

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

Signalizační působení adenylát-cyklázového toxinu na fagocyty
Signaling effects of adenylate cyclase toxin action on phagocytes

Mgr. Ondřej Černý

Praha, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Akademie věd České republiky

Autor: Mgr. Ondřej Černý

Školitel: prof. Ing. Peter Šebo, CSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Obsah.....	2
Souhrn	3
Úvod a cíle práce.....	4
Materiál a metodika.....	5
Výsledky a Diskuse.....	6
Závěry.....	10
Seznam použitých zkratk.....	12

Contents

Summary	13
Introduction and Aims of the Thesis	14
Materials and Methods	16
Results and Discussion.....	17
Conclusions	20
Abbreviations	21
Curriculum Vitae.....	22
Seznam publikací autora / List of publications	24
Publikace zahrnuté v disertační práci / Publications comprised within the thesis	24
Publikace nezahrnuté v disertační práci / Publications NOT comprised within the thesis ..	24
Použitá literatura / References.....	25

Souhrn

Adenylát-cyklázový toxin-hemolyzin (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 pomocí 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 pomocí PLC, zatímco tvorba PIP3 pomocí PI3K 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 z angl. „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, zatímco po vyřazení SHP-2 nedošlo ke změně produkce RNS. Inhibice SHP fosfatáz nakonec snížila přežívání *B. pertussis* v myších 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 zabitím makrofágy produkujícími RNS.

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

Úvod a cíle práce

I přes vysokou pročkovanost populace se ve vyspělých zemích opět zvyšuje incidence černého kašle. Toto onemocnění je způsobeno bakterií *Bordetella pertussis*, která zapříčiňuje závažné poškození imunitního systému v kolonizovaných horních cestách dýchacích. Faktory virulence, které umožňují *B. pertussis* kolonizovat nového hostitele, se dělí do tří tříd – faktory rezistence vůči komplementu, adhesiny a toxiny. Hlavní faktory rezistence vůči komplementu jsou autotrasportéry BrkA (z angl. „*Bordetella* resistance to killing A“) a Vag8 (z angl. „virulence activated gene 8“). Nejdůležitějšími adhesiny jsou filamentózní hemagglutinin, pertactin, fimbrie a tracheální kolonizační faktor. Mezi toxiny je třeba zmínit pertusový toxin, tracheální cytotoxin a dermonekrotický toxin. Bylo ale ukázáno, že klíčovou roli v patogenezi černého kašle hraje adenylátcyklázový toxin (CyaA).

CyaA se řadí do rodiny RTX (z angl. „Repeat in ToXin“) proteinů a váže se na komplementový receptor 3 (CR3, integrin CD11b/CD18). Díky tomu cílí svoje působení na fagocytické buňky vrozeného imunitního systému. Vazba CyaA na receptor vede buďto k tvorbě pórů selektivních pro kationty v plazmatické membráně, nebo k přenosu adenylát-cyklázové domény (AC, z angl. „Adenylate Cyclase“) toxinu do cytosolu cílové buňky. AC doména v cytosolu přeměňuje buněčné ATP na cAMP, které v buněčné signalizaci hraje úlohu „druhého posla“. Již dříve bylo ukázáno, že vysoká vnitrobuněčná koncentrace cAMP vede k zastavení fagocytózy, k inhibici produkce superoxidových radikálů a k blokování tvorby neutrofilových mimobuněčných pastí (NET, z angl. „neutrophil extracellular trap“), stejně jako ovlivňuje dozrávání dendritických buněk a prezentaci jimi pohlcených antigenů. Tvorba cAMP způsobená CyaA v kombinaci s tvorbou membránových pórů společně přispívají k cytotoxicitě toxinu.

Ačkoliv je působení CyaA na imunitní buňky dobře prozkoumáno, nebyly dosud popsány signální dráhy aktivované CyaA, které regulují uvedené jevy. Ještě méně je známo o vlivu jednotlivých aktivit CyaA na signální dráhy které regulují baktericidní aktivity hostitele.

Na základě těchto znalostí jsme stanovili následující cíle této práce:

- 1) Prozkoumat úlohu jednotlivých aktivit CyaA na hlavní baktericidní pochody vrozené imunity jako je produkce reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů a na procesy vedoucí k aktivaci získaných imunitních pochodů a**
- 2) popsat signální dráhy regulující zmíněné jevy**

Materiál a metodika

K vypracování této práce byly použity primární lidské neutrofilny a myší dendritické buňky a makrofágy odvozené z kostní dřene. Dále byly použity buněčné linie lidských monocytů THP-1 a myší makrofágové linie RAW264.7 a J774A.1. Použití myších buněk nám umožnilo studovat signalizační dráhy, které by nebylo možno studovat s použitím primárních lidských buněk. Pro zjišťování vlivu CyaA na imunitní buňky jsme použili rekombinantní CyaA produkovaný v *E. coli* a také divoký kmen *B. pertussis* Tohama I. Používali jsme také mutované kmény *B. pertusis* Tohama I. Dále jsme použili následující metody:

- Produkce rekombinantních proteinů v *E. coli*
- Kolorimetrická detekce extracelulárních radikálů
- Analýza membránového složení pomocí hmotnostní spektrometrie
- Detekce proteinů a vnitrobuněčného cAMP pomocí metody ELISA
- Buněčná analýza pomocí FACS
- *In vitro* detekce enzymatické aktivity
- Purifikace a detekce proteinů pomocí protilátek (imunoprecipitace a western blotting)
- Fluorescenční mikroskopie
- Isolace mRNA a analýza cDNA pomocí q-PCR
- Umlčení genové exprese pomocí siRNA

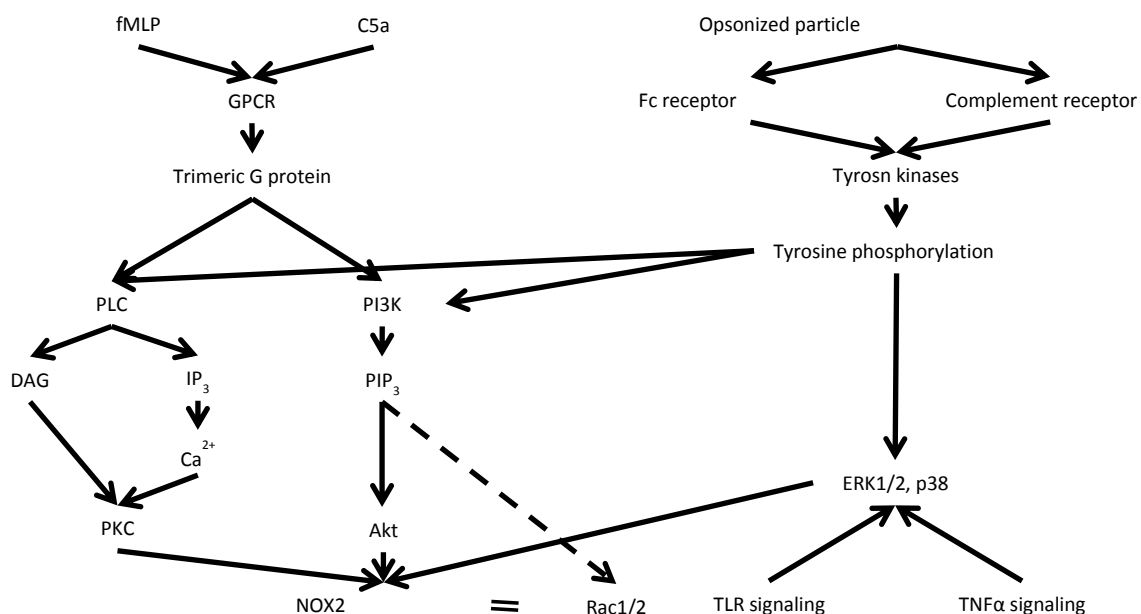
Výsledky a Diskuse

Černý kašel způsobený bakterií *Bordetella pertussis* je onemocnění s nedostatečně prostudovaným mechanismem patogeneze. Kromě toho se opět začíná objevovat ve vyspělém světě. Hlubší charakterizace procesů zahrnutých v interakci *B. pertussis* se systémem vrozené imunity hostitele je proto velmi důležité. V této disertační práci popisujeme, jak CyaA, který je klíčovým faktorem virulence bakterie *B. pertussis*, moduluje baktericidní mechanismy hostitele. Přežívání *B. pertussis* uvnitř hostitelského organismu je závislé hlavně na schopnosti potlačovat produkci ROS a RNS neutrofilů a makrofágy. Potvrdili jsme, že enzymatická aktivita adenylát-cyklázového toxinu hraje klíčovou roli v úniku bakterie *Bordetella pertussis* před mechanismy vrozené imunity. Naše výsledky potvrzují již publikovaná pozorování, ukazující důležitost CyaA pro virulenci *B. pertussis* (Goodwin and Weiss, 1990; Khelef et al., 1994; Khelef et al., 1992).

I přes zde ukázanou citlivost k oxidativnímu stresu jsou bakterie *Bordetella pertussis* schopné růstu v přítomnosti primárních lidských neutrofilů a dokáží též přežít uvnitř buněk po fagocytóze myšími makrofágy. Tyto výsledky ukazují, že bakterie *B. pertussis* je schopna prostřednictvím CyaA blokovat oxidativní vzplanutí myeloidních fagocytů, které vede k zabíjení pohlcených bakterií.

Ve shodě s ostatními pracemi zde ukazujeme, že CyaA produkovaný *B. pertussis* inhibuje produkci ROS v primárních lidských neutrofilech (Confer and Eaton, 1982; Eby et al., 2014; Friedman et al., 1987). Toho je dosaženo díky enzymatické aktivitě CyaA, tedy produkci cAMP, a na ní závislé aktivaci proteinové kinázy A (PKA) a proteinu Epac (z angl. „exchange protein directly activated by cAMP“). Aktivovaná PKA dále blokuje fosfolipázu C (PLC). V důsledku toho nedochází ke štěpení fosfatidylinositol 4,5-bisfosfátu (PI(4,5)P₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trisfosfát (IP₃), což neumožňuje aktivaci proteinové kinázy C (PKC). Produkce ROS stimulovaná přímou aktivací PLC (pomocí m-3M3FBS (Bae et al., 2003)) byla také potlačena aktivitou CyaA. Dále jsme ověřili působení CyaA na PLC přímou aktivací PKC pomocí PMA (z angl. „phorbol 12-myristate 13-acetate“). Produkce ROS vyvolaná přímou aktivací PKC se ukázala být rezistentní k působení CyaA, což ukazuje, že vliv CyaA na produkci ROS se odehrává již před aktivací PKC. Toto je ale v rozporu s dříve publikovanými výsledky (Eby et al., 2014), což může být vysvětleno buď neúplnou aktivací PKC pomocí nízkých koncentrací PMA, jakých použili Eby a kol. (Eby et al., 2014), nebo jistou mírou selektivity působení CyaA proti PKC β , na kterou se Eby a kol. ve své práci

zaměřovali (Gray et al., 2013). Dále zde ukazujeme, že působení CyaA nevyvolává inhibici tvorby fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfátu (PI(3,4,5)P3) pomocí PI3K (z angl. „phosphatidylinositol 3 kinase“), jež je aktivována zároveň s PLC a jejíž aktivita je také nezbytná pro produkci ROS (Rommel et al., 2007). Schéma signalizace vedoucí k produkci ROS je znázorněno na Obr. 1. Protein Epac nejspíše blokuje skládání komplexu NADPH oxidázy a to za přispění malé GTPázy Rap1. Rap1 se pravděpodobně váže na p47^{PHOX} podjednotku NADPH oxidázy a tím jí zadržuje v cytoplasmě a brání jejímu kontaktu se zbytkem komplexu. Toto je v souladu s pozorováním podobného efektu u buněk pigmentového epitelu oka (Wang et al., 2014). V rozporu s inhibicí produkce ROS primárními neutrofily není CyaA toxin schopen inhibovat produkci ROS neutrofily, které byly předem vystaveny působení TNF α . TNF α je v očkovaných zvířatech produkováno makrofágy po jejich opětovném rozpoznání antigenu (Macdonald-Fyall et al., 2004). Tento fakt může vysvětlit, proč jsou neutrofily důležité pro eliminaci infekce *B. pertussis* v očkovaných experimentálních zvířatech, ale ne v naivním hostiteli, kde jsou neutrofily citlivé k působení CyaA (Andreasen and Carbonetti, 2009).



Obr. 1: Schematické znázornění signálních drah vedoucích ke složení komplexu NOX2 a k následné produkci ROS v neutrofilech.

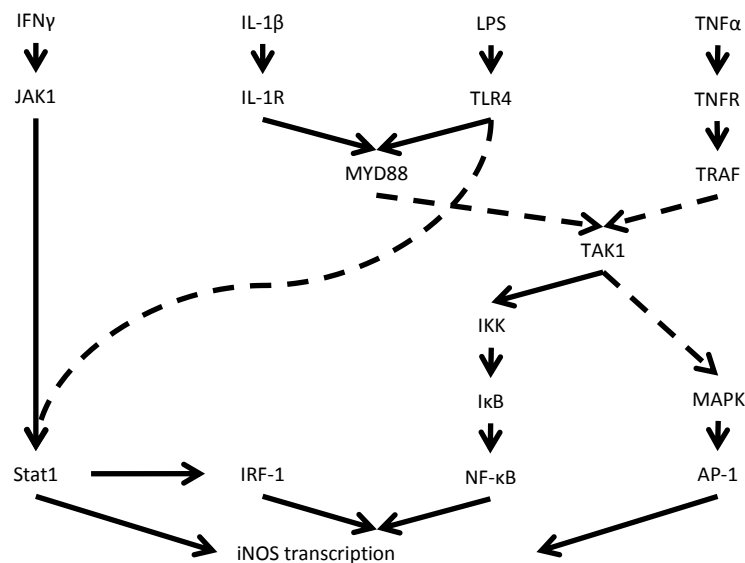
Fig. 1: Schematic representation of signaling pathways leading to the assembly of NOX2 complex and ROS production in neutrophils.

Dále jsme jako první ukázali, že CyaA blokuje produkci RNS (Cerny et al., 2015). Schopnost *B. pertussis* inhibovat produkci RNS je striktně závislá na enzymatické aktivitě CyaA, podobně jako je tomu v případě inhibice produkce ROS. Na rozdíl od inhibice

produkce ROS je ale inhibice produkce RNS způsobena pouze aktivací PKA, a protein Epac pravděpodobně nehraje v tomto procesu žádnou roli. Dále jsme ukázali, že v procesu inhibice produkce RNS nehrají žádnou roli arginázy, jejichž vliv se předpokládal, protože by s iNOS mohly kompetovat o společný substrát L-arginin (Cheung et al., 2008). I tento výsledek podporuje naše výsledky, které ukazují, že vliv CyaA na inhibici produkce RNS se odhrává na úrovni blokace transkripce genu pro indukovatelnou NO syntázu (iNOS, z angl. „inducible NO synthase“). Transkripce iNOS je řízena čtyřmi hlavními transkripčními faktory – NF- κ B, Stat1, IRF1 a AP-1 (Kleinert et al., 2003; Lee et al., 2005; Pautz et al., 2010). Proto jsme dále ověřili aktivitu těchto transkripčních faktorů. Zablokování exprese iNOS toxinem CyaA nebyla dána inhibicí Stat1 ani IRF1. CyaA také zvyšoval aktivitu NF- κ B stimulovanou LPS, což je v souladu s již publikovaným pozorováním, že cAMP může aktivovat NF- κ B (Qi et al., 2009). CyaA pomocí produkce cAMP účinně inhiboval transkripční faktor AP-1 prostřednictvím aktivace tyrozinové fosfatázy SHP-1/2 (z angl. „SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase“), což jsme ukázali pomocí inhibitoru SHP-1/2 (NSC87877), který částečně obnovil fosforylaci AP-1. CyaA pravděpodobně inhibuje AP-1 pomocí aktivované SHP, jejíž vliv je nejspíše dán blokací signalizace proteinových kináz aktivovaných látkami navozujícími mitózu (MAPK, z angl. „Mitogen-Activated Protein Kinases“), pravděpodobně zejména Jun N-koncovou kinázou (JNK). Snížení hladiny SHP-1 isoformy, ale ne SHP-2 isoformy, pomocí siRNA vedlo k obnovení produkce RNS v makrofázích vystavených působení CyaA. Podobný vliv SHP-1 na zastavení transkripce genu pro iNOS byl již pozorován v myších makrofázích infikovaných *Leishmanií donovani*. V daném případě byla ale SHP-1 aktivována odlišným mechanismem závislým na proteáze (Blanchette et al., 2009; Gomez et al., 2009). V této disertační práci jsme také chtěli ověřit již dříve popsanou roli AKT a PI3K v produkci RNS (Tsukamoto et al., 2008). Oproti očekávání jsme ale v našem systému myších makrofágů žádný vliv AKT ani PI3K nepozorovali. Klíčovým proteinem v námi popsané signální dráze tak zůstává SHP-1, jejíž inhibice vedla k ukončení přežívání *B. pertussis* uvnitř makrofágů po fagocytóze.

Kromě inhibice produkce baktericidních ROS a RNS může v přežívání divokého kmene *B. pertussis* v porovnání s mutantními kmeny (Khelef et al., 1992); Skopova *et al.*, v revizi) hrát roli i indukce apoptózy monocytických buněk (Hewlett et al., 2006; Khelef and Guiso, 1995); Ahmad *et al.*, v tisku). Ukázali jsme, že za apoptózu monocytů způsobenou nízkými koncentracemi CyaA stojí zvýšení hladiny proteinu BimEL vyvolávajícího buněčnou smrt a následná vazba proteinu vyvolávajícího buněčnou smrt Bax do membrány mitochondrií

(Ahmad *et al.*, v tisku). Tyto procesy vyžadovaly signalizaci cAMP/PKA a závisely na zvýšené aktivitě SHP-1, jak jsme ukázali selektivním snížením hladiny této fosfatázy. Kromě toho cAMP produkované CyaA také blokoval signalizaci AKT nezbytnou pro přežívání buněk. Tím také cAMP zvýšil aktivitu transkripčního faktoru FoxO3a a vyvolalo zvýšenou expresi proteinu Bim. Současná aktivace FoxO3a a SHP-1 tedy umožnila CyaA rychlé a dlouhodobé zvýšení hladiny BimEL a tím i navození apoptotického programu v buňkách vrozeného imunitního systému hostitele (Ahmad *et al.*, v tisku).



Obr. 2: Schematické znázornění signálních drah vedoucích k expresi iNOS a k následné produkci RNS v makrofázích.

Fig. 2: Schematic representation of signaling pathways leading to iNOS expression and NO production in macrophages.

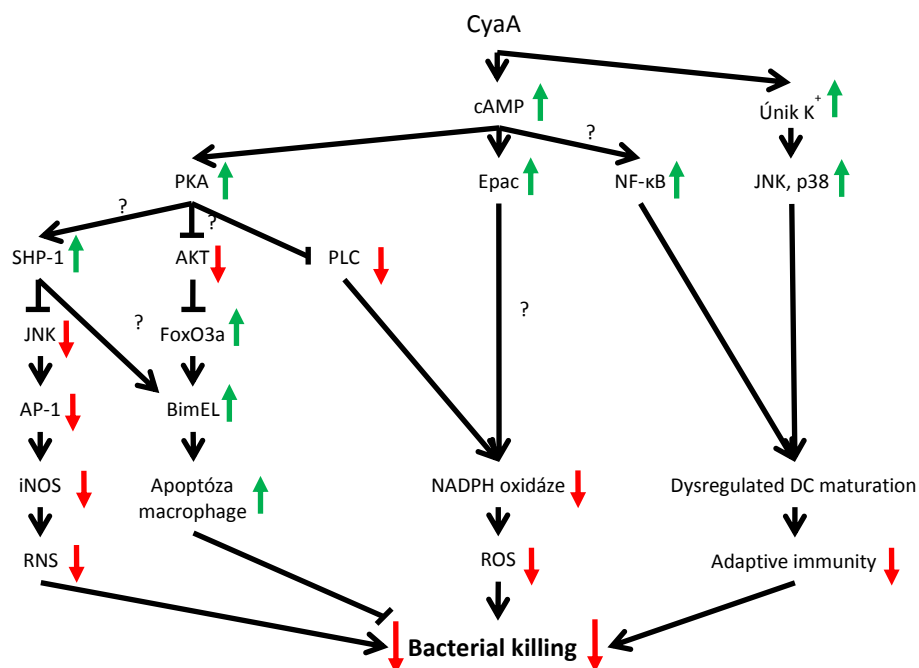
Vliv CyaA na signalizace MAPK a jejich prostřednictvím na ovlivnění imunitních funkcí leukocytů se studoval již dříve. Kromě našich pozorování že CyaA využívá inhibice JNK k zastavení produkce RNS bylo již také popsáno, že v dendritických buňkách a T lymfocytech může CyaA aktivovat p38 (Hickey *et al.*, 2008; Rossi Paccani *et al.*, 2009). To by také mohlo vést k pozměnění adaptivní imunity proti *B. pertussis* (Adkins *et al.*, 2014; Boyd *et al.*, 2005) Svedova *et al.*, v revizi). V této disertační práci také ukazujeme, že pórtvorná aktivita CyaA, na rozdíl od jeho enzymatické aktivity, aktivuje JNK a p38 MAPK. Toto následně vede k pozměněné genové expresi a nakonec ke změně dozrávání DC a může tedy vysvětlit adjuvantní vliv toxoidu CyaA-AC, který se plánuje použít v imunoterapii nádorových onemocnění (Adkins *et al.*, 2014; Sebo *et al.*, 2014; Svedova *et al.*, v revizi).

Závěry

V této práci popisujeme signalizační dráhy ovlivněné CyaA, které vedou k potlačení vrozené imunity původcem černého kašle – bakterií *Bordetella pertussis*.

- 1) Ukázali jsme, že *B. pertussis* využívá enzymatické aktivity toxinu CyaA k prodloužení svého přežívání po kontaktu s buňkami vrozeného imunitního systému a k tomu, aby se vyhnula zabití látkami způsobujícími oxidativní stress.
- 2) Ukázali jsme, že toxin CyaA využívá aktivace PKA i Epac aby způsobil zastavení produkce ROS neutrofilů.
- 3) Identifikovali jsme PLC jako důležitý cíl, jehož inhibicí CyaA zastavuje produkci ROS neutrofilů.
- 4) Naše výsledky naznačují jakým mechanismem může očkování přes aktivaci antigen-specifické odpovědi makrofágů přispívat k odolnosti vůči působení CyaA a k ochraně pokusných zvířat před infekcí *B. pertussis*.
- 5) Ukázali jsme, že aktivace PKA vyvolaná CyaA je dostatečná pro zastavení produkce NO a exprese iNOS v makrofázích, což je rozdílné od mechanismu zastavení produkce ROS.
- 6) Popsali jsme, že enzymatická aktivita CyaA je zodpovědná za inhibici transkripčních faktorů Stat1 a IRF1 a signalizace JNK, ale že také zvyšuje aktivitu transkripčního faktoru NF- κ B. Kromě toho jsme ukázali, že pórótvorná aktivita CyaA aktivuje JNK a p38. Toto ovlivnění signalizačních drah vede ke změně genové exprese a následně k pozměněnému dozrávání dendritických buněk.
- 7) ukázali jsme, že enzymatická aktivita CyaA blokuje expresi iNOS, která je závislá na transkripčním faktoru AP-1. Toho je dosaženo pomocí aktivace tyrosinové fosfatázy SHP-1.
- 8) Ukázali jsme, že aktivace SHP-1 toxinem CyaA je klíčový krok umožňující přežívání *B. pertussis* uvnitř makrofágů.
- 9) Ukázali jsme, že inhibice AKT v důsledku signalizace cAMP produkovaným toxinem CyaA je důležitá pro způsobení apoptózy v monocytech, ale nemá žádný vliv na inhibici produkce NO.

10) Získané poznatky shrnujeme v modelu znázorňujícím ovlivnění signálních drah toxinem CyaA, který je ukázán na Obr. 3



Obr. 3: Schématické znázornění signalizace vyvolané CyaA ve fagocytických buňkách vrozeného imunitního systému. Po vazbě na receptor umožňuje CyaA únik draselných kationtů z cytozolu cílové buňky, nebo dopravuje AC doménu do jejího cytozolu.

V cytozolu je AC doména toxinu CyaA aktivována vazbou buněčného kalmodulinu a následně katalyzuje přeměnu cytosolického ATP na cAMP. To aktivuje PKA a Epac. Aktivace PKA vede, dosud neznámým mechanismem, k aktivaci fosfatázy SHP-1, která způsobuje defosforylaci a snížení aktivity c-Fos – podjednotky transkripčního faktoru AP-1. Toto v makrofázích aktivovaných LPS následně zabraňuje expresi iNOS a produkci NO. PKA také inhibuje neznámým mechanismem AKT, což vede k aktivaci transkripčního faktoru FoxO3a, který společně s SHP-1 vyvolává programovanou buněčnou smrt závislou na proteinu Bim. Inhibice PLC závislá na aktivaci PKA zabraňuje skládání komplexu NADPH oxidázy a produkci ROS. Na tom se dosud neznámým mechanismem podílí i Epac aktivovaný CyaA.

Únik draselných kationtů z cytozolu dendritických buněk způsobuje aktivaci MAPK. To vede, společně s aktivací NF-κB pomocí signalizace cAMP, ke změně dozrávání dendritických buněk a ke změně specifické imunitní odpovědi proti *B. pertussis*.

Blok produkce ROS a RNS, indukce apoptózy a změna adaptivní imunity dohromady umožňují přežívání *Bordetella pertussis* v infikovaném hostiteli.

Fig. 3: Scheme of the CyaA-provoked signaling in cells of innate immune system. After binding of CyaA to the receptor, the toxin promotes pore-dependent potassium efflux and delivers the AC domain into the cytosol of phagocytes.

There, the AC domain of CyaA is activated by the binding of calmodulin and catalyzes uncontrolled conversion of cytosolic ATP into cAMP. This activates PKA- and Epac-dependent signaling. By an as yet uncharacterized mechanism, PKA activation leads to the enhancement of activity of the SHP-1 phosphatase, which yields dephosphorylation and loss of activity of the c-Fos subunit of the transcription factor AP-1. The loss of P-c-Fos function then prevents iNOS expression and NO production in TLR-activated macrophages. PKA simultaneously inhibits AKT by a mechanism that remains unknown. This leads to the activation of FoxO3a, which together with activated SHP-1 promotes Bim-dependent apoptosis. PKA-dependent inhibition of PLC together with an as yet unknown Epac-dependent mechanism leads to the blocking of NADPH assembly and the inhibition of ROS production.

Further, the potassium efflux through CyaA-formed pores activates MAPKs in DCs. This leads, together with cAMP-activated NF-κB translocation into cell nuclei, to dysregulation of maturation of DCs and to the shift in the development of anti-*Bordetella* adaptive immunity.

Block of ROS and RNS production, induction of apoptosis, and dysregulation of adaptive immune responses finally facilitate the survival of *Bordetella pertussis* in the infected host.

Seznam použitých zkratek

AC	Adenylát-Cykláza
AP-1	z angl. „Activator Protein 1“
ATP	adenosintrifosfát
<i>B.p. cyaA-wt</i>	<i>Bordetella pertussis</i> produkující divoký typ toxinu CyaA
<i>B.p. cyaA-AC</i>	<i>Bordetella pertussis</i> produkující detoxifikovaný toxin CyaA-AC
<i>B.p. ΔcyaA</i>	<i>Bordetella pertussis</i> obsahující delecí genu <i>cyaA</i> v čtecím rámci
6-Bnz-cAMP	N ⁶ - Benzoyladenoin- 3', 5'- cyklický monofosfát
cAMP	adenoin 3',5'- cyklický monofosfát
8-CPT-cAMP	8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenoin-3',5'- cyklický monofosfát
CyaA	adenylát-cyklázový toxin, ACT
CR3	komplementový keceptor 3, integrin CD11b/CD18, α _M β ₂ , Mac1
DAG	diacylglycerol
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Fenylalanin
iNOS	indukovatelná NO syntáza, NOS2
IRF	z angl. „Interferon Regulatory Factor“
LPS	lipopolysacharid
MAPK	z angl. „Mitogen-Activated Protein Kinase“
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-κB	z angl. „Nuclear Factor κB“
NO	oxid dusnatý
PI3K	z angl. „PhosphoInositide 3-kinase“
PIP3	fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát
PKA	cAMP závislá Proteinová Kináza A
PLC	fosfolipáza C
ROS	reaktivní kyslíkové radikály, z angl. „reactive oxygen species“
RNS	reaktivní dusíkové radikály, z angl. „reactive nitrogen species“
RTX	z angl. „Repeat in ToXin“
SHP	z angl. „SH2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase“
siRNA	z angl. „small interfering RNA“
Stat	z angl. „Signal Transducer and Activator of Transcription“
TLR	z angl. „Toll-Like Receptor“

Summary

The adenylate cyclase toxin (CyaA) plays a key role in virulence of *Bordetella pertussis*. CyaA penetrates CR3-expressing phagocytes and catalyzes the uncontrolled conversion of cytosolic ATP to the key second messenger molecule cAMP. This paralyzes the capacity of neutrophils and macrophages to kill bacteria by oxidative burst and opsonophagocytic mechanisms. Here we analyzed the mechanisms by which CyaA suppresses the production of bactericidal reactive oxygen and nitrogen species in neutrophils and macrophages, respectively.

The inhibition of reactive oxygen species (ROS) production by cAMP signaling of CyaA is most-likely achieved by the combined PKA-dependent inhibition of PLC and Epac-dependent dysregulation of NADPH oxidase assembly. Activation of PKA or Epac by cAMP interfered with fMLP-induced ROS production and the inhibition of PKA partially reversed the CyaA-mediated inhibition of ROS production. CyaA/cAMP signaling then inhibited PLC-dependent DAG formation, while the PI3K-dependent PIP3 formation was not influenced. These results suggest that cAMP produced by CyaA influences the composition of target membranes.

We further show here that cAMP signaling through the PKA pathway activates the tyrosine phosphatase SHP-1 and suppresses the production of reactive nitrogen species (RNS) in macrophages. Selective activation of PKA interfered with LPS-induced iNOS expression in macrophages, while the inhibition of PKA largely restored the production of iNOS in CyaA-treated murine macrophages. CyaA/cAMP signaling induced SHP phosphatase-dependent dephosphorylation of the c-Fos subunit of the transcription factor AP-1 and thereby inhibited the TLR4-triggered induction of iNOS gene expression. Selective siRNA knockdown of the phosphatase SHP-1, but not of SHP-2, then rescued the production of TLR-inducible RNS in toxin-treated cells. Finally, the inhibition of SHP phosphatase abrogated *B. pertussis* survival inside murine macrophages. These results reveal that an as yet unknown cAMP-activated signaling pathway controls SHP-1 phosphatase activity and may regulate numerous receptor signaling pathways in leukocytes. The hijacking of SHP-1 by CyaA action then enables *B. pertussis* to evade RNS-mediated killing inside macrophages.

In conclusion, we propose a model of CyaA-provoked signaling which allows *Bordetella pertussis* to evade killing by the sentinel cells of the host immune system.

Introduction and Aims of the Thesis

Despite the high rates of acellular pertussis vaccine intake, whooping cough is a reemerging disease in developed countries. This respiratory illness is caused by a Gram-negative coccobacillus *Bordetella pertussis* that inhibits host immune functions by production of a whole range of virulence factors. These can be roughly divided into three classes: complement resistance factors, adhesins, and toxins. The main complement resistance factors are autotransporters BrkA (*Bordetella* resistance to killing A) and Vag8 (virulence activated gene 8). Among the adhesins, filamentous hemagglutinin, pertactin, fimbriae, and tracheal colonization factor are the most important. Of the known toxins of *B. pertussis*, the pertussis toxin, tracheal cytotoxin, dermonecrotic toxin, and adenylate cyclase toxin (CyaA) appear to play a prominent role in virulence. In this thesis, we focused on the role of CyaA that was shown to be an essential virulence factor of *B. pertussis*.

CyaA belongs to the RTX (Repeat in ToXin) protein family and through binding of the complement receptor 3 (CR3, CD11b/CD18 integrin) it targets the phagocytic cells of the innate immune system. After binding to the receptor, CyaA either permeabilizes cellular membrane by a cation-selective pore or delivers its adenylate cyclase (AC) domain into the cytosol of target cells. After translocation, the AC domain converts cellular ATP into the second messenger cAMP. The production of cAMP by CyaA was repeatedly shown to block phagocytosis, superoxide production, neutrophil extracellular trap (NET) formation, as well as dendritic cell maturation and antigen presentation. In addition, both CyaA-mediated cAMP production and pore-formation were shown to contribute to CyaA-provoked cytotoxicity.

In this thesis, the impact of CyaA toxin action on the most important bactericidal activities of phagocytes, such as the production of reactive oxygen and nitrogen species, and on dendritic cells activation of the adaptive immune system, is characterized. A description of the signaling pathways involved in the CyaA-provoked inhibition of the immune response to *B. pertussis* is also provided.

Although the global effect of CyaA action on immune cells has been extensively studied, the exact mechanism of CyaA action and signaling pathways activated by this toxin remain poorly characterized. Even less is known about the effects of particular CyaA activities on signaling leading to disruption of bactericidal activities of host cells.

To clarify these issues, the aims of the thesis were as follows:

- 1) to characterize the impact of CyaA action on the most important bactericidal activities of phagocytes, such as the production of reactive oxygen and nitrogen species, and on processes leading to the activation of the adaptive immune system and**
- 2) to describe the signaling pathways involved in CyaA-provoked inhibition of the innate immune response to *B. pertussis*.**

Materials and Methods

To accomplish our study, we used primary human neutrophils and primary mouse bone marrow-derived dendritic cells and macrophages, as well as the human monocytic cell line THP-1 and mouse macrophage-like cell lines RAW264.7 and J774A.1. Mouse cells enabled us to study signaling pathways that cannot be studied in human cells. To describe the influence of CyaA on immune cells, we used recombinant CyaA produced in *E. coli*. We also used the *B. pertussis* wild-type strain Tohama I, as well as strains with mutations in CyaA gene. We further used following methods:

- Production of recombinant proteins in *E. coli*
- Colorimetric and fluorimetric detection of extracellular radicals
- Analysis of membrane composition using mass spectrometry
- Detection of protein and cAMP using ELISA
- Cell analysis using FACS
- Detection of enzymatic activity *in vitro*
- Purification and immunodetection of proteins (immunoprecipitation and western blotting)
- Fluorescence microscopy
- mRNA isolation and cDNA analysis using q-PCR
- Gene silencing using siRNA

Results and Discussion

Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* is a reemerging disease with an insufficiently understood mechanism of pathogenesis. Deeper characterization of processes involved in the interaction of *B. pertussis* with the innate immune system is, therefore, of high importance. In this thesis, we describe how CyaA, a key virulence factor of *Bordetella pertussis*, modulates bactericidal mechanisms of the host. *B. pertussis* survival is mainly dependent on its ability to inhibit ROS and RNS production by neutrophils and macrophages, respectively. We confirmed that the enzymatic activity of the adenylate cyclase toxin plays a crucial role in *Bordetella* escape from innate immunity control. This is in agreement with the already published studies showing the importance of CyaA for *B. pertussis* virulence (Goodwin and Weiss, 1990; Khelef et al., 1994; Khelef et al., 1992).

In this thesis, we show that *Bordetella pertussis* is able to proliferate in the presence of primary human neutrophils and also to survive for limited period of time after phagocytosis by mouse macrophages despite its sensitivity to oxidative stress observed here. This result suggests the ability of *B. pertussis* to block bactericidal oxidative burst in myeloid phagocytes.

In line with others, we show here that action of *B. pertussis* CyaA inhibits production of ROS by primary human neutrophils (Confer and Eaton, 1982; Eby et al., 2014; Friedman et al., 1987). We show that this is achieved by the CyaA enzymatic activity-dependent production of cAMP and activation of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by cAMP (Epac). PKA action leads to block of phospholipase C (PLC)-dependent cleavage of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) into diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) thus compromising activation of protein kinase C (PKC). ROS production stimulated by a direct activation of PLC (by m-3M3FBS, (Bae et al., 2003)) was also sensitive to CyaA action. Targeting of PLC by CyaA was verified also by the resistance of PKC-dependent ROS production (stimulated by a direct PKC activation by PMA) to CyaA-provoked signaling. The resistance of PKC to CyaA action is, however, in contrast with some previously published observations (Eby et al., 2014). This difference may be explained either by incomplete activation of PKC by Eby and coworkers, who used suboptimal PMA concentration (Eby et al., 2014), or by PKC isoform selectivity, as Eby and coworkers evaluated the effects on PKC β only (Gray et al., 2013). In contrast to PLC, CyaA was unable to inhibit phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃) formation by

PI3K, which is activated in parallel to PLC and is also needed for ROS production (Rommel et al., 2007). The most important signaling pathways for the induction of NOX2 assembly are depicted on Fig. 1 (see the page 7). Simultaneously with PKA-mediated signaling, Epac protein most-likely blocks the NADPH oxidase complex assembly by activation of small GTPase Rap1. Rap1 probably sequesters the p47^{PHOX} NADPH oxidase subunit in the cytoplasm, away of the rest of the complex. This is in agreement with the mechanism observed in retinal pigment epithelium (Wang et al., 2014). In contrast, CyaA was unable to block ROS production by primed neutrophils, which can clarify why neutrophils are crucial for *B. pertussis* clearance from immunized mice, while playing no role in naïve host (Andreasen and Carbonetti, 2009).

We also showed for the first time that CyaA causes inhibition of RNS production (Cerny et al., 2015). As in the case of inhibition of ROS production, *B. pertussis* ability to inhibit RNS production is strictly dependent on enzymatic activity of CyaA. On the other hand, only the activity of PKA is needed to block RNS production by CyaA. In contrast with a previous hypothesis (Cheung et al., 2008), we showed that arginases play no role in the CyaA-provoked block of RNS production. The inhibition of RNS production by CyaA is acting already on the transcriptional level, thus blocking expression of the RNS producing enzyme, the inducible NO synthase (iNOS). The signaling pathways leading to iNOS expression are illustrated in Fig. 2 (see the page 9). iNOS expression is under the control of four main transcription factors – NF- κ B, Stat1, IRF1, and AP-1 (Kleinert et al., 2003; Lee et al., 2005; Pautz et al., 2010). We therefore evaluated activity of these transcription factors. Block of iNOS expression did not result from inhibition of Stat1 or IRF1. Moreover, CyaA potentiated activity of NF- κ B, which goes well with already observed activation of NF- κ B by cAMP (Qi et al., 2009). In contrast, CyaA/cAMP potently inhibited transcription factor AP-1 by the activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP). The inhibition of AP-1 was reverted by the action of SHP-1/2 inhibitor NSC87877. Inhibition of AP-1 was achieved by blocking of MAPK signaling, probably of JNK. Selective siRNA knockdown of the SHP-1 isoform, but not of the SHP-2 isoform, rescued the production of RNS in CyaA-treated macrophages. The role of SHP-1 in blocking iNOS expression was already observed in mouse macrophages infected with *Leishmania donovani*. This was, however, due to a very different protease-dependent mechanism (Blanchette et al., 2009; Gomez et al., 2009). We also evaluated the described role of AKT/PI3K signaling in the RNS production (Tsukamoto et al., 2008). We have, however, found no role of AKT and PI3K in the RNS production in

the cellular model used here. Inhibition of SHP-1 further blocked the survival of *B. pertussis* in macrophages.

On the other hand, the increased survival of wild-type *B. pertussis*, as compared to mutant strains, in experimental infection models (Khelef et al., 1992; Skopova *et al.*, under revision) may also be due to the CyaA-induced apoptosis of monocytic cells (Basler et al., 2006; Khelef and Guiso, 1995) Ahmad *et al.*, in print). We showed that the apoptosis of monocytes provoked by low doses of CyaA was due to the accumulation of the pro-apoptotic BimEL protein and the association of the pro-apoptotic factor Bax with mitochondria (Ahmad *et al.*, in press). This required cAMP/PKA signaling and depended on SHP-1 activity, being selectively inhibited upon siRNA knockdown of SHP-1. Moreover, signaling of CyaA-produced cAMP further inhibited the AKT pro-survival cascade, enhancing activity of the FoxO3a transcription factor and inducing *Bim* transcription. Hence, synergy of the FoxO3a activation with SHP-1 hijacking enabled the toxin to rapidly trigger a persistent accumulation of BimEL, thus activating the pro-apoptotic program of phagocytes and subverting the innate immunity of the host (Ahmad *et al.*, in press).

It was previously hypothesized that CyaA influences different MAPK pathways leading to dysregulation of immune functions of leukocytes. In addition to our above described finding that CyaA employs the inhibition of JNK to decrease NO production, p38 was shown to be activated by CyaA in DCs and T lymphocytes (Hickey et al., 2008; Rossi Paccani et al., 2009), which would also lead to change in development of a proper adaptive immune response (Adkins et al., 2014; Boyd et al., 2005; Svedova *et al.*, under revision). We show that, in contrast to its enzymatic activity, pore-forming capacity of CyaA stimulates JNK and p38 MAPK. This leads to altered gene expression patterns and finally yields dysregulation of DC maturation, which may explain the adjuvant effect of CyaA-AC⁻ toxoid (Adkins et al., 2014) Svedova *et al.*, under revision).

Conclusions

In this thesis we describe the achieved progress in our understanding of mechanisms that underlie the ablation of the innate immunity by the causative agent of whooping cough – *Bordetella pertussis*.

- 1) We showed that *B. pertussis* employs the enzymatic activity of CyaA in order to survive the initial contact with innate immune cells and to avoid being killed by oxidative burst of these sentinel cells of innate immunity.
- 2) We showed that PKA and Epac collaborate in CyaA/cAMP-triggered inhibition of ROS production by neutrophils.
- 3) We identified PLC as the primary target of CyaA-induced signaling that leads to the blocking of ROS production by neutrophils.
- 4) Using primed neutrophils, we reveal a mechanism that potentially contributes to the capacity of vaccinated animals to clear *B. pertussis* infection.
- 5) In contrast to the blocking of ROS production, CyaA-dependent PKA activation is sufficient to block NO production and iNOS expression in macrophages.
- 6) We describe here, that the enzymatic activity of CyaA yielding cAMP signaling inhibits Stat1 and IRF1 transcription factors and JNK signaling, while it activates the NF- κ B transcription factor. Moreover, the pore-forming activity of CyaA activates JNK and p38. This dysregulation of signaling pathways then leads to altered gene expression patterns and finally yields dysregulation of DC maturation.
- 7) Furthermore, CyaA enzymatic activity accounts for the blocking of the AP-1-dependent iNOS expression by the activation of the tyrosine phosphatase SHP-1.
- 8) We have identified the activation of SHP-1 by CyaA as a crucial step in the survival of *B. pertussis* during interaction with macrophages.
- 9) We also described that the inhibition of AKT by cAMP signaling of CyaA is important for the induction of apoptosis of monocytes, while it does not play any role in the inhibition of NO production.
- 10) We proposed a model of CyaA-provoked signaling on myeloid phagocytes (Fig. 3; see the page 11)

Abbreviations

AC	Adenylate Cyclase
AP-1	Activator Protein 1
ATP	adenosine triphosphate
<i>B.p. cyaA-wt</i>	<i>Bordetella pertussis</i> producing wild type CyaA
<i>B.p. cyaA-AC</i>	<i>Bordetella pertussis</i> producing detoxified CyaA-AC
<i>B.p. ΔcyaA</i>	<i>Bordetella pertussis</i> with in frame deletion of <i>cyaA</i> gene
6-Bnz-cAMP	N ⁶ - Benzoyladenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate
cAMP	adenosine 3',5'- cyclic monophosphate
8-CPT-cAMP	8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate
CyaA	adenylate cyclase toxin, ACT
CR3	Complement Receptor 3, integrin CD11b/CD18, α _M β ₂ , Mac1
DAG	diacylglycerol
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
iNOS	inducible nitric oxide synthase, NOS2
IRF	Interferon Regulatory Factor
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	nitric oxide
PI3K	PhosphoInositide 3-kinase
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA	cAMP dependent Protein Kinase A
PLC	PhosphoLipase C
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
RTX	Repeat in ToXin
SHP	SH2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase
siRNA	small interfering RNA
Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
TLR	Toll-Like Receptor

Curriculum Vitae

Name: Mgr. Ondřej Černý
Nationality: Czech
Contact address: Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Czech Academy of Sciences
Videňská 1083 142 20, Prague 4, Czech Republic
Phone: (+420) 241 062 014
cerny@biomed.cas.cz

University education

Since 2010 **Charles University in Prague, Faculty of Science**
Ph.D. program: Molecular and Cell Biology, Genetics and Virology
Supervisor: prof. Ing. Peter Šebo, CSc.
Thesis: *Signaling effects of adenylate cyclase toxin action on phagocytes*

2008 – 2010 **Charles University in Prague, Faculty of Science**
Master program: Molecular Biology and Genetics of Eucarya
Supervisor: Mgr. Jana Kamanová, Ph.D.
Thesis: *Signalization of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis in macrophages* (prize for the best Master thesis at the Department of Genetics and Microbiology)

2005 – 2008 **Charles University in Prague, Faculty of Science**
Bachelor program: Molecular Biology and Biochemistry of Organisms
Supervisor: prof. Ing. Peter Šebo, CSc.
Thesis: *Bacterial toxins modulating functions of myeloid phagocytes by cAMP signaling*

Scientific experiences

Since 2006 **Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Czech Academy of Science**
Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens (prof. Ing. Peter Šebo, CSc.)

Sep to Oct 2013 **Babraham institute, Cambridge, Great Britain**
Dr. Hawkins's laboratory

Aug to Oct 2014 **CONICET, La Plata, Argentina**
Dr. Rodriguez's laboratory

Attended conferences, workshops, and practical courses

- ETOX17, Porto, Portugal, 2015
- Gordon Research Seminar and Conference 2014: Microbial Toxins & Pathogenicity, Boston, USA, 2014
- Signalling 2013: From Structure to Function, York, Great Britain, 2013
- ETOX16, Freiburg, Germany, 2013
- Cellular Signaling & Molecular Medicine, Dubrovnik, Croatia, 2012
- Discussion forum – Host-pathogen interaction, Náchod, Czech republic, 2012
- Mol Micro meeting, Wurzburg, Germany, Czech republic, 2011
- Course on animal handling, Prague, Czech republic, 2011
- Natural Immunity and Cancer, Prague, Czech republic, 2010
- T-cell Activation and Technologies, Prague, Czech republic, 2010
- 34th FEBS Congress, Prague, Czech republic, 2009
- 33rd Advances in Molecular Biology and Genetics, Prague, Czech republic, 2009
- Bioinformatics and Systems Biology, Brno, Czech republic, 2009
- Microscopic Immunodetection in Biomedicine, Prague, Czech republic, 2009
- 25th Congress of Alergologists and Immunologists, Prague, Czech republic, 2008
- Cellular and Molecular Immunology, Prague, Czech republic, 2008

Seznam publikací autora / List of publications

Publikace zahrnuté v disertační práci / Publications comprised within the thesis

- 1) Cerny, O., Kamanova, J., Masin, J., Bibova, I., Skopova, K., and Sebo, P. (2015). *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol* *194*, 4901-4913.
- 2) Ahmad, J.N., Cerny, O., Linhartova, I., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2015). cAMP signaling of *Bordetella* adenylate cyclase toxin through the SHP-1 phosphatase activates the BimEL-Bax pro-apoptotic cascade in phagocytes. *Cell Microbiol* (in press).
- 3) Svedova, M., Adkins, I., Masin, J., Fiser, R., Cerny, O., Tomala, J., Freudenberg, M., Tuckova, L., Kovar, M., Dadaglio, G., and Sebo, P. Pore-forming activity of the adenylate cyclase toxoid activates dendritic cells to prime CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *Immunol Cell Biol* (under revision).

Publikace nezahrnuté v disertační práci / Publications NOT comprised within the thesis

- 1) Bibova, I., Hot, D., Keidel, K., Amman, F., Slupek, S., Cerny, O., Gross, R., and Vecerek, B. (2015). Transcriptional profiling of *Bordetella pertussis* reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biol* *12*, 175-185.
- 2) Bibova, I., Skopova, K., Masin, J., Cerny, O., Hot, D., Sebo, P., and Vecerek, B. (2014). The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* *81*, 4081-4090.
- 3) Villarino Romero, R., Bibova, I., Cerny, O., Vecerek, B., Wald, T., Benada, O., Zavadilova, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2013). The *Bordetella pertussis* type III secretion system tip complex protein Bsp22 is not a protective antigen and fails to elicit serum antibody responses during infection of humans and mice. *Infect Immun* *81*, 2761-2767.

Použitá literatura / References

- Adkins, I., Kamanova, J., Kocourkova, A., Svedova, M., Tomala, J., Janova, H., Masin, J., Chladkova, B., Bumba, L., Kovar, M., *et al.* (2014). *Bordetella* adenylate cyclase toxin differentially modulates toll-like receptor-stimulated activation, migration and T cell stimulatory capacity of dendritic cells. *PLoS One* 9, e104064.
- Andreasen, C., and Carbonetti, N.H. (2009). Role of neutrophils in response to *Bordetella pertussis* infection in mice. *Infect Immun* 77, 1182-1188.
- Bae, Y.S., Lee, T.G., Park, J.C., Hur, J.H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J.Y., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (2003). Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol Pharmacol* 63, 1043-1050.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2006). Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* 74, 2207-2214.
- Blanchette, J., Abu-Dayyeh, I., Hassani, K., Whitcombe, L., and Olivier, M. (2009). Regulation of macrophage nitric oxide production by the protein tyrosine phosphatase Src homology 2 domain phosphotyrosine phosphatase 1 (SHP-1). *Immunology* 127, 123-133.
- 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.
- Cerny, O., Kamanova, J., Masin, J., Bibova, I., Skopova, K., and Sebo, P. (2015). *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Blocks Induction of Bactericidal Nitric Oxide in Macrophages through cAMP-Dependent Activation of the SHP-1 Phosphatase. *J Immunol* 194, 4901-4913.
- Confer, D.L., and Eaton, J.W. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, 948-950.
- Eby, J.C., Gray, M.C., and Hewlett, E.L. (2014). Cyclic AMP-Mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *Infect Immun* 82, 5256-5269.
- 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.
- Gomez, M.A., Contreras, I., Halle, M., Tremblay, M.L., McMaster, R.W., and Olivier, M. (2009). *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2, ra58.
- Goodwin, M.S., and Weiss, A.A. (1990). Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun* 58, 3445-3447.
- Gray, R.D., Lucas, C.D., Mackellar, A., Li, F., Hiersemenzel, K., Haslett, C., Davidson, D.J., and Rossi, A.G. (2013). Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm (Lond)* 10, 12.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M., and Gray, M.C. (2006). Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol* 59, 447-459.
- Hickey, F.B., Brereton, C.F., and Mills, K.H. (2008). Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 84, 234-243.

Cheung, G.Y., Dickinson, P., Sing, G., Craigon, M., Ghazal, P., Parton, R., and Coote, J.G. (2008). Transcriptional responses of murine macrophages to the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 44, 61-70.

Khelef, N., Bachelet, C.M., Vargaftig, B.B., and Guiso, N. (1994). Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun* 62, 2893-2900.

Khelef, N., and Guiso, N. (1995). Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* 134, 27-32.

Khelef, N., Sakamoto, H., and Guiso, N. (1992). Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* 12, 227-235.

Kleinert, H., Schwarz, P.M., and Forstermann, U. (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384, 1343-1364.

Lee, S.H., Nishino, M., Mazumdar, T., Garcia, G.E., Galfione, M., Lee, F.L., Lee, C.L., Liang, A., Kim, J., Feng, L., *et al.* (2005). 16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway. *Cancer Res* 65, 7984-7992.

Macdonald-Fyall, J., Xing, D., Corbel, M., Baillie, S., Parton, R., and Coote, J. (2004). Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* towards co-administered antigens. *Vaccine* 22, 4270-4281.

Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75-93.

Qi, X.F., Kim, D.H., Yoon, Y.S., Li, J.H., Song, S.B., Jin, D., Huang, X.Z., Teng, Y.C., and Lee, K.J. (2009). The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF-kappaB in HaCaT keratinocytes. *Mol Immunol* 46, 1925-1934.

Rommel, C., Camps, M., and Ji, H. (2007). PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* 7, 191-201.

Rossi Paccani, S., Benagiano, M., Capitani, N., Zornetta, I., Ladant, D., Montecucco, C., D'Elios, M.M., and Baldari, C.T. (2009). The adenylate cyclase toxins of *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis* promote Th2 cell development by shaping T cell antigen receptor signaling. *PLoS Pathog* 5, e1000325.

Sebo, P., Osicka, R., and Masin, J. (2014). Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13, 1215-1227.

Tsukamoto, K., Hazeki, K., Hoshi, M., Nigorikawa, K., Inoue, N., Sasaki, T., and Hazeki, O. (2008). Critical roles of the p110 beta subtype of phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-induced Akt activation and negative regulation of nitrite production in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 180, 2054-2061.

Wang, H., Jiang, Y., Shi, D., Quilliam, L.A., Chrzanowska-Wodnicka, M., Wittchen, E.S., Li, D.Y., and Hartnett, M.E. (2014). Activation of Rap1 inhibits NADPH oxidase-dependent ROS generation in retinal pigment epithelium and reduces choroidal neovascularization. *FASEB J* 28, 265-274.