Streszczenie

Kompleks Cu-gonadoliberyna (Cu-GnRH), zachowując skład i sekwencję aminokwasów natywnego GnRH; jest dekapetydem zawierającym jon miedzi (Cu^{2+}) stabilnie związany z atomami azotu pochodzącymi z pierścienia imidazolowego His^2 oraz grupy amidowej $pGlu^1$ i His^2. Wyniki dotychczasowych badań dotyczących różnych aspektów aktywności kompleksu ujawniły, że przyłączenie jonu miedzi zmienia konformację GnRH, czego konsekwencją jest specyficzna aktywność biologiczna tak powstałego analogonu. Kompleks wykazuje wyższe powinowactwo do receptora GnRH, jest silniejszym, niż GnRH stymulatorem uwalniania LH i FSH w warunkach *in vivo* i *in vitro*, odznacza się zwiększoną odpornością na działanie podwzgórzowych i przysadkowych enzymów proteolitycznych, a w komórkach przedniego płata przysadki aktywuje szlak cAMP/PKA poprzez mechanizm zależny od wapnia wewnątrzkomórkowego. Skutkiem aktywacji wewnątrzkomórkowych ścieżek przekazywania sygnału są także procesy zachodzące na poziomie transkrypcji. Jednak ten aspekt aktywności kompleksu Cu-GnRH pozostawał niezbadany.

Celem podjętych badań było: (i) określenie indukowanej przez Cu-GnRH i PACAP $_{1-38}$ dynamiki zmian aktywności kinazy białkowej A *ex vivo*; (ii) scharakteryzowanie poziomu ekspresji mRNA genów *Egr1*, *Nr5a1*, *Ctnnb1*, *Lhb, Fshb, Gnrhr, Adcyap1r1, Prkaca, Prkg1, Nos1, Fst* i *Nr4a1* po dokomorowych infuzjach Cu-GnRH i PACAP-u $_{1-38}$ *in vivo*; (iii) określenia, czy transkrypcyjna efektywność Cu-GnRH i PACAP-u $_{1-38}$ zależy od wzoru stymulacji przysadki; (iv) określenia, czy farmakologiczne zahamowanie aktywności receptora GnRH i receptora PAC1 wpłynie na efektywność Cu-GnRH w regulacji ekspresji mRNA badanych genów i uwalniania gonadotropin. Do oznaczenia aktywności PKA w izolowanych przednich płatach przysadki pobranych od samic szczura w fazie diestrus zastosowano metodę ELISA. Poziomy ekspresji mRNA badanych genów w przednich płatach przysadki pobranych od owariektomizowanych i dokomorowo infundowanych samic szczura oznaczano metodą real-time qPCR, a stężenia LH i FSH w osoczu metodą RIA.

Otrzymane wyniki wykazały, że Cu-GnRH z taką samą efektywnością jak PACAP $_{1-38}$ aktywuje PKA po jednogodzinnej stymulacji przysadki *ex vivo*. Badania *in vivo* ujawniły, że wpływ kompleksu na aktywność transkrypcyjną genów sieci gonadotropowej zależy od wzoru stymulacji przysadki. Tylko po infuzjach Cu-GnRH podawanych z częstotliwością 2 pulsów/godzinę obserwowano bowiem jednoczesną stymulację ekspresji *Egr1* mRNA i *Nr5a1* mRNA, jak też ekspresję mRNA genów zależnych od szlaku cAMP/PKA: *Nos1* i *Prkaca*. Zmiana aktywności receptora GnRH zmniejszyła stymulacyjny wpływ Cu-GnRH na ekspresję mRNA genów *Egr1*, *Prkaca* i *Nr4a1* mRNA, natomiast zmiana aktywności receptora PAC1 obniżyła indukowaną przez Cu-GnRH ekspresję *Egr1* mRNA, *Nr5a1* mRNA, *Nos1* mRNA, *Prkaca* mRNA i *Nr4a1* mRNA. W obecności antide i PACAP-u $_{6-38}$ obniżeniu ulegał też stymulujący wpływ Cu-GnRH na uwalnianie LH i FSH do krążenia ogólnego. Także PACAP $_{1-38}$ indukował wzrost ekspresji *Egr1* mRNA i *Nr5a1* mRNA jednak efekt ten nie zależał od wzoru stymulacji przysadki. W sposób zależny od wzoru stymulacji przysadki PACAP $_{1-38}$ genowo-specyficznie wpłynął na ekspresję *Nos1* mRNA, *Prkaca* mRNA i *Nr4a1* mRNA. Zwiększenie poziomu *Nos1* mRNA wystąpiło tylko po podawania PACAP-u $_{1-38}$ w sposób pulsacyjny, podczas gdy po jednorazowym podaniu PACAP-u $_{1-38}$ wzrost ekspresji mRNA dotyczył jedynie genów *Prkaca* i *Nr4a1* mRNA. Podobnie, indukowaną przez PACAP $_{1-38}$ stymulację uwalniania LH i FSH obserwowano tylko po jednorazowej infuzji tego neuropeptydu.

Otrzymane wyniki wskazują, że kompleks Cu-GnRH jest analogiem gonadoliberyny o stymulacyjnym oddziaływaniu na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej, a wewnątrzkomórkowa efektywność kompleksu Cu-GnRH wymaga stymulacji receptorów GnRH i PAC1 przez pulsy o wysokiej częstotliwości. Pro-transkrypcyjna aktywność kompleksu Cu-GnRH oraz PACAP $_{1-38}$ w komórkach przysadki samic szczura *in vivo* wynika z aktywacji ścieżki cAMP/PKA, czego wyrazem jest taki sam zestaw genów aktywowanych przez każdy z badanych peptydów.

Słowa kluczowe: Cu-GnRH, PACAP $_{1-38}$, cAMP, PKA, przedni płat przysadki, GnRHR, PAC1, geny sieci gonadotropowej.