

mgr Bartosz Zięba

„Rola aktywowanego przez cAMP czynnika wymiany nukleotydu guaniny – Epac1 oraz jego bezpośredniego efektoru Rap1 w rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych”.

„Role of exchange protein activated by cAMP - Epac1 and its immediate effector Rap1 in vascular smooth muscle relaxation”

STRESZCZENIE

Prawidłowa funkcja mięśni gładkich naczyń krwionośnych jest kluczowa dla utrzymania właściwego ciśnienia krwi a przez to podtrzymania homeostazy organizmu. Z kolei zaburzenia w regulacji skurczu i rozkurczu mogą prowadzić do rozwoju takich chorób, jak nadciśnienie tętnicze czy wazospazm mózgowych naczyń krwionośnych. Skurcz i rozkurcz mięśni gładkich jest ściśle regulowany poprzez fosforylację lekkich łańcuchów miozyny (RLC₂₀, z ang. regulatory light chain), a ta bezpośrednio wynika z wzajemnej relacji aktywności kinazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCK, z ang. mysin light chain kinase) do aktywności fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny (MLCP, z ang. mysin light chain phosphatase). Aktywacja małego białka G - RhoA oraz jego bezpośredniego efektoru – kinazy Rho (ROK, z ang. Rho kinase) przez odpowiednich agonistów, prowadzi do obniżenia aktywności MLCP oraz do fosforylacji RLC₂₀ mięśni gładkich i wytworzenia skurczu. Cykliczne nukleotydy (cAMP, cGMP) mogą odwrócić ten proces prowadząc do rozkurczu mięśni.

Celem niniejszej pracy było ustalenie roli niedawno odkrytej ścieżki przekazu sygnału od cAMP poprzez białka Epac oraz Rap1 w fizjologii mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

W niniejszej pracy przedstawiono nowy mechanizm cAMP-zależnego rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych poprzez białko Epac, będące czynnikiem wymiany nukleotydu guaniny dla małego białka G – Rap1. Aktywacja Epac skutkuje zwiększeniem aktywności białka Rap1 przy jednoczesnym obniżeniu aktywności białka RhoA. Selektywny dla Epac analog cAMP: 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (007), znacząco obniżył indukowany przez wazokonstryktory skurcz mięśni oraz fosforylację RLC₂₀ i MLCP zarówno w przypadku preparatów naczyniowych mięśni gładkich z zachowaną ciągłością błony komórkowej, jak i preparatów permeabilizowanych. Jak wykazano w pracy proces ten jest niezależny od kinazy

białkowej A (PKA, z ang. protein kinase A) oraz kinazy białkowej G (PKG z ang. protein kinase G). Stwierdzono, że stosowany klinicznie wazodylator Cicaprost, będący analogiem prostacykliny PGI₂, zwiększał aktywność białka Rap1 przy równoczesnym obniżeniu aktywności RhoA w mięśniach gładkich z zachowaną ciągłością błony komórkowej. Również aktywator cykazy adenyłowej - forskolina, inhibitor fosfodiesterazy – IBMX oraz isoproterenol, znacząco podnosiły ilość Rap1·GTP w komórkach mięśni gładkich wyizolowanych z aorty szczura. Obecność H89, będącego inhibitorem PKA, nie miała wpływu na aktywację Rap1 stymulowaną 007. Indukowany przez LPA wzrost aktywności RhoA był znacząco redukowany przez 007 w mysich fibroblastach typu dzikiego, ale nie w komórkach pozbawionych Rap1B. Obserwacja ta jest zgodna z hipotezą sugerującą, że obniżenie aktywności RhoA przez Epac odbywa się za pośrednictwem białka Rap1. Jednocześnie aktywacja Rap1 przez isoproterenol była całkowicie zablokowana w komórkach mięśni gładkich, w których wyciszono gen białka Epac1.

W niniejszej pracy wykazano, że cAMP-zależna aktywacja PKA oraz białka Epac wspólnie prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich. Całkowite oraz ograniczone do mięśni gładkich wyłączenie genu *rap1*, znacząco zwiększyło niestymulowaną oraz stymulowaną analogiem tromboksanu A₂ siłę skurczu aorty brzusznej, jak również ograniczyło efekt działania 007. Zaprezentowane w tej rozprawie wyniki pokazują, że cAMP-zależna aktywacja Epac skutkuje PKA-niezależną oraz Rap1-zależną, desensytyzacją wapniową w mięśniach gładkich w wyniku obniżenia aktywności białka RhoA. Obniżenie aktywności RhoA w następstwie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, odbywa się przy udziale obu szlaków sygnałowych Epac oraz PKA.

Modulacja przedstawionego w niniejszej rozprawie nowego mechanizmu regulującego cAMP-zależną desensytyzację wapniową w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych może zostać w przyszłości wykorzystana w terapii takich schorzeń jak nadciśnienie tętnicze, czy hipotensja.