



Ocena

rozprawy doktorskiej Pana mgr Bartosza J. Zięby pt.: „Role of exchange protein activated by cAMP –Epac1 and its immediate effector Rap1 in vascular smooth muscle relaxation”

Faculty of Biochemistry,
Biophysics and Biotechnology
Jagiellonian University

Department of General
Biochemistry

dr Jolanta Jura

Warstwy komórek mięśni gładkich występują w wielu narządach i naczyniach organizmu w tym, między innymi: w naczyniach układu krwionośnego i oddechowego, w żołądku, jelitach czy pęcherzu moczowym. Ich działanie jest powolne i niezależnie od naszej woli. Działając automatycznie, wytwarzają ciśnienie w otaczanej przez nie przestrzeni i zwężają lub rozszerzają światło różnych przewodów, np. przewodów wyprowadzających ślinianek, przewodów trzustki i dróg żółciowych czy naczyń krwionośnych. Mięśnie gładkie występujące w naczyniach krwionośnych mają możliwość zmniejszenia ich średnicy, czyli wazokonstrykcji lub zwiększenia średnicy, czyli wazodilatacji. Na wielkość naczynia ma wpływ wiele czynników/bodźców, zarówno dostarczanych przez organizm, jak i pochodzących z zewnątrz, a prawidłowa funkcja mięśni gładkich naczyń krwionośnych jest kluczowa dla utrzymania ciśnienia krwi i temperatury ciała, a więc także dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Tematem niniejszej dysertacji jest ustalenie roli ścieżki przekazu sygnału od cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP) poprzez białka Epac i Rap1 w funkcjonowaniu mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

Rozprawa przedstawiona jest na 126 stronach maszynopisu, napisana jest w języku angielskim i podzielona w typowy sposób na rozdziały przedstawiające streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, wykorzystane materiały i metody, wyniki, dyskusję z wnioskami oraz dalszymi planami i kierunkami badań w tym temacie. Ostatni rozdział obejmuje spis literatury złożony z 247 pozycji piśmiennictwa prezentującej bardzo wyczerpująco stan wiedzy na temat zagadnień ujętych w rozprawie.

We Wstępie Autor opisuje w sposób bardzo szczegółowy mechanizm skurczu i rozkurczu mięśni gładkich oraz zaangażowanie w te procesy odpowiednich białek. Poziom aktywności kinazy i fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny jest głównym motorem skurczu i rozkurczu ale sygnały prowadzące do regulacji tej aktywności angażują odpowiednie szlaki przekazu sygnału i szereg modulatorów - przekaźników. We wstępie szczegółowo przedstawiona jest rodzina białek G, ze szczególnym naciskiem położonym na funkcje białka Rap1, ze względu na jego zaangażowanie w procesy będące tematem niniejszej dysertacji. W dalszej części Wstępu przedstawione są izoformy białka Epac - czynnika wymiany nukleotydu guaniny dla białka Rap1, a jednocześnie białek efektorowych dla cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). W tej części rozprawy można również znaleźć informacje o dotychczas uzyskanych wynikach na temat zaangażowania białek cAMP/Epac/Rap1 w funkcjonowanie układu naczyniowego. We Wstępie umieszczono cztery schematy, przedstawiające aktywację fosfatazy łańcuchów lekkich miozyny, ścieżki przekazu sygnału rozpoczynające się aktywacją receptora, a kończące skurczem lub rozkurczem mięśni oraz domeny dwóch izoform Epac. Schematy te znacząco przyczyniają się do przejrzystego wyjaśnienia opisanych zagadnień. Całość poparta jest bardzo bogatą literaturą i właściwie można by tą część wykorzystać do przygotowania bardzo interesującego artykułu przeglądowego.

Address:
Gronostajowa 7
30-387 Krakow
tel. +48(12) 664 63 59
fax +48(12) 664 69 02
email: jolanta.jura@uj.edu.pl

Cel pracy, jakim była weryfikacja hipotezy udziału cyklicznego nukleotydu (cAMP) i białek Epac i Rap1 w funkcjonowaniu mięśni gładkich naczyń krwionośnych został podzielony na cztery cele częściowe, które po zrealizowaniu pozwoliły kompleksowo podsumować uzyskane wyniki.

Realizacja zamierzonych celów wymagała od Autora stosowania szeregu metod z pogranicza biologii molekularnej i biochemii. W pracy wykorzystywano kilka modeli badawczych: tkanki i komórki pochodzące od królika, szczura i myszy. Wykorzystano również myszy ze zmodyfikowanym genomem w obrębie *locus* genu Rap1A i Rap1B. W celu oznaczenia markerów mięśni gładkich Doktorant zastosował barwienie immunocytochemiczne. Poziom transkryptów oznaczany był metodą PCR i PCR w czasie rzeczywistym, a białek metodą Western blot. W ramach pracy przygotowano wektory adenowirusowe, zawierające sekwencje wyciszające ekspresję genu *Epac*. Poziom fosforylacji oceniano metodą Western blot, natomiast stopień aktywacji np. białka Rap1 oceniano zgodnie z wcześniej przyjętą metodyką, polegającą na ocenie powinowactwa wiązania Rap1 z GTP *versus* GDP. Ponadto, Doktorant wielokrotnie wykonywał pomiary siły izometrycznej mięśni gładkich. Na cele niniejszej pracy uzyskał również w systemie bakteryjnym ekspresję białka RalGDS-RBD, jako białka fuzyjnego z transferazą S-glutationową (GST). Każda z tych technik składała się z kilku złożonych etapów, wymagających od eksperymentatora staranności i cierpliwości.

Rozdział Wyniki zaczyna się od przedstawienia dowodów, że uzyskane komórki mięśni gładkich z aorty szczura są właściwym modelem badawczym. Autor rozprawy zcharakteryzował swój model badawczy oznaczając metodą RT-PCR poziom wybranych transkryptów, a metodą barwienia immunofluorescencyjnego obecność białek zaliczanych do podstawowych markerów mięśni gładkich. Następnie oznaczony został poziom białek, będących celem badawczym niniejszej rozprawy: Epac1, Rap1 i RhoA. Poziom poszczególnych białek jest zróżnicowany w różnych narządach, w skład których wchodzi mięśnie gładkie. Wysoki poziom białka Epac zaobserwowano w sercu, natomiast poziom wszystkich badanych białek był wyższy w komórkach mięśni gładkich aorty niż np. pęcherza moczowego czy jelita. Najważniejsze wnioski można wyciągnąć na podstawie wyników, w których Doktorant pokazał, że selektywny dla Epac analog cyklicznego AMP, 007 indukuje relaksację mięśni, co odzwierciedla się w defosforylacji lekkich łańcuchów miozyny i fosfatazy MLCP i efekt ten jest zależny od dawki stosowanego induktora. Jak Doktorant wykazał w dalszej części dysertacji, proces ten jest także niezależny od kinazy białkowej A i B, które dotychczas były uważane za kluczowe regulatory napięcia mięśni gładkich. Ponieważ prostacyklina PGI_2 jest naturalnym wazodilatorem mięśni gładkich w dalszej części badań Doktorant zbadał jak syntetyczny analog tej prostaglandyny wpływa na aktywność badanych białek. Uzyskane wyniki sugerują, że traktowanie komórek cikaprostem skutkuje zwiększeniem aktywności białka Rap1 i obniżeniem aktywności białka RhoA w mięśniach gładkich przy zachowaniu ciągłości błony komórkowej. Te obserwacje były zbieżne z wynikami uzyskanymi w doświadczeniach z zastosowaniem analogu cyklicznego AMP. W dalszej części badań Doktorant wykazał, że forskolina, będąca aktywatorem cykazy adenylowej podnosi ilość Rap1-GTP, natomiast inhibitor kinazy PKA nie ma wpływu na aktywację Rap1 po stymulacji czynnikiem 007. Białko Rap1 reprezentowane jest przez dwie izoformy Rap1A i Rap1B różniące się składem dziewięciu aminokwasów. Żeby wyjaśnić, czy obydwie izoformy Rap1 zaangażowane są w regulację aktywności mięśni gładkich wykorzystane zostały myszy z nieaktywnymi obydwojma allelami Rap1B i jednym allelem Rap1A.

Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe i oryginalne. Stanowią one przemyślany schemat stawiania hipotez i testowania ich w bardzo dobrze przemyślanych doświadczeniach, z zastosowaniem wielu modeli badawczych i przy stosowaniu odpowiednich kontroli. W zależności od użytego modelu badawczego wyniki są opracowane na podstawie co najmniej trzech powtórzeń tego samego eksperymentu. Analizując wyniki Doktorant wykazał się dużą starannością w opisie poszczególnych etapów eksperymentów, w ich założeniach i interpretacji. Na pochwałę zasługuje staranność w prezentacji tych wyników, w tym dobór odpowiedniej szaty graficznej.

Dyskusja wraz z ciekawym opisem kierunków badań opisana została na 14 stronach. W rozdziale tym Doktorant podsumowuje jeszcze raz uzyskane wyniki, a jednocześnie w sposób bardzo interesujący interpretuje je na tle danych literaturowych. Najważniejszym osiągnięciem Doktoranta było pokazanie po raz pierwszy, że aktywacja białka Epac przez cykliczny nukleotyd – cAMP jest jednym ze szlaków, kluczowych w kontroli rozkurczu mięśni gładkich. Poza aktywacją białka Epac, cAMP aktywuje również kinazę białkową A i obydwa szlaki uczestniczą w kontroli rozkurczu mięśni gładkich. Aktywacji Epac towarzyszy wzrost aktywacji białek Rap1, obniżenie aktywności białka RhoA oraz obniżenie poziomu fosforylacji fosfatazy miozyny MYPT1 i lekkich łańcuchów miozyny.

Przy analizie przedstawionej rozprawy uwagę zwraca konsekwencja w planowaniu i realizacji celów w bardzo złożonych doświadczeniach. Wyniki i końcowe konkluzje uzyskane w ramach niniejszej rozprawy mają walory oryginalności i z pewnością będą miały praktyczne zastosowanie. Na podstawie tych danych będzie można opracować nowe terapie chorób, których podłożem jest zaburzona regulacja rozkurczu mięśni, jak np. nadciśnienie tętnicze czy hipotensja. Pomimo, że praca opisana jest bardzo przejrzysta i zawiera staranną dokumentację nasuwają się pewne uwagi i pytania:

1. W pracy są nieliczne błędy redakcyjne, gramatyczne, czy stylistyczne: np. str. 18- powinno być *enhance* zamiast *enhances*; str. 20 – II os. I. pojed.: *decreases* zamiast *decrease*; str. 38 – *membrane permeant* zamiast *permeable*; str. 50 – brak zamknięcia nawiasu na końcu zadania; str. 52 – *effective szstem* zamiast *system*; str. 70 – czas przeszły czasownika *lead to led*, a nie *leaded*; str. 87 – *mediated* zamiast *medieted*;
2. Schematy prezentowane we Wstępie powinny zawierać opis skrótów nazw białek, co znacznie ułatwiłoby ich zrozumienie.
3. Na Ryc. 13 oraz w jej opisie nie zaznaczono podziału na część A i B, chociaż w opisie Wyników Doktorant posługuje się takim podziałem.
4. Czy rzeczywiście przy badaniu poziomu fosforylacji białek metodą *Western blot* nie stosowano inhibitorów fosfataz?
5. Opisując wyniki Doktorant stosuje czasowniki w formie osobowej lub nieosobowej. Czasami sprawia to trudność w rozróżnieniu wyników uzyskanych przez Doktoranta lub przez innych badaczy.
6. Cele pracy napisane są w czasie przeszłym dokonanym i w takiej formie stanowią raczej wnioski końcowe i mogłyby być umieszczone na końcu pracy.
7. W badaniu poziomu mRNA markerów mięśni gładkich metodą półilościowej RT-PCR Doktorant powinien pokazać poziom mRNA genu referencyjnego. Można się tylko domyślać, że bardzo różne ilości produktów PCR w poszczególnych próbach są wynikiem zróżnicowanej ilości produktu wyjściowego w komórkach, a nie wynikiem braku pomiaru stężenia całkowitego RNA.

Te uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę przedstawionej mi do recenzji pracy. Uważam, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Zatem wnioskuję do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie Pana mgr Bartosza J. Zięby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jolanta Jura