

Abstrakt

Adenylát-cyklázový toxin (CyaA) je klíčovým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis*. CyaA se váže na fagocyty produkující komplementový receptor 3 (CR3) a následně katalyzuje přeměnu vnitrobuněčného ATP na významného „druhého posla“ cAMP. Tímto paralyzuje schopnost neutrofilů a makrofágů zabít bakterie pomocí oxidativního vzplanutí a mechanismů závislých na fagocytóze. V této práci analyzujeme mechanismus, kterým CyaA blokuje produkci baktericidních reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů neutrofilů a makrofágů.

CyaA potlačuje produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl. „reactive oxygen species“) jednak prostřednictvím inhibice PLC přes PKA a dále nejspíše ovlivněním skládání komplexu NADPH oxidázy prostřednictvím aktivace proteinu Epac. Selektivní aktivace PKA nebo Epac blokovala produkci ROS indukovanou fMLP. Inhibice PKA pomocí specifických inhibitorů navíc vedla jen k částečnému obnovení produkce ROS u neutrofilů vystavených CyaA. Signalizace CyaA/cAMP následně omezila tvorbu DAG, zatímco tvorba PIP3 zůstala neovlivněna. Tyto výsledky naznačují, že působení CyaA může ovlivnit lipidické složení membrány fagocytů.

Dále jsme ukázali, že aktivace PKA pomocí cAMP vyvolává aktivaci tyrozinové fosfatázy SHP-1. To v makrofázích způsobí potlačení produkce reaktivních dusíkových radikálů (RNS, z angl. „reactive nitrogen species“). Selektivní aktivace PKA pomocí 6-Bnz-cAMP utlumila v makrofázích expresi iNOS stimulovanou LPS. Účinek toxinu byl pak zablokován po inhibici PKA. Signalizace CyaA/cAMP dále vyvolala defosforylaci c-Fos podjednotky transkripčního faktoru AP-1 v závislosti na aktivaci SHP-1, což vedlo ke zrušení exprese iNOS vyvolané signalizací TLR4. Snížení hladiny SHP-1 pomocí siRNA vedlo k obnovení produkce RNS v makrofázích aktivovaných TLR4 ligandy. Inhibice SHP fosfatáz nakonec snížila přežívání *B. pertussis* v makrofázích. Tyto výsledky odhalují novou signální dráhu, kterou cAMP aktivuje fosfatázu SHP-1 prostřednictvím aktivace signalizace PKA. SHP-1 pak může v leukocytech regulovat aktivitu celé řady receptorů. Působení CyaA tak prostřednictvím aktivace SHP-1 umožňuje *B. pertussis* uniknout před zabítím makrofágy produkujícími RNS.

Na základě získaných mechanismů jsme navrhli model signalizace vyvolané CyaA, kterou bakterie *B. pertussis* používá k potlačení baktericidní aktivity fagocytů hostitele.