

Název disertační práce: Adenylátcyklázový toxin bakterie
Bordetella pertussis: molekulární mechanismus působení
a jeho využití jako nosiče antigenů

Autor: Jana Kamanová

Souhrn

První část této disertační práce se věnuje molekulárnímu mechanismu působení adenylát-cyklázového toxinu (CyaA). Tento protein z rodiny RTX toxinů je sekretovaný gramnegativní bakterií *Bordetella pertussis*, která způsobuje infekční onemocnění nazývané černý kašel. CyaA hraje klíčovou roli ve schopnosti tohoto patogena kolonizovat sliznice horních cest dýchacích a to díky schopnosti potlačovat baktericidní funkce myeloidních fagocytujících buněk imunitního systému hostitele. CyaA se váže na integrin CD11b/CD18 (označovaný také jako CR3 nebo $\alpha_M\beta_2$) těchto buněk, vytváří v jejich buněčných membránách malé kation-selektivní kanály, a dopravuje do jejich cytozolu N-koncovou adenylát-cyklázovou (AC) doménu. Ta je po svém průniku do buněčného cytozolu aktivována navázáním eukaryotického kalmodulinu a katalyzuje velmi efektivní přeměnu ATP na cAMP, jednu z klíčových molekul buněčné signalizace. Tím dochází v napadených buňkách k nárůstu hladiny cAMP, což vyvolá rychlou ztrátu schopností fagocytózy pomocí Fc-receptorů a oxidativního vzplanutí těchto buněk.

CyaA má unikátní schopnost přenášet svou AC doménu do cytozolu buněk přímo z cytoplazmatické membrány. Celý proces je velmi pravděpodobně poháněn membránovým potenciálem, a vyžaduje strukturní integritu a kooperaci všech domén RTX podjednotky, posttranslační modifikaci CyaA zbytkem mastné kyseliny a fyziologické koncentrace vápenatých iontů. Zde jsme analyzovali 18 mutantních variant proteinu CyaA, které mají překrývající se delece v AC doméně a nesou CD8⁺ OVA epitop, a ukázali, že prvních 371 N-koncových aminokyselinových zbytků je postradatelných pro dopravu OVA epitopu do cytozolu dendritických buněk. To napovídá, že AC doména aktivně nepomáhá své dopravě, a procesu cytozolické penetrace se účastní jako pouhý cestující.

Dále jsme ukázali to, že CyaA inhibuje baktericidní aktivity makrofágů tím, že vyvolává neproduktivní morfologické změny a reorganizaci aktinového cytoskeletu. Jako

první jsme také pozorovali to, že velmi nízké koncentrace CyaA a následná cAMP signalizace způsobují v makrofázích rychlou, a skoro úplnou, inhibici komplementem zprostředkované fagocytózy. Podařilo se nám také ukázat, že reorganizace aktinového cytoskeletu a inhibice komplementem zprostředkované fagocytózy vyvolaná CyaA je způsobena inaktivací signalizace proteinu RhoA. Vedle toho jsme rovněž charakterizovali schopnost CyaA regulovat maturaci dendritických buněk a ukázali, že CyaA potlačuje expresi CD40 a CD54 molekul a zvyšuje produkci IL-10 po působení LPS. Dále jsme ukázali, že dendritické buňky jež byly vystaveny působení CyaA, mají nižší schopnost aktivovat proliferaci antigen-specifických CD4⁺ a CD8⁺ T buněk, a odhalili jsme klíčovou úlohu cAMP-aktivované PKA v těchto dějích. Naše výsledky prohloubily předchozí znalosti o působení CyaA na myeloidní efektorové buňky imunitního systému.

Druhá část této dizertační práce se zabývá použitím adenylát-cyklázového toxoidu (CyaA/AC⁻) s geneticky odstraněnou enzymatickou aktivitou, jako nového nereplikativního vektoru pro dopravu antigenů do antigen prezentujících buněk (APC). CyaA/AC⁻ toxoidy byly již dříve úspěšně využity k dopravě vložených bakteriálních, virových nebo nádorových antigenních epitopů do cytozolu APC a k navození specifické cytotoxické CD8⁺ T-buněčné (CTL) odpovědi. Zde jsme analyzovali schopnost CyaA-CSP toxoidů, které nesou CD8⁺ epitop z CSP (circumsporozoite protein) *Plasmodium berghei*, vyvolávat protektivní imunitní odpověď v myším modelu malárie.

Imunizace myší CyaA-CSP toxoidem vedla k indukci CSP-specifických CD8⁺ T buněk, ale nedošlo k navození protektivní imunitní odpovědi proti následné aplikaci sporozoitů *P. berghei*. Nicméně, pokud jsme podali anti-CTLA-4 protilátku během druhé („boost“) imunizace, nebo pokud byl CyaA-CSP použit v kombinaci s oslabeným kmenem bakteriální vakcíny *Salmonella*, která dopravovala CSP epitop do cytozolu buněk pomocí sekrečního aparátu typu tří, došlo ke zvýšení počtu indukovaných CSP-specifických CD8⁺ T buněk a k navození protektivní imunity. Tyto výsledky ukazují na potenciál CyaA toxoidů vzbuzovat protektivní imunitní odpověď proti parazitické infekci a zesilovat účinek jiných vakcín v heterologním schématu imunizace.

Klíčová slova: Adenylát-cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, vztah struktury a funkce, interakce mezi hostitelem a patogenem, doprava antigenů do buněk prezentujících antigen