

Załącznik do oświadczenia promotora rozprawy doktorskiej:

Streszczenie pracy doktorskiej z akceptacją promotora.

Prostata jest dodatkowym gruczołem męskiego układu rozrodczego, znajdującym się pod ścisłą kontrolą androgenów odpowiedzialnych za różnicowanie i prawidłowe funkcjonowanie tego narządu oraz utrzymanie jego homeostazy. Należy zaznaczyć, iż kluczowe dla działania tego organu są również interakcje pomiędzy jego komórkami poprzez wyspecjalizowane połączenia międzykomórkowe. Na podstawie kilkuletnich badań grupy Bilińskiej wiadomo, że ograniczenie dostępności androgenów poprzez zablokowanie ich działania na poziomie receptora androgenowego (AR), wywołuje zaburzenie ekspresji i lokalizacji białek połączeń międzykomórkowych, co wydaje się być przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania gonady męskiej knurów. Ponadto, w najnowszych badaniach udowodniono, że flutamid aktywując kinazę Src, nasila fosforylację N-kadheryny i β -kateniny w gonadzie męskiej szczura, co prowadzi do rozpadu kompleksu tych białek, ich delokalizacji i rozluźnienia połączeń przylegania w rejonie bariery krew-jądro. Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie czy antyandrogen flutamid zaburza funkcjonowanie AR i białek połączeń przylegania β -kateniny i E-kadheryny w prostacie poprzez wpływ na zmianę ekspresji, lokalizacji i poziomu fosforylacji kinaz białkowych: c-Src, Raf-1, ERK1/2 i kinazy Akt, uczestniczących w nieklasycznej drodze kontrolowanej przez androgeny. Cele pracy realizowane były w systemie *in vivo* i w systemie *in vitro*. W badaniach stosowano techniki molekularne i biochemiczne pozwalające na wykazanie zmian ekspresji genów na poziomie mRNA i białka oraz zmian fosforylacji badanych kinaz. Natomiast w celu lokalizacji badanych białek i kinaz białkowych w poszczególnych komórkach prostaty wykorzystano techniki immunohistochemiczne i immunocytochemiczne.

W systemie *in vivo* knurom podawano flutamid w iniekcjach podskórnych w dawce 50 mg/kg masy ciała co drugi dzień. Pierwszą grupę stanowiły knury poddawane działaniu flutamidu w okresie neonatalnym od 2 – 10 dnia po urodzeniu (PD2), natomiast drugą grupę stanowiły knury eksponowane na flutamid w okresie prepubertalnym od 90 – 98 dnia po urodzeniu (PD90). Analiza histologiczna prostaty dojrzałych płciowo knurów wykazała zmiany morfologiczne nabłonka prostaty w wyniku ekspozycji na flutamid. Na podstawie analizy qRT-PCR i Western blot stwierdzono obniżoną ekspresję genów kodujących AR i E-kadherynę zarówno na poziomie mRNA, jak i białka oraz podwyższoną ekspresję β -kateniny na poziomie białka. W kolejnym etapie badań, analiza immunohistochemiczna wykazała, iż flutamid zaburza lokalizację AR i β -kateniny w komórkach prostaty knura.

W badaniach prowadzonych w systemie *in vitro* materiał badawczy stanowiły ludzkie linie komórek nowotworowych: LNCaP – posiadające AR oraz PC3 nie posiadające AR. Komórki obu badanych linii inkubowane były z hydroksyflutamidem (HF). Analiza western blot i ocena densytometryczna wykazały, iż w komórkach LNCaP inkubacja z HF prowadzi do spadku fosforylacji AR oraz wzrostu fosforylacji E-kadheryny, zaś w komórkach PC3 podanie HF wywołuje spadek poziomu fosforylacji N-kadheryny i β -kateniny. Zmiany te świadczą o zaburzeniu funkcjonowania białek połączeń przylegania i mogą wyjaśniać inwazyjność tych komórek. Ponadto, w komórkach LNCaP podanie HF uruchamia transaktywację (cross-talk) ścieżki PI3K/Akt i MAPK poprzez obniżenie fosforylacji kinazy Akt i spadek aktywności kinaz Raf-1 i ERK1/2, co hamuje ścieżkę MAPK. W komórkach PC3 natomiast, HF powoduje wzrost poziomu fosforylacji kinazy Akt i ERK1/2 bez możliwości oddziaływania typu „cross-talk”. W dalszych badaniach analiza immunocytochemiczna wykazała zmiany lokalizacji kinazy Akt w komórkach LNCaP i kinazy ERK1/2 w komórkach PC3 po ekspozycji na HF, co prowadzi do utraty funkcjonalności tych kinaz i skutkuje nieprawidłową sygnalizacją przez PI3K/Akt i MAPK.

Zatem, zarówno zablokowanie przez flutamid klasycznej drogi działania androgenów przez AR, jak i zaburzenie przez HF sygnalizacji z udziałem kinaz białkowych może być przyczyną zmian funkcjonowania połączeń przylegania w prostacie.