které slouží jako senzory chemického gradientu (Sallusto *et al.*, 1998). Receptory CCR1, CCR2, CCR5 a CXCR1 jsou exprimovány na nezralých DC, rozpoznávají pro-zánětlivé cytokiny a jsou klíčové pro lokalizaci nezralých DC do místa zánětu. Během maturace DC ztrácí schopnost být aktivovány přes ligandy těchto receptorů (snížený výskyt receptorů na jejich povrchu nebo desenzitizace receptorů). Na druhou stranu zralé DC zvyšují množství CXCR4 a CCR7 receptorů, a tím získávají možnost rozpoznávat chemokiny CCL21 (secondary lymphoid tissue chemokine [SCL]6CKine) a CCL19 (EBI1 ligand chemokine/MIP-3β), které jsou produkovány právě buňkami v lymfatických cévách a v T-buněčné oblasti lymfatických uzlin (Cyster, 1999). Přítomnost funkčního CCR7 je obzvláště důležitá, jak bylo dokázáno u myši postrádající CCR7. DC těchto myši zcela ztratily schopnost migrace do lymfatických uzlin, což bylo doprovázeno defektem v indukci adaptivní imunitní odpovědi (Forster *et al.*, 1999).

Tab. 1: Chemokinové receptory a jejich ligandy.

<b>Buňka</b>	<b>Receptor</b>	<b>Ligand</b>
MF, N, nDC <sup>1</sup>	CCR1	CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES)
MF, nDC	CCR2	CCL2 (MCP-1)
MF, nDC	CCR5	CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES)
DC, MF	CCR7	CCL19 (MIP-3β), CCL21 ([SCL]6CKine)
N, nDC	CXCR1	IL-8
N	CXCR2	IL-8
MF, zDC <sup>2</sup>	CXCR4	CXCL12 (SDF-1)

<sup>1</sup> MF, makrofágy; N, neutrofilly; nDC, nezralé dendritické buňky

<sup>2</sup> zDC, zralé dendritické buňky

## 4. Migrace buněk a signální dráhy, které ji ovlivňují

Obecně je pohyb buněk opakující se proces založený na vyváženém vzniku výběžků (lamelipodií, filopodií či protruzí) na vedoucí straně buňky, posunu buňky a uvolnění lamelipodií od podkladu na zadní straně buňky. Tento proces zahrnuje čtyři následující kroky – vytvoření lamelipodií, přilnutí k extracelulární matrix (ECM), posun buňky a retrakce), jak je ukázáno v obr. 1 (Howe, 2004).

Při pohybu buňky jednoduše řečeno dochází k organizaci její přední a zadní části. Oba konce buňky se liší signálními drahami, které v nich probíhají. Polarizace je udržována více mechanismy, které se vzájemně překrývají. Účastní se jich fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K), mikrotubuly, rodina Rho GTPáz, integriny a vezikulární transport.

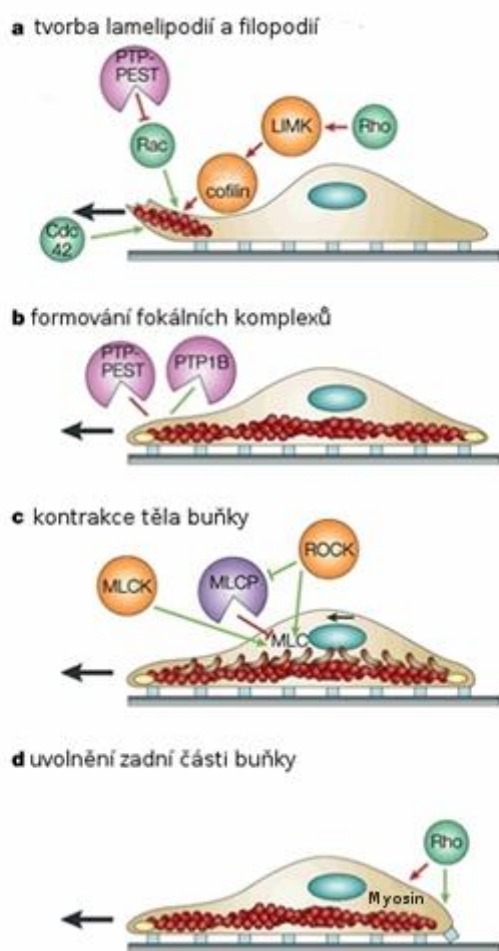
Tvorba protruzí je poháněna polymerací aktinu pod cytoplazmatickou membránou (CPM). Ve filopodiích dochází k prodlužování rychle rostoucích konců aktinových vláken (tzv. „barbed end“) a k uvolňování aktinových monomerů na straně druhé (tzv. „pointed end“). Předpokládá se, že prodlužování vláken indukované komplexem Arp2/3 spíše než jejich větvení je základem pro vznik filopodií. To zajišťuje např. protein VASP nebo fascin. V lamelipodiích je naopak větvení aktinových vláken pomocí komplexu Arp2/3 podpořeno, a tak vzniká rozsáhlá aktinová síť pod CPM. Aktivaci komplexu Arp2/3 navozují např. malé GTPázy Cdc42 a Rac. Míra a organizace aktinové polymerace je řízena mnoha proteiny, které jsou schopné vazby právě na aktin, jako jsou profilin a cofilin.

Protruze jsou následně stabilizovány interakcí buněčných transmembránových proteinů – integrinů. Integriny adherují k molekulám extracelulární matrix (ECM) nebo k povrchu jiné buňky (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Cytoplazmatické části integrinů zatím zachycují aktinová vlákna, až dojde k vytvoření pevného kotvícího systému, který umožní posun buňky tím, že vnitřní kontrakce přitáhne zadní část buňky. Adheze je tedy neoddělitelnou součástí buněčné migrace. Obecně by se dalo říci, že interakce mezi aktinovým cytoskeletem a integriny adhezi řídí. Pevná vazba integrinů a kortikálního aktinu omezuje integrinovou adhezi, dokud není obdržen potřebný signál, který vazbu zruší. Integriny mohou dále formovat nové shluky a vazby integrin-aktin, které spouští signalizaci – především fosforylaci proteinů a aktivaci malých GTPáz (Huttenlocher *et al.*, 1996; Worthylake and Burridge, 2003).

Z mechanismu pohybu buněk vyplývá, že podstatná je především časová a prostorová regulace adheze. K aktivaci adheze (shlukování integrinů a jejich signalizace) musí docházet na jedné straně, k uvolnění vazby (založené na uvolnění ligandu a receptoru nebo na disociaci

vazby integrinu a vnitřního cytoskeletu buňky) na opačné. Leukocyty vytvářejí mnoho malých integrinových shluků (tzv. fokálních komplexů), které jim umožňují rychlý pohyb. Vznik těchto shluků je závislý na proteinech Cdc42 a Rac.

Samotný pohyb buňky zajišťuje vzájemný posun myosinu II a aktinu. Napětí, které během tohoto děje vzniká, by mohlo být dostatečné pro otevření vápníkových kanálů. Vápník by následně mohl aktivovat kalpain. Tato proteáza přispívá k rozpadu fokálních adhezí tak, že štěpí proteiny v nich zapojené, např. talin, jež se účastní spojení integrinů s vnitřním cytoskeletem buňky. Uvolnění adheze na zadní části buňky usnadňuje tvorbu protruzí na vedoucí části. Mechanismus zpětné vazby tedy podporuje buněčnou migraci.



Obr. 1: Schéma pohybu buňky a zapojení řídicích proteinů v jednotlivých krocích pohybu. (a) Aktinová polymerace pohání vznik protruzí na vedoucí straně buňky. Během této polymerace Rac indukuje a Cdc42 stimuluje tvorbu filopodií. Účinek Rac a Cdc42 je rušen protein tyrosin fosfatázou PEST. Cofilin může být fosforylován LIM kinázou, aktivovanou přes Rho protein, což omezuje polymeraci aktinu. (b) Vznik nových propojení mezi aktinovými vlákny a pevnými ukotvení lamelipodií na vedoucí straně buňky k povrchu, po kterém se buňka pohybuje. Regulace fokálních komplexů je zprostředkována pomocí fosfatáz PTP-PEST (omezení migrace) a PTP1B (podpora migrace). (c) Kontrakce zadní části buňky vyvolaná interakcí aktinu s myosinem. MLC fosfatáza defosforyluje myosin a inhibuje migraci, MLC kináza naopak fosforylací migraci podporuje. Rho kináza (ROCK) fosforyluje MLCK a inhibuje její aktivitu. (d) Rho podporuje posun zadní části buňky fosforylací myosinu navázaného na aktin, což vede k uvolnění zadní části buňky. Převzato a upraveno z Larsen *et al.*, 2003.

Směr pohybu buněk může být řízen chemotaktickými látkami, které buňky buď lákají, poté se jedná o chemoatraktanty, nebo odpuzují, což jsou chemorepelenty. Gradient těchto látek buňky rozeznávají pomocí receptorů na svém povrchu. Např. chemokiny řídí pohyb DC z periferních tkání do lymfatických uzlin. Jedním z důležitých receptorů, který tyto chemokiny váže, a následně spouští signální dráhy ovlivňující migraci buněk, je chemokinový receptor CCR7.

Jak již bylo napsáno výše, CCR7 je receptorem zralých DC (viz Tab. 1). Některé studie však ukazují jeho roli i v migraci nezralých DC. Přesun těchto nezralých DC do lymfatických uzlin, avšak bez přítomnosti jakéhokoli signálu nebezpečí, následně přispívá k udržení periferní tolerance k vlastním tkáním. Zralým dendritickým buňkám migrace řízená receptorem CCR7 umožňuje přesun do lymfatických uzlin a vyvolání specifické imunitní odpovědi na daný antigen. Kromě toho signalizace receptoru CCR7 ovlivňuje architekturu cytoskeletu, míru endocytózy, migrační rychlost a má vliv na přežívání DC (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006).

CCR7 je chemokinový receptor. Pro jeho aktivaci je tedy potřebná vazba chemokinů, zde konkrétně CCL19 a CCL21. Chemokinové receptory obecně jsou receptory sedmkrát procházející membránou spojené s G proteiny (GPCR). Vazba ligandu na GPCR vyvolává výměnu GDP na  $\alpha$ -podjednotce G proteinu za GTP a její disociaci od komplexu  $\beta\gamma$ . Známé jsou čtyři rodiny  $\alpha$ -podjednotek:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  a  $G\alpha_{12}$ . Migrace se zdá být primárně řízena  $G\alpha_i$ , bez významu ale není ani signalizace zprostředkovaná  $G\alpha_q$  a  $G\alpha_{12}$  (Randolph *et al.*, 2008).

Signalizaci zprostředkovanou receptorem CCR7 lze rozdělit do tří modulů, z nichž jsou minimálně dva vzájemně se nepřekrývající. Tyto moduly řídí chemotaxi (směřovaný pohyb do určité oblasti), migrační rychlost (rychlost buněk ovlivněných chemokinem vztažená k základní rychlosti náhodného pohybu buněk) nebo aktivaci buněk. To, jaká dráha bude zahájena, tedy která z  $\alpha$ -podjednotek G proteinů navázaných na receptor bude aktivována, závisí pravděpodobně na chemokinu, jaký se na receptor naváže a jakou konformační změnu vyvolá, jak je uvedeno v obr. 2 (Randolph *et al.*, 2008; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006).

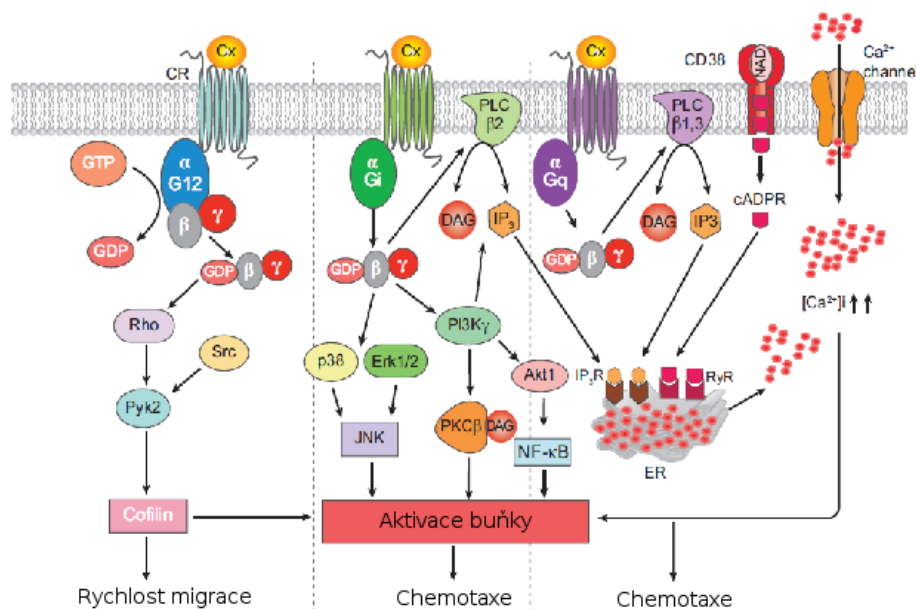
První modul je zahájen aktivací podjednotky  $G\alpha_{12}$ , uvolněná  $\beta\gamma$  podjednotka řídí aktivitu efektorů Rho GTPáz, Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) a cofilinu. Tento modul ovlivňuje migrační rychlost (Randolph *et al.*, 2008).

Druhý modul spustí signalizaci při stimulaci  $G\alpha_i$  podjednotky a vede k aktivaci MAP kináz (p38, Erk1/2 a Jun N-terminální kinázu (JNK)). Volná podjednotka  $\beta\gamma$  aktivuje fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K), protein kinázu C (PKC) a dráhu AKT/NF- $\kappa$ B, která je důležitá pro aktivaci a přežití buňky. (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006). Chemotaxe je ale nezávislá

na této dráze, neboť migrace nebyla ovlivněna použitím inhibitorů PI3K (wortmannin a Ly294002) (Scandella *et al.*, 2004). Fosfolipáza C (PLC $\beta$ 2) produkcí inositoltrifosfátu (IP3) zajišťuje uvolnění zásob Ca<sup>2+</sup> z endoplazmatického retikula (Randolph *et al.*, 2008). Tato pozorování jsou ve shodě s výzkumem Scandella *et al.*, ve kterém se uvádí, že migrace DC je na aktivaci PLC a přítomnosti Ca<sup>2+</sup> iontů úzce závislá. Podle jejich návrhu by Ca<sup>2+</sup> ionty mohly aktivovat Ca<sup>2+</sup>/kaldmodulin dependentní kinázu (CaMK), vzhledem k tomu, že inaktivace této kinázy staurosporinem vyvolala redukci migrace DC k CCL19 a CCL21 (Scandella *et al.*, 2004). Tento modul reguluje chemotaxi ve většině buněk.

Třetí modul se zdá být vyžadován pro chemotaxi prostřednictvím CCR7, zahájen je aktivací podjednotek G $\alpha_i$  a G $\alpha_q$ . G $\alpha_q$  nebo komplex  $\beta\gamma$  aktivuje PLC $\beta$ 1,3, která opět přes produkci IP3 uvolňuje vnitrobuněčný Ca<sup>2+</sup>. CD38 navíc konvertuje NAD<sup>+</sup> na cADPR, látku působící na ryanodinový receptor, a tak dochází k nárůstu množství vápenatých iontů uvnitř buňky, díky jejichž vazbě se otevírají vápníkové kanály v plazmatické membráně, a udržuje se tak vtok Ca<sup>2+</sup> iontů nutných pro migraci.

Signalizace receptoru CCR7 však může být zprostředkována i nezávisle na G proteinu prostřednictvím adapterového proteinu  $\beta$ -arrestinu (Randolph *et al.*, 2008).



Obr. 2: Signální moduly řídící migrační odpověď v závislosti na vazbě chemokinu na receptor CCR7 u DC. Vazba ligandu na receptor spojený s G proteinem odstartuje dráhy signální transdukce, které vyústí v aktivaci buňky a zvýšení motility. Převzato a upraveno z Randolph *et al.*, 2008.



## 5. Adenosin-3',5'-cyklický monofosfát (cAMP)

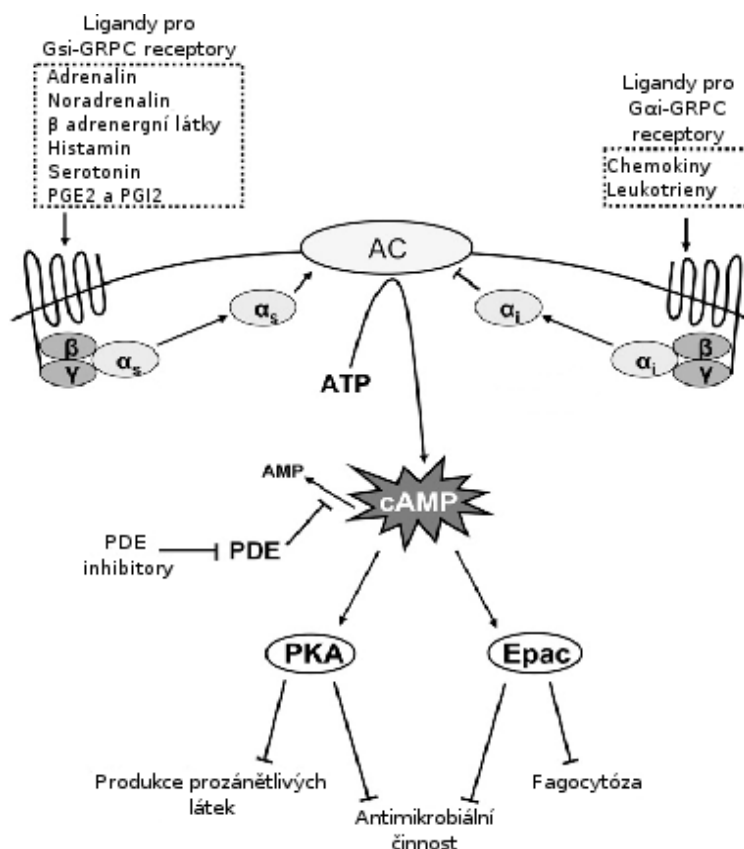
Adenosin-3',5'-cyklický monofosfát (cAMP) je důležitou molekulou patřící mezi tzv. druhé posly, která reguluje mnoho buněčných procesů zahrnující diferenciaci, sekreci, transkripci genů, podílí se na regulaci tvaru buňky, přestavbu cytoskeletu, proliferaci, apoptóze, adhezi a migraci (Beavo and Brunton, 2002).

Signalizace cAMP se uplatňuje i v imunitním systému, kde spouští fyziologické procesy, které mohou vést jak k zánětlivé, tak proti-zánětlivé odpovědi (Lorenowicz *et al.*, 2006). Zatím není jasné, které faktory kontrolují pro-zánětlivé nebo proti-zánětlivé působení cAMP, vliv by však mohla mít délka a síla stimulu spouštějící cAMP signalizaci, stejně tak i typ buňky nebo rozmanitý repertoár efektorů cAMP (Lorenowicz *et al.*, 2007).

Scandella *et al.* ve své práci z roku 2004 zdůrazňuje zásadní úlohu cAMP v aktivaci migrace MoDC, tedy DC derivovaných z monocytů *in vitro*. Práce ukazuje, že inhibice protein kinázy A (PKA), která je efektozem cAMP, dramaticky omezila chemotaxi těchto buněk řízenou CCR7. V této kapitole se pokusím nastínit důvody tohoto výjimečného postavení cAMP v regulaci migrace buněk, tedy jak cAMP prostřednictvím PKA a Epac zasahuje do aktivace nebo inhibice proteinů zapojených v signálních drahách řídících migraci (Scandella *et al.*, 2004).

### 5.1. Regulace hladiny cAMP v buněčném cytozolu

Produkce cAMP se spustí, pokud se mimobuněčný první posel (neurotransmitter, hormon, chemokin, růstový faktory či lék) naváže na receptor spojený s G proteinem (GPCR), který sedmkrát prochází membránou. Tato vazba vyústí ve výměnu GDP za GTP na  $G\alpha_s$  podjednotce G proteinu a její následné disociaci od komplexu  $\beta\gamma$ . Aktivovaná  $\alpha$ -podjednotka poté stimuluje enzym adenylát cyklázu (AC), která katalyzuje přeměnu ATP na cAMP. Mezi známé ligandy vyvolávající aktivaci  $G\alpha_s$  podjednotky GPCR patří adrenalin, noradrenalin, histamin, serotonin, prostaglandiny a adenosin (Lorenowicz *et al.*, 2006; Serezani *et al.*, 2008). Naopak  $G\alpha_i$  podjednotka inhibuje AC a produkci cAMP. Mezi ligandy s tímto účinkem patří některé chemokiny a také leukotrieny. Množství vnitrobuněčného cAMP je však regulováno nejen AC, ale i enzymy fosfodiesterázami (PDE), které mají opačnou funkci a cAMP degradují (Omori and Kotera, 2007). Popsaná regulace hladiny cytozolického cAMP je znázorněna v obr. 3.



Obr. 3: Regulace množství cAMP v buňce a vliv na antimikrobiální funkce. Vazba ligandu na receptor spřažený s G proteinem způsobí změnu konformace, která vyústí v uvolnění podjednotky  $G\alpha$  a komplexu  $\beta\gamma$ . Vazba podjednotky  $G\alpha$  na AC buď aktivuje ( $G\alpha_s$ ) nebo inhibuje ( $G\alpha_i$ ) přeměnu ATP na cAMP. Produkce cAMP může být ovlivněna inhibitory PDE, které ruší funkci PDE (degradace cAMP). Signalizace cAMP je zajištěna jeho interakcí s efektorovými proteiny: PKA a Epac (viz kapitola 5.2.). Oba tyto proteiny se podílejí na řízení funkcí fagocytů. Převzato a upraveno ze Serezani *et al.*, 2008.

## 5.2. Proteiny zprostředkovávající signalizaci cAMP

cAMP působí prostřednictvím svých efektorů, proteinů, na které se váže, a tím je aktivuje. Mezi hlavní cílový protein aktivovaný cAMP patří protein kináza A (PKA). Objevena ale byla i dráha nezávislá na PKA, a to dráha zprostředkovaná proteinem Epac. Jiným mechanismem, kterým účinkuje cAMP, je přímá aktivace membránových kanálů (např. chloridové kanály v epiteliálních buňkách (Petersen and Reuss, 1983)), ta se ale u fagocytů neuplatňuje.

### 5.2.1. Protein kináza A (PKA)

cAMP dependentní protein kináza A (PKA) je heterotetramerní enzym skládající se ze dvou regulačních (R) a dvou katalytických (C) podjednotek. Jsou známé dva typy PKA holoenzymu – typ I a typ II, které se liší R podjednotkou. Vazba dvou molekul cAMP na každou z regulačních podjednotek umožní disociaci dimeru R podjednotek a dvou aktivních katalytických podjednotek, které posléze fosforylují rozmanité cílové proteiny (Diviani and Scott, 2001).

Cílové proteiny se nacházejí v membráně, cytoplazmě, mitochondriích, jádru a jsou rovněž spojené s cytoskeletem. Následky aktivace těchto proteinů jsou různé (Howe *et al.*, 2004). Mezi efekty signalizace PKA ve fagocytech patří potlačení antimikrobiálních funkcí těchto buněk, včetně inhibice produkce pro-zánětlivých cytokinů a reaktivních kyslíkových intermediátů (Aronoff *et al.*, 2005; Serezani *et al.*, 2008).

### 5.2.2. Protein Epac

Dříve než byl Epac objeven, byly účinky signalizace cAMP přisuzovány pouze PKA. Nyní však přibývá mnoho studií ukazující význam proteinu Epac a signální dráhy cAMP/Epac/Rap v různých signálních drahách zprostředkovaných cAMP řídicích např. adhezi buněk (Rangarajan *et al.*, 2003), exocytózu vyvolanou  $Ca^{2+}$  (Kang *et al.*, 2003) nebo Fc $\gamma$  receptorem zprostředkovanou fagocytózu u makrofágů (Aronoff *et al.*, 2005). Pomocí cAMP analogu (8CPT-2Me-cAMP), který specificky aktivuje pouze Epac1, nikoli PKA, byla dokázána jeho významná roli i v adhezi, polarizaci a chemotaxi buněk a tedy, že signalizace cAMP aktivující dráhu Epac1/Rap1 může regulovat zánětlivý proces (Lorenowicz *et al.*, 2007).

Protein Epac patří mezi tzv. GEF proteiny (proteiny vyměňující na proteinu navázané GDP za GTP, z anglického guanosine-exchange factor), jejichž funkcí je aktivovat malé GTPázy. Malá GTPáza Rap1 aktivovaná proteinem Epac hraje důležitou roli ve stimulaci adheze zprostředkované integriny, polarizaci buněk a jejich migraci. Stejně jako jiné malé GTPázy se Rap1 může nacházet ve dvou stavech – vázající GDP, tj. neaktivní, nebo vázající GTP, tj. aktivní. Oscilace mezi oběma stavy je kontrolována pomocí proteinu GAP (protein podporující GTPázovou aktivitu, z anglického GTPase-activating protein), který urychluje hydrolýzu navázaného GTP na GDP a pomocí GEF, který usnadňuje oddělení GDP a následnou vazbu nové molekuly GTP. Epac je tedy „nucleotide-exchange factor“ pro protein Rap1, který je aktivovaný pomocí cAMP (de Rooij *et al.*, 1998).

Byly popsány dvě izoformy proteinu Epac, a sice Epac1 a Epac2 (liší se strukturou domén a tkáněmi, ve kterých se produkují). Epac1 je produkován v ledvinách, vaječnicích a štítné žláze (Kawasaki *et al.*, 1998). Později byla zjištěna exprese proteinu Epac1 v cirkulujících leukocytech (monocyty, eosinofily, neutrofilny, B- i T-buňky), krevních destičkách, CD34<sup>+</sup> hematopoetických buňkách i leukemických monocytárních liniích U937 a HL60 (Lorenowicz *et al.*, 2006). Epac2 je produkován v mozku a nadledvinkách (Bos, 2003) a nebyl nalezen v žádných hematopoetických buňkách (Tiwari *et al.*, 2004)).

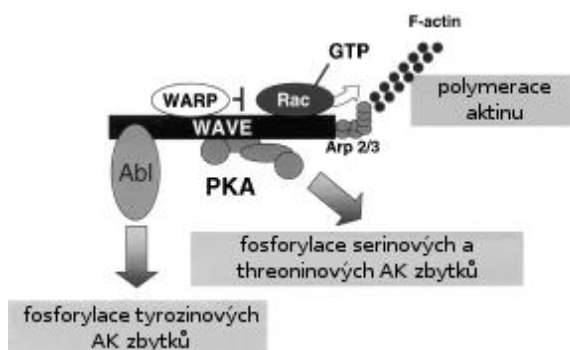
## 5.3. Signalizace cAMP v buněčné migraci

### 5.3.1. Role PKA v buněčné adhezi a migraci

V dosud publikovaných pracích byl dokázán inhibiční i aktivační vliv PKA na migraci. Tento paradox zřejmě vychází z faktu, že PKA sehrává významnou (avšak také rozdílnou) úlohu ve všech dějích zásadních pro navození migrace – formování lamelipodií, polymeraci mikrofilament, inhibici i aktivaci efektorů řídících adhezi. Výsledný vliv zřejmě záleží na některém nebo na všech následujících faktorech: buněčný typ, typ stimulu, míra cAMP/PKA signalizace, časový průběh, nebo prostorová regulace cAMP a PKA (Howe, 2004).

Pro vznik specifické buněčné odpovědi na signalizaci cAMP během buněčné adheze a migrace je velice důležitá prostorová regulace PKA určující místo jejího působení. Lokalizace a kompartmentalizace PKA uvnitř buňky je zajištěna pomocí členů rodiny proteinů ukotvujících kinázu A (AKAP, z anglického A-kinase anchoring protein). Ty váží R podjednotky k určitým substrátům nebo různým buněčným regionům (Diviani and Scott, 2001). AKAP také umožňuje společnou lokalizaci PKA s fosfatázami a PDE (Michel and Scott, 2002). Proteiny AKAP rovněž zajišťují spojení signalizace cAMP a polymerace aktinového cytoskeletu. Takovýmto proteinem AKAP je např. WAVE1 (viz obr. 4), který váže nejen RII podjednotku PKA, ale i další proteiny zapojené v řízení migrace, Rac a Cdc42, a lokalizuje je na vedoucí stranu buňky, nebo Abl tyrozin kinázu také zapojenou v signalizaci viz. dále (Howe, 2004).

Úloha PKA spočívá v omezení adheze na zadní straně buňky nebo zabránění adheze, pokud buňka nemá potřebné signály. PKA reguluje adhezi zadní strany buňky snížením exprese povrchových  $\alpha_M\beta_2$  intergrinů tak, že blokuje jejich mobilizaci z vnitrobuněčných zásobníků do vesikulů, které je na buněčný povrch dopravují.

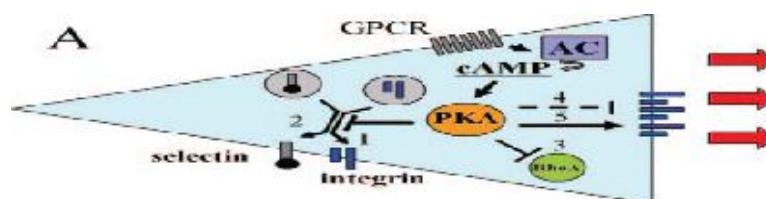


Obr. 4: Schéma proteinových komponent signálního komplexu WAVE. V rámečcích jsou uvedeny potenciální funkce jednotlivých proteinů spojených s AKAP proteinem WAVE. Převzato a upraveno ze Scott, 2003.

Podobně ovlivňuje i produkci selektinů, zde navíc dochází i k uvolňování L-selektinů, které již na povrchu jsou. Dále PKA spouští signalizaci, která zamezuje aktivaci integrinů během iniciace adheze (Lorenowicz, 2007). Všechny tyto události vedou k inhibici adheze.

Kromě ovlivnění produkce povrchových molekul může být negativní účinek PKA zprostředkován i přes aktinový cytoskelet. PKA potlačuje přestavbu aktinového cytoskeletu prostřednictvím signální dráhy Rho/ROCK (Howe, 2004).

Na vedoucí straně buňky PKA adhezi podporuje. I když PKA aktivovaná cAMP negativně ovlivňuje adhezi leukocytů, je nutná pro stabilní a trvalou adhezi, která je zajištěna seskupením integrinů na vedoucí straně buňky (Lorenowicz *et al.*, 2007).



Obr. 5: Role signalizace PKA v buněčné adhezi. Vazba ligandu (serotonin, adenosin nebo prostaglandiny) na GPCR aktivuje AC a produkci cAMP. cAMP aktivuje PKA, PKA následně inhibuje povrchovou expresi integrinů (1) a selektinů (2). PKA také řídí adhezi regulací vazby integrin-aktin pomocí inhibice RhoA (3). PKA brání aktivaci integrinů během iniciaci adheze (4). Přesto je nezbytná pro shlukování integrinů, které zajišťuje trvalou a pevnou adhezi (5). Převzato a upraveno z Lorenowicz *et al.*, 2007.

### 5.3.2. Proteiny účastníci se buněčné migrace a jejich regulace PKA

#### Aktin

PKA může fosforylovat monomery aktinu, což omezuje jejich polymeraci. Touto činností PKA značně omezuje účinky aktinu, jež spočívají v řízení adheze vazbou integrinů a v samotném vytváření lamelipodií polymerací aktinu (Howe, 2004).

#### Integrin $\alpha_4$

Mezi integriny, které jsou pod kontrolou PKA, patří např. integriny  $\alpha_4$  ( $\alpha_4\beta_1$  a  $\alpha_4\beta_7$ ), jež jsou produkovány v buňkách neurální lišty, kosterních a hladkých svalech a také v lymfocytech a monocytech. Cytoplazmatická část integrinů přímo interaguje s paxillinem. Paxillin umožňuje vazbu proteinu GAP (protein podporující GTPázovou aktivitu), který inhibuje protein Arf6, což vede k inhibici proteinu Rac, jehož funkce je nezbytná pro vytváření lamelipodií. Integriny  $\alpha_4$  ale mohou být fosforylovány na serinu v pozici 988 pomocí PKA, což ovlivňuje interakci s

paxillinem, a naopak podporuje aktivitu Rac a tvorbu lamelipodií převážně na vedoucí straně pohybujících se buněk, jak je uvedeno v obr. 6. Vazba  $\alpha_4\beta_1$ -paxillin se zdá být důležitá i pro signalizaci, která řídí  $\alpha_1\beta_2$  zprostředkovanou migraci (Howe, 2004; Rose, 2006).

### **Signální dráha RhoA/ROCK**

Rho proteinová rodina, která je pod kontrolou PKA, se řadí mezi malé GTPázy a zahrnuje proteiny Cdc42, Rac a Rho. Jejich hlavní funkcí je regulace dynamiky cytoskeletu – umožňují změny tvaru buněk a také adhezi během migrace. Aktivací transmembránových receptorů (receptorové tyrozin kinázy, GPCR, integrinové receptory), kterou vyvolávají mimobuněčné signály, jako jsou růstové faktory, bioaktivní lipidy či ECM (Howe, 2004), spouští Rho GTPázy signální dráhy modulující fosforylaci myosinu a dynamiku aktinu. Výsledky jsou různé: stimulace polymerace, depolymerace nebo rozpad již existujících aktinových filament (Worthylake and Burridge, 2003).

V leukocytech RhoA aktivuje kinázu ROCK fosforylující serinové a threoninové aminokyselinové zbytky proteinů. Toto následně ovlivňuje několik významných funkcí, negativně reguluje integrinovou adhezi a přestavbu cytoskeletu a dále omezuje funkce zprostředkované integriny – fosfotyrozinovou signalizaci a vznik membránových protruzí.

Přestavba cytoskeletu nutná pro adhezi zahájenou integriny je řízena dráhou ROCK/LIM kináza/cofilin. ROCK fosforylací aktivuje kinázu LIM, která fosforylací inaktivuje cofilin. Inaktivovaný cofilin udržuje kortikální aktin omezující pohyb integrinů, a tak zabraňuje adhezi. Naopak aktivovaný cofilin (pokud dojde k inhibici ROCK) podporuje vznik membránových protruzí (Worthylake and Burridge, 2003). V buňkách je inhibice ROCK řízena pomocí PKA, která fosforyluje Ser188 na C-konci RhoA. Fosforylace RhoA inhibuje jeho interakci s ROCK, a naopak zvyšuje jeho interakci s RhoGDI (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor), který umožňuje jeho přemístění z buněčné membrány do cytoplazmy (Howe *et al.*, 2005). Tak nemůže dojít k fosforylaci a inaktivaci cofilinu.

Inhibice ROCK také vede k zvýšení fosfotyrozinové signalizace, která je vyvolána adhezí integrinů. Konkrétně dochází k fosforylaci tyrozinů dvou proteinů asociovaných s cytoskeletem – Pyk-2 a paxillinu. Zvýšení fosfotyrozinové signalizace koreluje s větším vznikem membránových protruzí (Worthylake and Burridge, 2003).

Nesporná úloha signalizace RhoA/ROCK vycházející z výše uvedených mechanismů je v řízení migrace. Absence této signální dráhy vede k vytváření mnoha kompetitivních lamelipodií a monocyty se zdají být neschopné „vybrat“ směr pohybu. RhoA/ROCK omezují tvorbu

lamelipodií pouze na vedoucí stranu buňky, a tak umožňují produktivní migraci. Vše je ale možné pouze v případě, že je aktivita RhoA správně prostorově regulována. RhoA musí být aktivně inhibovaná na vedoucí straně buňky, to dovoluje přestavbu cytoskeletu, adhezi a fosfotyrozínovou signalizaci nutnou pro vznik lamelipodií, a naopak aktivní signalizace RhoA je vyžadována na zadní části buňky, aby docházelo k její retrakci (Worthylake and Burridge, 2003). Pozdější výzkumy opravdu potvrdily, že PKA, která inhibuje RhoA fosforylací, je lokalizována v lamelipodiích tvořících se na vedoucí straně buňky během chemotaxe (Howe *et al.*, 2005).

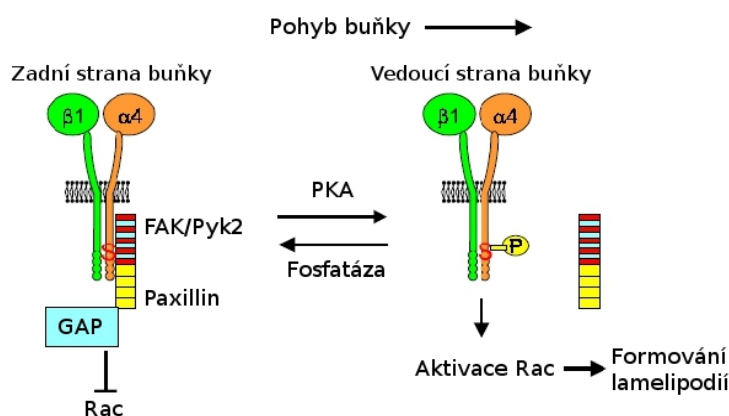
PKA svým inhibičním účinkem na protein Rho ale ovlivňuje také kontrakci buňky, a to přes dráhu zahrnující myosin. PKA inhibuje dráhu Rho/ROCK, která jinak inhibuje fosfatázu MLC (MLCP). Kontraktilita lehkého řetězce myosinu (MLC, z anglického myosin light chain) interagujícího s F-aktinem, která se uplatňuje na vedoucí i na zadní části buňky, je ovlivněna fosforylací. Fosforylací řídí MLC kináza (MLCK) – podporuje kontrakci, a MLC fosfatáza (MLCP) – navozuje relaxaci. PKA se uplatňuje v regulaci MLCK i MLCP. MLCK váže a je aktivována komplexem  $Ca^{2+}$ /kalmodulin (CaM). PKA může ovlivnit uvolňování  $Ca^{2+}$  iontů fosforylací PLC a receptoru pro IP<sub>3</sub>, a měnit tak možnost formování komplexů CaM a následnou aktivitu MLCK. PKA také zabraňuje přímo interakci CaM a MLCK, když fosforyluje MLCK v místě potenciální vazby CaM. Naopak cAMP a PKA dokáží zvýšit MLCP aktivitu a zmírnit inhibici MLCP způsobenou účinkem ROCK inhibice fosforylací a inhibicí Rho. Účinek PKA je tedy stejný jako snížení fosforylace MLC – MLC interaguje s mikrofilamenty a dochází k relaxaci stahu. (Howe, 2004).

### **GTPázy Rac a Cdc42**

Stejně jako u Rho signalizace je nutná přítomnost PKA pro správnou signalizaci proteinu Rac v lamelipodiích vedoucí strany. GTPáza Rac se totiž podílí právě na formování lamelipodií u migrujících leukocytů (Worthylake and Burridge, 2003). A zdá se, že na rozdíl od Rho vyžaduje fosforylací pomocí PKA pro svoji aktivaci. Rac není fosforylován přímo PKA, aktivita GTPázy je regulována přes protein tyrozin fosfatázu PTP-PEST, která je substrátem PKA (Howe, 2004). Dále bylo zjištěno, že PKA může navodit aktivaci Rac jednak nárůstem aktivity Rac-specifického GEF, který je jejím substrátem (Chahdi *et al.*, 2005), a stejně tak i poklesem aktivity Rac-specifického GAP. PKA ruší vznik komplexu zahrnující  $\alpha_4$  integrin, paxillin a Arf-GAP, který činnost Rac inhibuje a zdá se být odpovědný za omezení Rac aktivace pouze na vedoucí část buňky během buněčné migrace, jak je ukázáno na obr. 6 (Rose *et al.*, 2007).

Cdc42 se podobně jako Rac podílí na řízení dynamiky cytoskeletu a migraci – konkrétně se jedná o formování lamelipodií a polarizaci při chemotaxi leukocytů (Worthylake and Burridge, 2003). A je cílovým proteinem pro PKA fosforylaci, i když obdobně jako v případě Rac je tato regulace zprostředkována (Howe, 2004).

Kromě tvorby membránových protruzí se Cdc42 a Rac společně podílejí i na formování shluků integrinů na lamelipodiích, které spouštějí signální dráhy během migrace (Worthylake and Burridge, 2003).



Obr. 6: Regulace aktivity proteinu Rac. PKA omezuje vznik komplexu  $\alpha_4$  integrin, paxillin a Arf-GAP, který Rac inhibuje. PKA tak podporuje polymeraci aktinu. Převzato a upraveno z Rose *et al.*, 2007.

### Protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)

Význam lokalizace PKA během migrace se ukazuje i v aktivaci dalších proteinů – výskyt PKA v protruzích koreluje s fosforylací proteinu VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Howe *et al.*, 2005).

VASP patří do rodiny proteinů, které sehrávají významnou roli v řízení dynamiky cytoskeletu a migrace (Howe, 2004). VASP přes svoji sekvenci bohatou na aminokyselinu prolin váže profilin – protein schopný vázat G-aktin. Lokalizace VASP na vedoucí straně buňky umožňuje prodlužování aktinových vláken právě profilinem, který pomáhá na aktinová vlákna přidávat další aktinové monomery (Holt *et al.*, 1998). Krom toho je VASP schopný regulovat komplex Arp2/3 (zakládá nová vlákna a větví stávající), a aktivovat tak polymeraci aktinu (Sechi and Wehland, 2004). Lokalizace proteinu VASP na vedoucí straně buňky zajišťují proteiny, které jsou zapojeny v adhezi zprostředkované integriny – vinculin, zyxin a palladin, a rovněž jeho vazba na aktin. (Holt *et al.*, 1998).

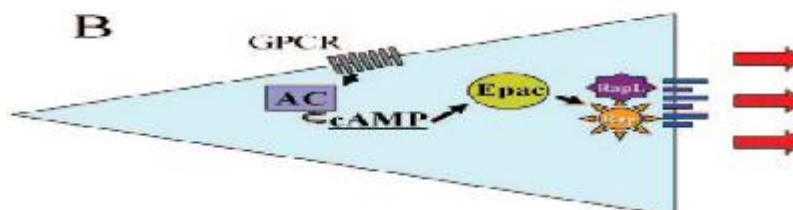


Všechny savčí proteiny VASP jsou substrátem pro PKA. Jsou tři místa, kde může na proteinu VASP dojít k fosforylaci: Ser 157, Ser 239 a Thr 278, a to prostřednictvím PKA nebo cGMP dependentní protein kinázy. Fosforylace Ser 153 se přednostně děje pomocí PKA a následkem je snížená účinnost vázat a zakládat aktinová vlákna a také vede k inhibici interakce VASP s c-Abl nереceptorovou tyrozin kinázou zapojenou v signálních drahách migrace (Eckert and Jones, 2007).

V roce 2009 bylo navíc ukázáno, že protein VASP přímo interaguje s chemokinovým receptorem neutrofilů, CXCR2. Interakce je řízena a zvyšována stimulací interleukinem 8 a vede k fosforylaci VASP prostřednictvím PKA nebo PKC. Význam této přímé interakce dokazují buňky postrádající VASP, které měly výrazně narušenou chemotaxi a polarizaci zprostředkovanou receptorem CXCR2 (Neel *et al.*, 2009).

### 5.3.3. Role proteinu Epac v buněčné migraci a adhezi

Účinkem signalizace Epac1/Rap1 dochází ke stimulaci adheze leukocytů zprostředkované integriny. Role Epac1/Rap1 byla poprvé zaznamenána na nádorových buňkách vaječníků, kde tato dráha spouští integrin  $\alpha_5\beta_1$ - a  $\alpha_v\beta_3$ -dependentní adhezi (Rangarajan *et al.*, 2003). Později byla dráha Epac1/Rap1 se shodným účinkem potvrzena i u integrinu  $\alpha_L\beta_2$  lymfocytů (Reedquist *et al.*, 2000), integrinu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  megakaryocytů (de Bruyn *et al.*, 2002) nebo integrinu  $\alpha_4\beta_1$  CD34<sup>+</sup> krvetvorných buněk (Goichberg *et al.*, 2006). A v roce 2007 ukázali Lorenowicz *et al.*, že aktivace Epac1/Rap1 vyvolává rychlé a signifikantní zvýšení integrinů  $\beta_1$  (konkrétně  $\alpha_5\beta_1$  a  $\alpha_4\beta_1$ ) na povrchu buněk U937 (monocytární leukemická linie) a primárních monocytů, které vede k adhezi na fibronectin, resp. na endotel. Aktivace integrinů  $\beta_2$  ( $\alpha_M\beta_2$ ) nebyla v této práci pozorována. Tato data ukazují, že Epac1/Rap1 stimuluje leukocytární adhezi, především aktivací integrinů  $\beta_1$  (Lorenowicz *et al.*, 2007).



Obr. 7: Role signalizace proteinu Epac v buněčné adhezi. Vazba ligandu (serotonin, adenosin nebo prostaglandiny) na GPCR aktivuje AC a produkci cAMP. cAMP aktivuje signální dráhu Epac1/Rap1. Lokalizace aktivního Rap1 a proteinu RAPL na vedoucí stranu buňky vede k aktivaci integrinů, které zajišťují adhezi a pohyb buňky. Převzato a upraveno z Lorenowicz *et al.*, 2007.

### 5.3.4. Proteiny účastníci se buněčné migrace a jejich regulace proteinem Epac

Stejně jako PKA je signalizace Epac1/Rap1 zapojena do polarizace leukocytů (vytváření lamelipodií a uropodu), která je nezbytná pro migraci. Polarizace je zprostředkována především přes efekторы proteinu Rap1, RAPL a RIAM.

#### Protein RAPL

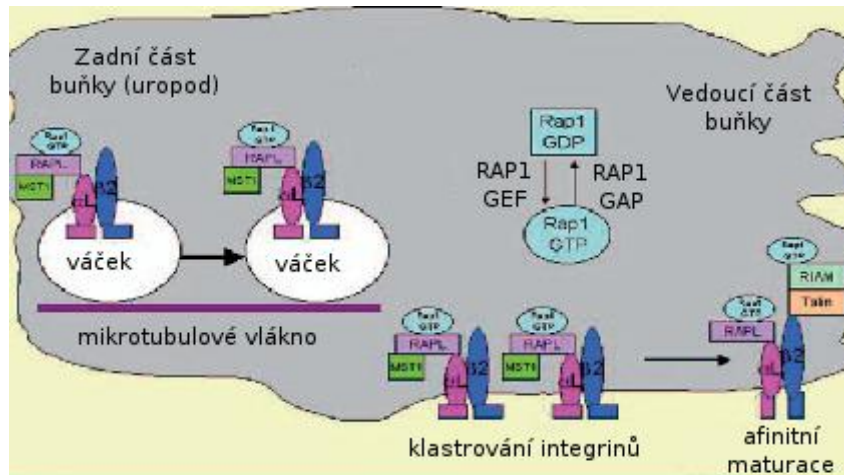
Epac1 nacházející se v oblasti jádra leukocytů zde aktivuje Rap1. Aktivovaný, tj. GTP vázající, Rap1 je přenesen do membrány na vedoucí straně buňky (což potvrzuje přítomnost aktivní i neaktivní formy Rap1 v okolí jádra buňky, zatímco v membráně byl nalezen pouze GTP aktivovaný Rap1). Rap1 aktivovaný v oblasti jádra je schopný do membrány vedoucí strany přenést i RAPL. Komplex Rap1-RAPL následně do membrány cílí integriny ( $\alpha_L\beta_2$ ), které vyvolávají buněčnou polarizaci a migraci, jak je znázorněno na obr. 7 a 8 (Lorenowicz *et al.*, 2007). Rap1-RAPL navíc zvyšují afinitu těchto integrinů k jejich ligandům (Rose, Ronen and Ginsberg, 2007).

Role Rap1-RAPL komplexu v migraci leukocytů byla prokázána také v *in vivo* studii myších lymfocytů, které byly RAPL deficientní. Lymfocyty vykazovaly nižší transendoteliální migraci navozenou chemokiny a nebyly schopné správně migrovat do lymfatických tkání (Katagiri *et al.*, 2002).

V monocytech vyvolal vyšší chemotaxi serotonin, který zvyšuje hladinu cAMP, jež následně aktivoval Epac1 (Lorenowicz *et al.*, 2006). A podobně bylo pozorováno zvýšení transendoteliální migrace CD34<sup>+</sup> hematopoetických buněk následkem nárůstu množství cAMP (po stimulaci PGE2 receptoru), které vedlo k indukci signální dráhy Epac1/Rap1 (Goichberg *et al.*, 2006).

#### Protein RIAM

Druhý efektor signální dráhy Epac1/Rap1, RIAM, vyvolává aktivaci integrinů  $\alpha_{Ib}\beta_3$  pravděpodobně zprostředkováním vazby proteinu talinu na  $\beta$ -podjednotky integrinů, jak je ukázáno na obr. 8. Tato vazba způsobí konformační změnu extracelulární domény, která podobně jako účinek Rap1-RAPL vede k vyšší afinitě integrinů k jejich ligandům (Rose *et al.*, 2007).



Obr. 8: Model úlohy malé GTPázy Rap1 v uspořádání a aktivaci integrinů během polarizace leukocytů. Vazba chemokinu na příslušný receptor aktivuje malou GTPázu Rap1. Aktivní Rap1 (Rap1-GTP) a jeho efektorové proteiny pomáhají přesunu integrinů ze zadní části buňky směrem k vedoucímu okraji během polarizace. Rap1 váže adapterovou molekulu RAPL spojenou se serin/threoninovou kinázou Mst1, tento komplex je odpovědný za přesun vesikulů, které obsahují integriny, po systému mikrotubulů. Shluky integrinů jsou následně doručeny do membrány na vedoucím okraji buňky, kde také dojde ke konformační změně jejich extracelulární domény umožňující vysokoafinitní vazbu ligandu. Konformační změnu zajistí vazba komplexu RAPL-aktivní Rap1 k cytozolické  $\alpha$ -podjednotce integrinů. Druhý efektor proteinu Rap1, RIAM, přispívá aktivaci integrinů pomocí vazby proteinu talin. Talin se váže na cytozolickou  $\beta$ -podjednotku integrinů a tato vazba také způsobí konformační změnu extracelulární domény na vysokoafinitní. Převzato a upraveno z Rose *et al.*, 2007.

### Další efekторы proteinu Epac

Epac1/Rap1 má vedle PKA také schopnost přímo přispět k cAMP aktivaci proteinu Rac. V pokusu s mikrovaskulárními endoteliálními buňkami se ale ukázalo, že PKA, která zde vyžaduje vazbu proteinů VASP a AKAP, je v této dráze upřednostňována (Schlegel and Waschke, 2009).

Navíc Epac je schopný sám bez účasti Rap aktivovat Jun N-terminální kinázu (JNK) – důležitý regulátor buněčné migrace. Tato schopnost je ale nezávislá na jeho GEF aktivitě vyvolané cAMP (Hochbaum *et al.*, 2003).

## 6. Signalizace cAMP prostaglandinu E2 a její vliv na buněčnou migraci

Monocyty a makrofágy během bakteriální nebo virové infekce sekretují velké množství cytokinů – TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , GM-CSF a také PGE2 (Ferreri *et al.*, 1991; Ghanekar *et al.*, 1996; Thurnher *et al.*, 1997). Prostaglandin E2 (PGE2) je lipidová pro-zánětlivá látka produkovaná cyklooxygenázovou (COX) dráhou metabolismu kyseliny arachidonové. Zmiňovány však jsou i proti-zánětlivé účinky PGE2 (Gilroy *et al.*, 1999).

PGE2 může na buňky působit prostřednictvím čtyř GPCR receptorů, konkrétně EP1, EP2, EP3 a EP4, které se liší výskytem v tkáních a svojí účastí v rozdílných signálních drahách (Breyer, 2001). EP2 a EP4 receptory (oba spojeny s G<sub>s</sub> proteinem) shodně přítomné na monocytárních buňkách stimulují AC, která zvyšuje hladinu cAMP v buňce. cAMP následně aktivuje PKA, která řídí migraci (Scandella *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2004).

Na schopnosti migrace MoDC má vliv složení látek, které jsou použity k jejich maturaci *in vitro*. Zajímavé je, že významnou roli sehraává přítomnost nebo nepřítomnost PGE2. Pokud je PGE2 přítomen, vzniká tzv. migrační typ DC, pokud PGE2 přidán není, vzniká tzv. pro-zánětlivý typ DC.

PGE2 udílí MoDC schopnost pohybu ve směru pro-zánětlivých chemokinů (CXCL12) a chemokinů, které jsou produkovány buňkami v lymfatických uzlinách (CCL19 a CCL21). Zdá se, že takovéto DC jsou terminálně diferencované, což znamená, že jen velmi málo odpovídají na stimuly, jako jsou cytokiny, patogeny nebo CD40L, a proto také samy sekretují málo cytokinů (např. IL-12p70, TNF- $\alpha$ ) (Luft *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2004). Dosud nejasná je otázka, jak migrační typ DC ovlivňuje naivní CD4<sup>+</sup> T-buňky. Výsledky skupiny Luft *et al.* poukazují spíše na vznik Th2-buněk, na rozdíl od Scandella *et al.* (2002) nebo klinické studie s lidskými MoDC, která dokumentuje produkci IFN- $\gamma$  T-buňkami – typickou pro Th1 odpověď (Jonuleit *et al.*, 2001). V poslední době se začala zmiňovat i indukce Th17 buněk (Boniface *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2009). Tato schopnost by pravděpodobně mohla záviset na celkovém složení látek indukujících maturaci (Scandella *et al.*, 2004).

Pro-zánětlivý typ MoDC (tedy maturovaný bez přítomnosti PGE2, stimulovaný pouze patogenem nebo CD40L) sekretuje vysoké množství cytokinů IL-10 a IL-12p70 a naivní T-buňky směřuje k diferenciaci v Th1 a produkci IFN- $\gamma$ . Migrační schopnosti pro-zánětlivých DC k chemokinům nebo ligandům receptoru CCR7 jsou ale značně omezené.

Z tohoto pozorování vyplývá, že PGE2 je hlavním regulátorem funkce DC, převažuje svým působením jiné signály a je vyžadován pro úspěšnou migraci DC (Luft *et al.*, 2002).

PGE2 zvyšuje expresi receptoru CCR7 na povrchu nezralých MoDC. A to signální dráhou cAMP/PKA/AKT. Prokazatelnou úlohu v zahájení exprese CCR7 má i NF- $\kappa$ B, avšak vztah mezi proteinem AKT a NF- $\kappa$ B je zatím neobjasněný (Pan *et al.*, 2008). Ale toto zvýšení samo o sobě pro usnadnění migrace není dostatečné. Expresi CCR7 na nezralých DC zvyšují i další látky, jako poly I:C nebo sCD40L, ale bez jakékoli spojitosti s vyšší migrací. Na druhou stranu PGE2 nemá žádný účinek na expresi CCR7 u DC aktivovaných prostřednictvím poly I:C, přesto usnadňuje migraci těchto DC k CCL19 a CCL20. DC tudíž vyžadují další stimul, který receptorům dovolí signalizovat, a je tedy pravděpodobnější, že účinek PGE2 je v zahájení vnitrobuněčných drah důležitých pro migraci než v ovlivnění exprese receptorů. Navíc se ukázalo, že jeho účinek není omezen jen na receptor CCR7. Pokud byl PGE2 přítomný v mediu u *in vitro* studií, MoDC putovaly také k chemokinu CXCL12 (který je rozpoznáván receptorem CXCR4) a komplementovým chemoatraktantům (receptor C5aR). Vliv PGE2 je platný i pro DC izolované z periferní krve (PBDC, z anglického peripheral blood dendritic cell) (Legler *et al.*, 2006).

Výše popsany účinek má ale pouze exogenní PGE2. Ve své studii Legler *et al.* vyvolali pomocí IL-13 produkci endogenního PGE2, a i když bylo v mediu prokázáno jeho dostatečné množství, pro migrační fenotyp MoDC nebo PBDC bylo potřeba přidání i exogenního PGE2. Přidání exogenního PGE2 ale muselo proběhnout během maturace DC, pokud bylo přidáno k již maturovaných DC, nemělo na migraci žádný vliv (Legler *et al.*, 2006).

Účinek PGE2 je stejný i pro monocyty – zvyšuje jejich migraci k chemotaktickým látkám CCL2, RANTES, CXCL12 (SDF-1) a CCL19. PGE2 vazbou na receptor EP2 a EP4 spouští signalizaci vedoucí k vyšší produkci cAMP a k přestavbám aktinu. Migrace monocytů je tedy vlivem PGE2 zvýšena aniž by došlo k změnám exprese receptorů těchto chemokinů (Panzer and Ugucioni, 2004). Avšak k rozdílným výsledkům došla studie Cote *et al.* Použitím specifických inhibitorů ukázali, že PGE2 u monocytů podporuje migraci tím, že zvyšuje expresi receptoru CCR7. Transkripci CCR7 v tomto případě řídí dráha cAMP/PKA přes transkripční faktor CREB (cAMP response element-binding) a C/EBP. Na rozdíl od DC jsou tyto receptory funkční, nepotřebují další stimul, a dovolují monocytům a makrofágům opustit místo zánětu a migrovat k lymfatickým uzlinám (Cote *et al.*, 2009).

McConnell *et al.* a Van Epps *et al.* však ve svých studiích u makrofágů upozorňují na inhibiční účinek PGE2 na migraci (McConnell *et al.*, 1980; Van Epps, 1981).

Zdá se tedy, že pro migraci MoDC a monocytů zajištěnou PGE2 je kritické množství a doba trvání stimulace prostaglandinem. Koncentrace PGE2 v místě zánětu se pohybuje od 0,2 nM k 1,69  $\mu$ M (Anderson *et al.*, 1996; Hinson *et al.*, 1996). A bylo potvrzeno, že toto množství je dostatečné k navození migrace DC, resp. monocytů (Cote *et al.*, 2009; Panzer and Ugucconi, 2004; Scandella *et al.*, 2004). Už dříve ale bylo ukázáno, že množství vyšší než přibližně 10  $\mu$ M migraci neutrofilů a monocytů inhibuje (McConnell *et al.*, 1980; Van Epps, 1981). Ve všech případech, kdy byl zjištěn pozitivní účinek PGE2 na migraci, byly buňky s PGE2 inkubovány po dobu 24 až 48 hod. (Luft *et al.*, 2002; Scandella *et al.*, 2002; Legler *et al.*, 2006; Panzer and Ugucconi, 2004 a Cote *et al.*, 2009). Naopak inhibiční účinek byl pozorován u T-buněk inkubovaných s PGE2 30 – 45 min. (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1994).

## 7. Bakteriální toxiny zvyšující cytozolickou hladinu cAMP a jejich ovlivnění buněčné migrace

### 7.1. Edema faktor *Bacillus anthracis*

*Bacillus anthracis* je patogen způsobující sněž slezinnou neboli antrax. Spóry *B. anthracis* vstupují do hostitelského organismu přes kůži, s potravou nebo vdechnutím. V plicích jsou spory pohlceny fagocyty, které migrují do lymfatických uzlin, kde uvolňují vegetativní bakterie. Ty následně vstupují do krevního oběhu, což vede k sepsi a smrti organismu (Collier and Young, 2003; Turnbull, 2002).

Chemotaxe má ale pro *B. anthracis* dvojsečný význam. *B. anthracis* fagocyty potřebuje jako hostitelské buňky a zneužívá je pro dosažení lymfatických uzlin. Na druhou stranu napadení organismu může být potlačeno buňkami imunitního systému, které jsou do místa infekce chemotakticky přilákány. Jemná regulace migrace buněk bude pro přežití *B. anthracis* velmi důležitá (Wong and Fish, 2003).

Klíčovými faktory virulence *B. anthracis* jsou tři proteiny: PA (protektivní antigen), LT (letální toxin) a ET (edema toxin) (Abrami *et al.*, 2005). LT a ET jsou dopraveny do cytozolu hostitelské buňky přes transmembránové póry formované v endozómu protektivním antigenem (Young and Collier, 2007). LT funguje jako endoproteáza štěpící kinázu MAPK (MAPKK) a ET jako  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin (CaM) dependentní adenylát cykláza (AC).

Edema faktor (EF) je adenylát cyklázová podjednotka ET. Edema faktor je protein tvořený 767 aminokyselinovými zbytky (AK) o molekulární hmotnosti 89 kDa, u kterého byla již v roce 1982 prokázána adenylát cyklázová aktivita závislá na vazbě cytozolického kalmodulinu (Leppla, 1982). Strukturně je tvořen čtyřmi jednotkami. První N-koncová část (AK 1-33) sestává ze sekrečního signálu. Následující doména (AK 33-294) se účastní vazby protektivního antigenu (PA). Vlastní katalytická doména EF, která váže kalmodulin a vykazuje sekvenční homologii k AC doméně adenylátcyklázového toxinu *B. pertussis*, se nachází mezi AK 262-640. Poslední čtvrtá C-koncová doména (AK 641-767) tvoří hlavně  $\alpha$ -helixy a pomocí konformační změny uzavírá kalmodulin po jeho navázání na katalytickou doménu (Brossier and Mock, 2001; Drum *et al.*, 2002; Tang and Guo, 2009).

Díky svojí aktivitě sehraává ET roli v potlačení vrozené i adaptivní imunitní odpovědi, které jsou nutné pro udržení infekce pod kontrolou (Collier and Young, 2003). Dráhy zahájené signalizací chemokinovými receptory jsou tedy vhodným potenciálním cílem účinku ET toxinu. Vlivem ET a jeho CaM dependentní AC aktivity dochází k masivní produkci cAMP. Tato zvýšená hladina cAMP má podle Paccani *et al.* za následek sníženou migrační schopnost makrofágů k chemoatraktantu CXCL12 i CCL3. Mohlo by se tak dít prostřednictvím PKA, která negativně fosforyluje klíčové strukturní komponenty cytoskeletu a proteiny zapojené v kontrole buněčné pohyblivosti uvedené výše: aktin, VASP, Rho GTPázu, PAK1 a také paxillin (Paccani *et al.*, 2008).

Naopak zvýšení migrace makrofágů signalizací cAMP aktivovanou ET pozorovali Kim *et al.* a zaměřili se na to, které geny jsou vlivem cAMP exprimovány ve větší míře. Signalizace cAMP byla zprostředkována PKA, která fosforyluje transkripční faktor CREB. Ukázalo se, že dráha PKA/CREB zvyšuje produkci genu kodujícího endoteliální růstový faktor (VEGF z anglického vascular endothelial growth factor). VEGF byl nalezen jako hlavní cytokin v supernatantu kultury makrofágů stimulovaných ET. U makrofágů VEGF stimuluje migraci. Další geny indukované účinkem ET spojené s migrací byly *Gjal* (gen pro konexin-43), *Ccr12* (gen pro chemokinový receptor) a *Sdc1* (gen pro syndecan-1). Syndecan-1 je transmembránový proteoglykan heparan sulfát zapojený v signalizaci migrace, umožňuje vazbu na ECM a lze předpokládat jeho potřebu pro migraci buněk navozenou patogenem, tudíž by mohl nabídnout vysvětlení pozorovanému zvýšení migrace.

Mezi významné geny, jejichž exprese byla vyvolána působením ET toxinu, byly i ty, které kódují cyklooxygenázu COX-2 (*Ptgs2*) a histidin dekarboxylázu (*Hdc*). Tj. enzymy podílející se na produkci PGE2 a histaminu. PGE2 sám může zahájit produkci cAMP vazbou na GPCR jak bylo uvedeno výše. Je tedy možné, že ET navozuje trvalou signalizaci cAMP ustavením pozitivní zpětné vazby (Kim *et al.*, 2008).

Geny exprimované vlivem ET toxinu byly téměř shodné s těmi, které byly exprimovány pod vlivem PGE2. *B. anthracis* tedy zneužívá obecné regulační mechanismy buněk, aby navodil proti-zánětlivou odpověď a zvýšil migraci buněk.

Odlišná migrační schopnost makrofágů pozorovaná v studiích Paccani *et al.* a Kim *et al.* by mohla být vysvětlena rozdíly v použitých makrofázích a také v nastavení podmínek experimentu. Paccani *et al.* použili lidské monocyty izolované z periferní krve, které inkubovali s ET 2 hod. Kim *et al.* pracovali s myšími BMDM (z angl. bone marrow-derived macrophage) a jaterními makrofágy izolovanými z myších embryí, které inkubovali s ET po dobu 24 hod.



Stejně jako makrofágy jsou i DC potenciálním cílem infekce *B.anthraxis*, protože se nacházejí v místě vstupu patogenu do organismu. ET je zvyšováním množství cAMP schopný navodit netypickou maturaci DC, a může tak měnit jejich funkce (Galgani *et al.*, 2004).

Zvýšená hladina cAMP vede k nárůstu exprese povrchových molekul charakteristických pro zralé DC jako CD83, CD86 nebo MHC II. třídy, ale omezuje jejich schopnost produkovat cytokiny IL-12 a TNF- $\alpha$  a zvyšuje sekreci IL-10. Změny v maturaci jsou doprovázeny i zvýšenou schopností DC migrovat k chemoatraktantu CCL19 (Maldonado-Arocho and Bradley, 2009). Důvod zlepšené chemotaxe buněk účinkem ET se zdá být stejný jako pro makrofágy, vyšší migrační schopnost urychlí dosažení lymfatických uzlin, uvolnění bakterií do krevního oběhu a ustanovení systémové infekce (Brittingham *et al.*, 2005; Cleret *et al.*, 2007).

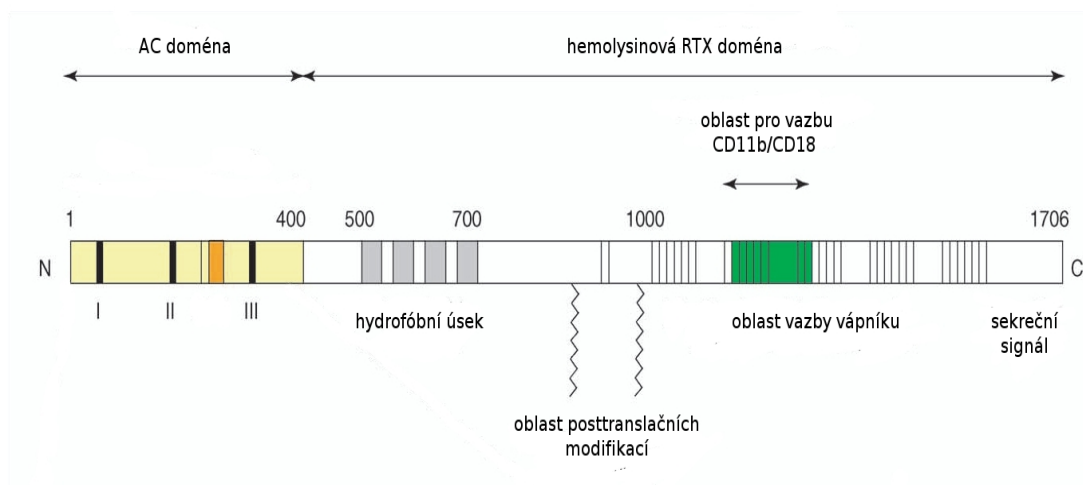
## **7.2. Adenylát cyklázový toxin *Bordetella pertussis***

*Bordetella pertussis* – původce černého (dávivého) kašle u lidí, se do těla dostává kapénkovou cestou a způsobuje onemocnění dýchacích cest. Po infekci bakterie adherují na řasinkové buňky nasofaryngeálního epitelu, rychle se zde pomnoží a rozšíří dál do dýchacího traktu. Ke kolonizaci plic však nedochází (Locht *et al.*, 2001). Jako model pro studium infekce *Bordetellou* v přirozeném hostiteli se využívá také *B. bronchiseptica*, protože způsobuje chronická onemocnění dýchacího traktu savců včetně myši a stejně jako *B. pertussis* produkuje CyaA.

Adenylát cyklázový toxin (CyaA, ACT), člen proteinové rodiny RTX (repeat-in-toxin), je klíčový virulentní faktor *B. pertussis* (Ladant and Ullmann, 1999). Po vazbě na integrin  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18) (Guermontprez *et al.*, 2001) toxin interaguje s plazmatickou membránou a permeabilizuje ji formováním kation-selektivních pórů. CyaA rovněž přenáší svou AC doménu přímo přes cytoplazmatickou membránu do cytozolu hostitelské buňky. Zde je AC doména aktivována hostitelským kalmodulinem a katalyzuje přeměnu ATP na cAMP (Wolff *et al.*, 1980). Za zmínku stojí to, že katalytická aktivita CyaA je více než tisíckrát vyšší než u endogenní buněčné AC (Vojtova *et al.*, 2006).

CyaA je protein sestávající z 1706 aminokyselinových zbytků (AK). AC doména tohoto toxinu je tvořena N-koncovými 400 AK, zatímco C-terminálních 1300 AK vytváří hemolysinovou (Hly) doménu toxinu, jak ukazuje obr. 9 (Ladant and Ullmann, 1999). Hly doménu je možné dále rozdělit na několik částí. Jsou to; (i) hydrofóbní doména (AK 500-800), která tvoří v membráně kanál selektivní pro kationty, (ii) acylovaná doména (AK 800-1000), která obsahuje místa posttranslačních modifikací proteinu, (iii) RTX doména (AK 1000-1638),

kteřá představuje hlavní vazebnou oblast pro vápník a kterou tvoří více či méně konzervovaná opakování sekvencí X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D a (iv) oblast C-terminálního sekrečního signálu (Vojtova *et al.*, 2006).



Obr. 9: Struktura adenylát cyklázového toxinu (CyaA) *B. pertussis*. Převzato a upraveno z Vojtova *et al.*, 2006.

Bylo ukázáno, že rychlý nárůst vnitrobuněčné koncentrace cAMP účinkem CyaA ve fagocytech má za následek potlačení baktericidních funkcí těchto buněk, jako jsou chemotaxe, tvorba reaktivních kyslíkových radikálů (Ladant and Ullmann, 1999), nebo fagocytóza prostřednictvím receptoru FcR (Weingart and Weiss, 2000). CyaA může také navodit apoptózu buněk (Khelef *et al.*, 1993) a měnit produkci specifických proteinů, jako jsou HSP (heat shock protein) (Njamkepo *et al.*, 2000).

Negativní vliv CyaA a cAMP na migraci neutrofilů a makrofágů byl ukázán již v roce 1987 (Friedman *et al.*, 1987). Při pozdějším zaměření na molekulární mechanismus této inhibice migrace, byla nalezena shoda s množstvím cAMP a zvýšenou aktivitou PKA. Také bylo zjištěno, že CyaA zabraňuje aktivaci kináz Erk a JNK, která za normálních podmínek nastává v reakci na chemokiny CXCL12 a CCL3 (receptor CXCR4, resp. CCR5). A tedy, že inhibice chemotaxe vyvolaná toxinem CyaA je způsobena cAMP a PKA, která ruší signalizaci mezi chemokinovými receptory a MAP kinázami (Paccani *et al.*, 2008). Obě studie zdůrazňují fakt, že chemotaktická funkce byla inhibována v závislosti na dávce toxinu. V obou případech byly buňky s toxinem inkubovány po dobu 1 hod.

Kromě okamžité změny baktericidních funkcí makrofágů byl pozorován i vliv CyaA toxinu na funkce DC, produkci cytokinů, aktivaci a maturaci (Boyd *et al.*, 2005; Ross *et al.*,

2004). CyaA toxin u DC ovlivňuje exprese aktivačních molekul, zvyšuje expresi molekul MHC II. třídy a CD80 a snižuje expresi molekul CD40 a ICAM-1 (Boyd *et al.*, 2005; Skinner *et al.*, 2005). Zvýšení cytozolické hladiny cAMP vyvolané CyaA také koreluje s nízkou produkcí pro-zánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-12 a naopak zvýšenou sekrecí IL-10 u makrofágů i DC (Bagley *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2005). Tento semi-maturovaný fenotyp DC je spojován s produkcí regulačních T-buněk potlačujících imunitní odpověď (Ross *et al.*, 2004).

Dále bylo prokázáno, že je navozena efektivní migrace DC do lymfatických uzlin v průběhu infekce *B. bronchiseptica* (Skinner *et al.*, 2005). Vliv zvýšení cytozolického cAMP prostřednictvím CyaA na migraci DC zatím nebyl prokázán. Avšak, jednou z možných hypotéz vysvětlujících pozorování této zvýšené migrace je, že *B. bronchiseptica* k tomu, aby ustanovila chronickou infekci dýchacího traktu, využívá DC. Navodí u nich vývoj do semi-maturovaného stavu a „přinutí“ je rychle migrovat do lymfatických uzlin, kde se nacházejí naivní T-buňky, ty se pod vlivem signalizace takovýchto DC diferencují v Th2 nebo Tr1 buňky, které na rozdíl od pro-zánětlivých Th1-buněk a jejich odpovědi (jež by vedla k okamžitému odstranění bakterií), zajistí bakterii přežití (Skinner *et al.*, 2005).

Uvážíme-li všechny účinky CyaA na makrofágy a DC dohromady, je zřejmé, že *B. pertussis* našla efektivní způsob, jak zamezit imunitním buňkám v její likvidaci.

### **7.3. Další toxiny ovlivňující hladinu cytozolického cAMP**

Nejenom *B. anthracis* nebo *B. pertussis*, ale i další patogeny produkují toxiny s vlastní AC aktivitou, které mají za následek vzrůst hladiny cytozolického cAMP, např. *Pseudomonas aeruginosa* ExoY (Yahr *et al.*, 1998) nebo *Yersinia pestis* Cya (Sory *et al.*, 1995). Jiné bakteriální toxiny stimulují hostitelskou AC tím, že mění aktivitu G proteinu, např. cholera toxin *Vibrio cholerae* (Spangler, 1992) nebo inhibují signalizaci receptorů spojených s G<sub>i</sub> proteinem, např. pertussis toxin *B. pertussis* (Katada and Ui, 1982). A i tyto toxiny ovlivňují signalizaci a chování buněk stejně jako CyaA a ET toxin.

## 8. Diskuze

Na závěr se nabízí otázka, jak je možné, že cAMP (konkrétně nárůst cytozolického cAMP ať již účinkem PGE2, bakteriálních toxinů nebo v odpovědi na jiný obdržení signál) v některých případech vyvolává aktivaci, a v jiných naopak inhibici chemotaxe fagocytů. A odpověď není ani jednoduchá, ani jednoznačná.

Z výše uvedeného vyplývá, že účinek závisí na typu buňky, na prostorové regulaci vzniku a působení cAMP a jeho efektorů PKA a Epac, na koncentraci látek spouštějících syntézu cAMP a zajímavou úlohu dozajista sehrává i časová regulace, tedy po jakou dobu byly buňky s aktivátory inkubovány.

Možné řešení by mohla nabídnout časová spojitost s aktivací nebo inhibicí migrace fagocytů, která je shodná pro působení všech výše uvedených látek – PGE2, ET a CyaA toxin. Fagocyty vykazovaly vyšší migrační schopnost, pokud byly s PGE2 nebo toxiny inkubovány 24 až 48 hod. Inhibice migrace naopak nastala, když buňky byly s toxiny inkubovány kratší dobu 1 – 2 hod.

Studie skupiny Bles *et al.* zaměřená na genovou transkripci DC po stimulaci s PGE2 a ATP (ATP má na maturaci a migraci DC a makrofágů podobný vliv jako PGE2 (Wilkin *et al.*, 2001)) odhalila, že shodné geny se přepisují právě po stimulaci ATP nebo PGE2 v délce 24 hod. Mezi geny, jež byly více přepisovány patřil CCR7 a VEGF-A (Bles *et al.*, 2007). Vyšší produkci proteinu VEGF navíc vyvolala i 24 hod. inkubace makrofágů s ET (Kim *et al.*, 2008). Vysvětlením proti-zánětlivé funkce cAMP a jeho pozitivního účinku na migraci skrze genovou transkripci by mohl být koncept modulárního zapínání genů přes přestavby chromatinu, např. histonovými modifikacemi. Koncept vychází z představy, že při zánětu dochází ke koordinované expresi mnoha genů (tzv. transkripčních modulů), a to pod kontrolou transkripčních faktorů, koregulátorů a chromatinových modifikací. Aby ale nedošlo ke škodlivému vlivu dlouhodobého zánětlivého procesu, akutní zánět vede k expresi negativních regulátorů zánětu, a navíc – geny kódující zánětlivé produkty jsou pod kontrolou mnoha signálních drah a mechanismů, které omezují patofyziologické následky nepřiměřeného zánětu. cAMP by tedy mechanismem epigenetických modifikací mohl působit proti-zánětlivě a zároveň zvyšovat expresi genů podporujících migraci buněk (Medzhitov and Horng, 2009).

## 9. Závěr

cAMP se regulace migrace fagocytů účastní přes transkripční faktory (NF- $\kappa$ B, CREB) a dva hlavní efektorové proteiny: PKA a Epac. Oba proteiny jsou vazbou cAMP aktivovány a dále pak sehrávají různé, ale stejně důležité úlohy, ať už v drahách signální transdukce, nebo v interakcích s proteiny, které zajišťují reorganizaci cytoskeletu. Rozmanitý repertoár cílových proteinů PKA a dosud málo prozkoumané interakce proteinů Epac a Rap by zasloužily detailní zmapování a určení přesných mechanismů, jimiž ovlivňují migraci buněk. A hlavně by mohly přinést uspokojivá vysvětlení rozdílného (aktivačního nebo inhibičního) působení látek, které zvyšují hladinu cAMP, a mění tak migrační schopnosti fagocytů.

Jak jsem již naznačila v úvodu, význam výzkumu úlohy cAMP v migraci fagocytů spočívá v možnostech, které nabízí v klinickém využití. A i když se potenciálu látek, které zvyšují koncentraci cytozolického cAMP a v důsledku i buněčnou migraci, již využívá, existují určitá rizika, která limitují jejich použití u lidí, a proto je potřeba hledat stále další alternativy, které by byly účinnější a vhodnější.

## 10. Použitá literatura

- Abrami, L., Reig, N. and van der Goot, F.G. (2005). Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol* 13, 72-78.
- Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C. and Gregory, S.A. (1996). Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97, 2672-2679.
- Aronoff, D.M., Canetti, C., Serezani, C.H., Luo, M. and Peters-Golden, M. (2005). Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol* 174, 595-599.
- Bagley, K.C., Abdelwahab, S.F., Tuskan, R.G., Fouts, T.R. and Lewis, G.K. (2002). Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol* 72, 962-969.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Beavo, J.A. and Brunton, L.L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 710-718.
- Bles, N., Horckmans, M., Lefort, A., Libert, F., Macours, P., El Housni, H., Marteau, F., Boeynaems, J.M. and Communi, D. (2007). Gene expression profiling defines ATP as a key regulator of human dendritic cell functions. *J Immunol* 179, 3550-3558.
- Boniface, K., Bak-Jensen, K.S., Li, Y., Blumenschein, W.M., McGeachy, M.J., McClanahan, T.K., McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J. and de Waal Malefyt, R. (2009). Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 206, 535-548.
- Bos, J.L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 733-738.
- Boyd, A.P., Ross, P.J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E.C. and Mills, K.H. (2005). *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* 175, 730-738.
- Breyer, R.M. (2001). Prostaglandin EP(1) receptor subtype selectivity takes shape. *Mol Pharmacol* 59, 1357-1359.
- Brittingham, K.C., Ruthel, G., Panchal, R.G., Fuller, C.L., Ribot, W.J., Hoover, T.A., Young, H.A., Anderson, A.O. and Bavari, S. (2005). Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J Immunol* 174, 5545-5552.
- Brossier, F. and Mock, M. (2001). Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon* 39, 1747-1755.
- Celli, J. and Finlay, B.B. (2002). Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol* 10, 232-237.
- Cleret, A., Quesnel-Hellmann, A., Vallon-Eberhard, A., Verrier, B., Jung, S., Vidal, D., Mathieu, J. and Tournier, J.N. (2007). Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J Immunol* 178, 7994-8001.
- Collier, R.J. and Young, J.A. (2003). *Anthrax toxin*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 45-70.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226.
- Cote, S.C., Pasvanis, S., Bounou, S. and Dumais, N. (2009). CCR7-specific migration to CCL19 and CCL21 is induced by PGE(2) stimulation in human monocytes: Involvement of EP(2)/EP(4) receptors activation. *Mol Immunol* 46, 2682-2693.
- Cyster, J.G. (1999). Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med* 189, 447-450.
- de Bruyn, K.M., Rangarajan, S., Reedquist, K.A., Figdor, C.G. and Bos, J.L. (2002). The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 277, 29468-29476.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.
- Diviani, D. and Scott, J.D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1431-1437.
- Drum, C.L., Yan, S.Z., Bard, J., Shen, Y.Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A. and Tang, W.J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415, 396-402.
- Eckert, R.E. and Jones, S.L. (2007). Regulation of VASP serine 157 phosphorylation in human neutrophils after stimulation by a chemoattractant. *J Leukoc Biol* 82, 1311-1321.
- Ferreri, N.R., Millet, I., Paliwal, V., Herzog, W., Solomon, D., Ramabhadran, R. and Askenase, P.W. (1991). Induction of macrophage TNF alpha, IL-1, IL-6, and PGE2 production by DTH-initiating factors. *Cell Immunol* 137, 389-405.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response

- by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.
- Friedman, R.L., Fiederlein, R.L., Glasser, L. and Galgiani, J.N. (1987). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun* 55, 135-140.
- Gagliardi, M.C., Sallusto, F., Marinaro, M., Langenkamp, A., Lanzavecchia, A. and De Magistris, M.T. (2000). Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur J Immunol* 30, 2394-2403.
- Galgani, M., De Rosa, V., De Simone, S., Leonardi, A., D'Oro, U., Napolitani, G., Masci, A.M., Zappacosta, S. and Racioppi, L. (2004). Cyclic AMP modulates the functional plasticity of immature dendritic cells by inhibiting Src-like kinases through protein kinase A-mediated signaling. *J Biol Chem* 279, 32507-32514.
- Ghanekar, S., Zheng, L., Logar, A., Navratil, J., Borowski, L., Gupta, P. and Rinaldo, C. (1996). Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol* 157, 4028-4036.
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J. and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 5, 698-701.
- Goichberg, P., Kalinkovich, A., Borodovsky, N., Tesio, M., Petit, I., Nagler, A., Hardan, I. and Lapidot, T. (2006). cAMP-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 107, 870-879.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. and Leclerc, C. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193, 1035-1044.
- Hinson, R.M., Williams, J.A. and Shacter, E. (1996). Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4885-4890.
- Hochbaum, D., Tanos, T., Ribeiro-Neto, F., Altschuler, D. and Coso, O.A. (2003). Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* 278, 33738-33746.
- Holt, M.R., Critchley, D.R. and Brindle, N.P. (1998). The focal adhesion phosphoprotein, VASP. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 307-311.
- Howe, A.K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 1692, 159-174.
- Howe, A.K., Baldor, L.C. and Hogan, B.P. (2005). Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14320-14325.
- Huttenlocher, A., Ginsberg, M.H. and Horwitz, A.F. (1996). Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 134, 1551-1562.
- Chahdi, A., Miller, B. and Sorokin, A. (2005). Endothelin 1 induces beta 1Pix translocation and Cdc42 activation via protein kinase A-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 578-584.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T.B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P.P., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A.H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.
- Kang, G., Joseph, J.W., Chepurny, O.G., Monaco, M., Wheeler, M.B., Bos, J.L., Schwede, F., Genieser, H.G. and Holz, G.G. (2003). Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca2+-induced Ca2+ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 278, 8279-8285.
- Katada, T. and Ui, M. (1982). Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3129-3133.
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. and Kinashi, T. (2002). Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol Cell Biol* 22, 1001-1015.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282, 2275-2279.
- Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61, 4064-4071.
- Kim, C., Wilcox-Adelman, S., Sano, Y., Tang, W.J., Collier, R.J. and Park, J.M. (2008). Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6150-6155.
- Ladant, D. and Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 7, 172-176.
- Larsen, M., Tremblay, M.L. and Yamada, K.M. (2003). Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 700-711.
- Lauffenburger, D.A. and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Legler, D.F., Krause, P., Scandella, E., Singer, E. and Groettrup, M. (2006). Prostaglandin E2 is generally

- required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol* 176, 966-973.
- Leppla, S.H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3162-3166.
- Locht, C., Antoine, R. and Jacob-Dubuisson, F. (2001). *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4, 82-89.
- Lorenowicz, M.J., Fernandez-Borja, M. and Hordijk, P.L. (2007). cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1014-1022.
- Lorenowicz, M.J., van Gils, J., de Boer, M., Hordijk, P.L. and Fernandez-Borja, M. (2006). Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 80, 1542-1552.
- Luft, T., Jefford, M., Luetjens, P., Toy, T., Hochrein, H., Masterman, K.A., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J. and Maraskovsky, E. (2002). Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 100, 1362-1372.
- Maldonado-Arocho, F.J. and Bradley, K.A. (2009). Anthrax edema toxin induces maturation of dendritic cells and enhances chemotaxis towards macrophage inflammatory protein 3beta. *Infect Immun* 77, 2036-2042.
- McConnell, I., Hopkins, J. and Lachmann, P. (1980). Lymphocyte traffic through lymph nodes during cell shutdown. *Ciba Found Symp* 71, 167-195.
- Medzhitov, R. and Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9, 692-703.
- Michel, J.J. and Scott, J.D. (2002). AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 235-257.
- Murphy, P.M. and Tiffany, H.L. (1991). Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1280-1283.
- Neel, N.F., Barzik, M., Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Sai, J., Ham, A.J., Mernaugh, R.L., Gertler, F.B. and Richmond, A. (2009). VASP is a CXCR2-interacting protein that regulates CXCR2-mediated polarization and chemotaxis. *J Cell Sci* 122, 1882-1894.
- Njamkepo, E., Pinot, F., Francois, D., Guiso, N., Polla, B.S. and Bachelet, M. (2000). Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol* 183, 91-99.
- Omori, K. and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 100, 309-327.
- Oppenheimer-Marks, N., Kavanaugh, A.F. and Lipsky, P.E. (1994). Inhibition of the transendothelial migration of human T lymphocytes by prostaglandin E2. *J Immunol* 152, 5703-5713.
- Paccani, S.R., Dal Molin, F., Benagiano, M., Ladant, D., D'Elia, M.M., Montecucco, C. and Baldari, C.T. (2008). Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 76, 2822-2832.
- Pan, M.R., Hou, M.F., Chang, H.C. and Hung, W.C. (2008). Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 11155-11163.
- Panzer, U. and Ugucioni, M. (2004). Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *Eur J Immunol* 34, 3682-3689.
- Petersen, K.U. and Reuss, L. (1983). Cyclic AMP-induced chloride permeability in the apical membrane of *Necturus gallbladder* epithelium. *J Gen Physiol* 81, 705-729.
- Randolph, G.J., Ochando, J. and Partida-Sanchez, S. (2008). Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 26, 293-316.
- Rangarajan, S., Enserink, J.M., Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Price, L.S., Schwede, F. and Bos, J.L. (2003). Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol* 160, 487-493.
- Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E.A., Wolthuis, R.M., Zwartkruis, F.J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C.D. and Bos, J.L. (2000). The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J Cell Biol* 148, 1151-1158.
- Rose, D.M. (2006). The role of the alpha4 integrin-paxillin interaction in regulating leukocyte trafficking. *Exp Mol Med* 38, 191-195.
- Rose, D.M., Alon, R. and Ginsberg, M.H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* 218, 126-134.
- Ross, P.J., Lavelle, E.C., Mills, K.H. and 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, 1568-1579.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S. and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.



- Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L. and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2006). The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 176, 5153-5159.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R. and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361.
- Scandella, E., Men, Y., Legler, D.F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B. and Groettrup, M. (2004). CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 103, 1595-1601.
- Scott, J.D. (2003). A-kinase-anchoring proteins and cytoskeletal signalling events. *Biochem Soc Trans* 31, 87-89.
- Sechi, A.S. and Wehland, J. (2004). ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci* 9, 1294-1310.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M. and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.
- Serezani, C.H., Ballinger, M.N., Aronoff, D.M. and Peters-Golden, M. (2008). Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 127-132.
- Schlegel, N. and Waschke, J. (2009). VASP is involved in cAMP-mediated Rac 1 activation in microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C453-462.
- Skinner, J.A., Pilione, M.R., Shen, H., Harvill, E.T. and Yuk, M.H. (2005). *Bordetella* type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. *J Immunol* 175, 4647-4652.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. and Cornelis, G.R. (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyoA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11998-12002.
- Spangler, B.D. (1992). Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 56, 622-647.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Tang, W.J. and Guo, Q. (2009). The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Mol Aspects Med* 30, 423-430.
- Tangirala, R.K., Murao, K. and Quehenberger, O. (1997). Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J Biol Chem* 272, 8050-8056.
- Thurnher, M., Ramoner, R., Gastl, G., Radmayr, C., Bock, G., Herold, M., Klocker, H. and Bartsch, G. (1997). *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria stimulate human blood dendritic cells. *Int J Cancer* 70, 128-134.
- Tiwari, S., Felekis, K., Moon, E.Y., Flies, A., Sherr, D.H. and Lerner, A. (2004). Among circulating hematopoietic cells, B-CLL uniquely expresses functional EPAC1, but EPAC1-mediated Rap1 activation does not account for PDE4 inhibitor-induced apoptosis. *Blood* 103, 2661-2667.
- Turnbull, P.C. (2002). Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr Top Microbiol Immunol* 271, 1-19.
- Van Epps, D.E. (1981). Suppression of human lymphocyte migration by PGE2. *Inflammation* 5, 81-87.
- Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2006). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* 9, 69-75.
- Weingart, C.L. and Weiss, A.A. (2000). *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* 68, 1735-1739.
- Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.M. and Robaye, B. (2001). The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 166, 7172-7177.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R. and Berkowitz, S.A. (1980). Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3841-3844.
- Wong, M.M. and Fish, E.N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15, 5-14.
- Worthylake, R.A. and Burridge, K. (2003). RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 278, 13578-13584.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T. and Frank, D.W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13899-13904.
- Yao, C., Sakata, D., Esaki, Y., Li, Y., Matsuoka, T., Kuroiwa, K., Sugimoto, Y. and Narumiya, S. (2009). Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 15, 633-640.
- Young, J.A. and Collier, R.J. (2007). Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem* 76, 243-265.