

**Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chojnackiej pt.:**  
**„Molekularne mechanizmy funkcjonowania połączeń międzykomórkowych**  
**w gonadzie męskiej szczura w warunkach ograniczonego działania**  
**androgenów: badania *in vivo* i *in vitro*”**

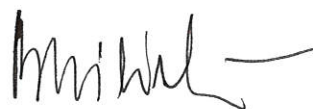
Proces spermatogenezy podlega ścisłej regulacji endokrynej obejmującej oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalną oraz lokalnej regulacji poprzez czynniki działające auto- i parakrynowo. Ponadto niezwykle ważna jest komunikacja pomiędzy komórkami gonady poprzez wyspecjalizowane połączenia międzykomórkowe pomiędzy sąsiadującymi komórkami Sertoliego oraz pomiędzy komórkami Sertoliego i germinalnymi. Poprzednie badania grupy Bilińskiej wykazały, iż zablokowanie działania androgenów na poziomie AR, poprzez podanie anty-androgenu flutamidu jest przyczyną nieprawidłowej ekspresji i lokalizacji białek połączeń międzykomórkowych, co z kolei wydaje się być jednym z czynników prowadzących do zaburzenia funkcji jąder u knurów. Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie mechanizmów leżących u podstaw zmian ekspresji białek połączeń międzykomórkowych wywołanych ograniczeniem dostępności androgenów. Cel pracy realizowany był na modelu szczurzym w systemie *in vivo* oraz *in vitro*, a do jego realizacji zastosowano techniki molekularne i biochemiczne pozwalające na wykazanie w badanym materiale zmian w ekspresji genów na poziomie mRNA i białka oraz zmian w poziomie fosforylacji i aktywności kinaz. Ponadto stosowano techniki immunohistochemiczne dające możliwość rozszerzenia wcześniejszych analiz poprzez wykazanie lokalizacji danego białka w poszczególnych komórkach gonady szczura. Posłużono się również metodą ko-immunoprecypitacji i ko-immunofluorescencji do stwierdzenia zmian w tworzeniu i/lub rozpadzie kompleksów białkowych pomiędzy wybranymi białkami połączeń międzykomórkowych a kinazą c-Src.

W systemie *in vivo* flutamid podawany był w dawce 50 mg/m.c. pomiędzy 82 a 90 dniem życia. Analiza histologiczna jąder wykazała zmiany morfologiczne w tkance interstycjalnej, obejmujące jej rozrost. Nie stwierdzono zmian morfologicznych w obrębie kanalików plemnikotwórczych. Analiza Western blot oraz barwienie TUNEL nie wykazały nasilenia procesu apoptozy. Analizy q-RT-PCR oraz Western blot wykazały spadek ekspresji N-kadheryny oraz wzrost ekspresji Cx43, zaś dla  $\beta$ -kateniny nie notowano zmian poziomu ekspresji. Dalsze analizy immunohistochemiczne wykazały, iż flutamid zaburza lokalizację komórkową N-kadheryny, Cx43 oraz  $\beta$ -kateniny. Analizy ko-immunoprecypitacji oraz

ko-immunofluorescencji wykazały ponadto indukowany flutamidem rozpad kompleksów N-kadheryny oraz kinazy c-Src a także N-kadheryny i  $\beta$ -kateniny.

W systemie *in vitro* materiał badawczy stanowiły izolowane z 20-dniowych szczurów, komórki Sertoliego, inkubowane z hydroksyflutamidem. Analiza Western blot poziomu ufosforylowania kinaz białkowych wykazała wzrost ufosforylowania kinazy Akt oraz kinazy ERK1/2 oraz jednoczesny spadek ufosforylowania nadrzędnej kinazy c-Src. Zwiększone ufosforylowanie kinazy Akt wynika ze wzrostu ufosforylowania i tym samym dezaktywacji fosfatazy PTEN. Inkubacja komórek Sertoliego z HF skutkowała także wzrostem poziomu wewnętrznej aktywności kinazy Akt. W badanym materiale nie wykazano zmian w poziomie p-Raf-1, co wskazuje, iż HF nie wpływa na transktywację ścieżki kinaz Akt i MAPK na poziomie kinazy Raf-1.

Otrzymane wyniki wskazują iż anty androgeny mogą zaburzać ekspresję białek połączeń międzykomórkowych poprzez aktywację kinaz białkowych kontrolujących funkcjonowanie połączeń międzykomórkowych. W tym kontekście anty-androgeny mogą działać jako agoniści receptorów odmiennych niż klasyczny AR. Nie wyklucza to jednak możliwości wpływu flutamidu na białka połączeń międzykomórkowych za pośrednictwem klasycznego AR.



DZIEKAN  
Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
  
dr hab. Małgorzata Kruczek