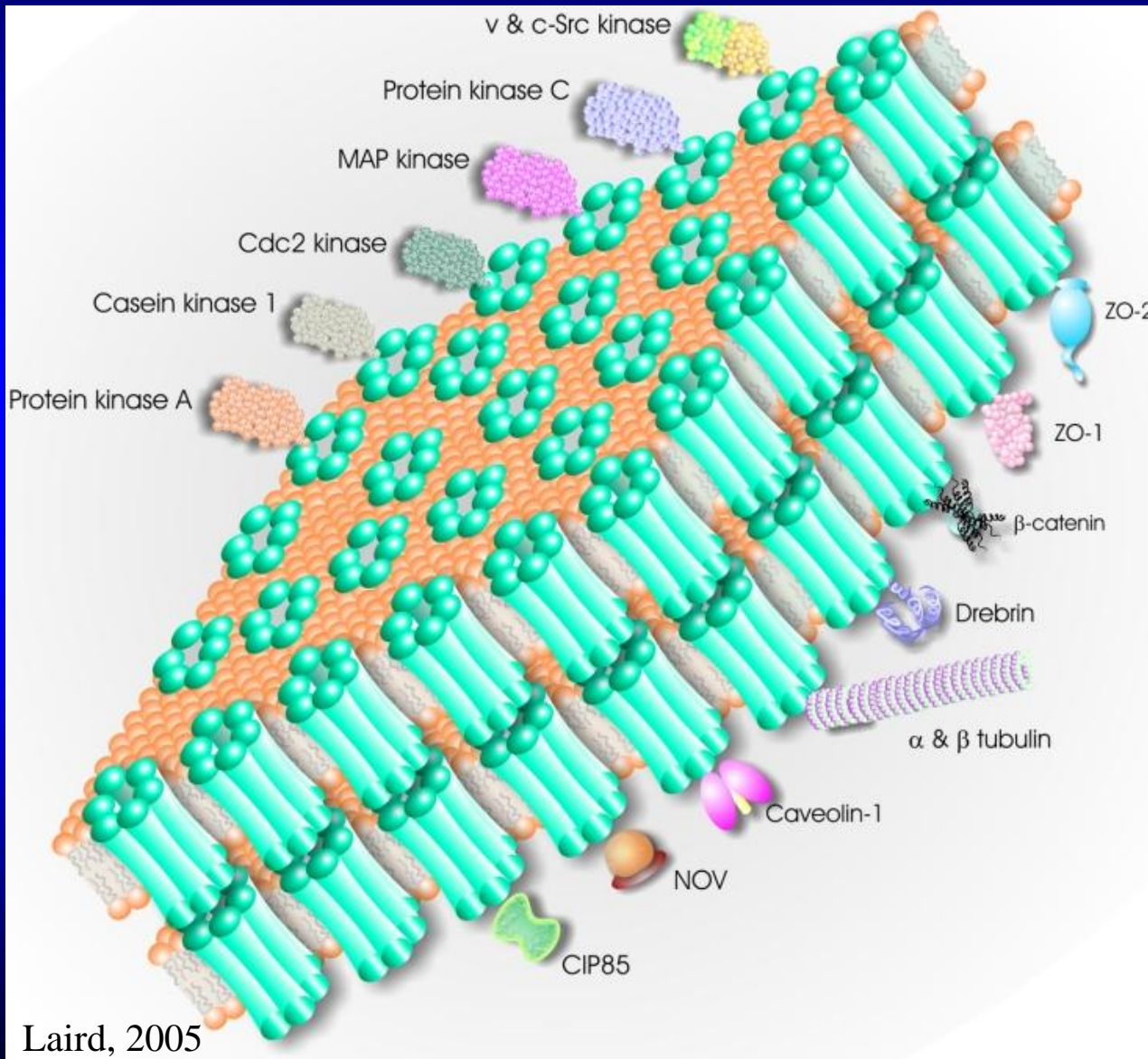


Kategorie składników „kompleksu powierzchniowego” regulujących funkcje złącz szczelinowych

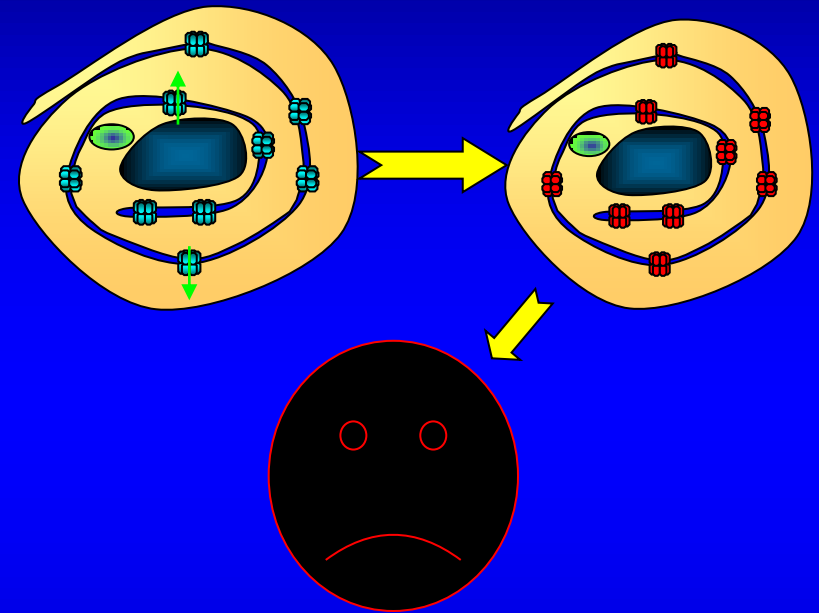
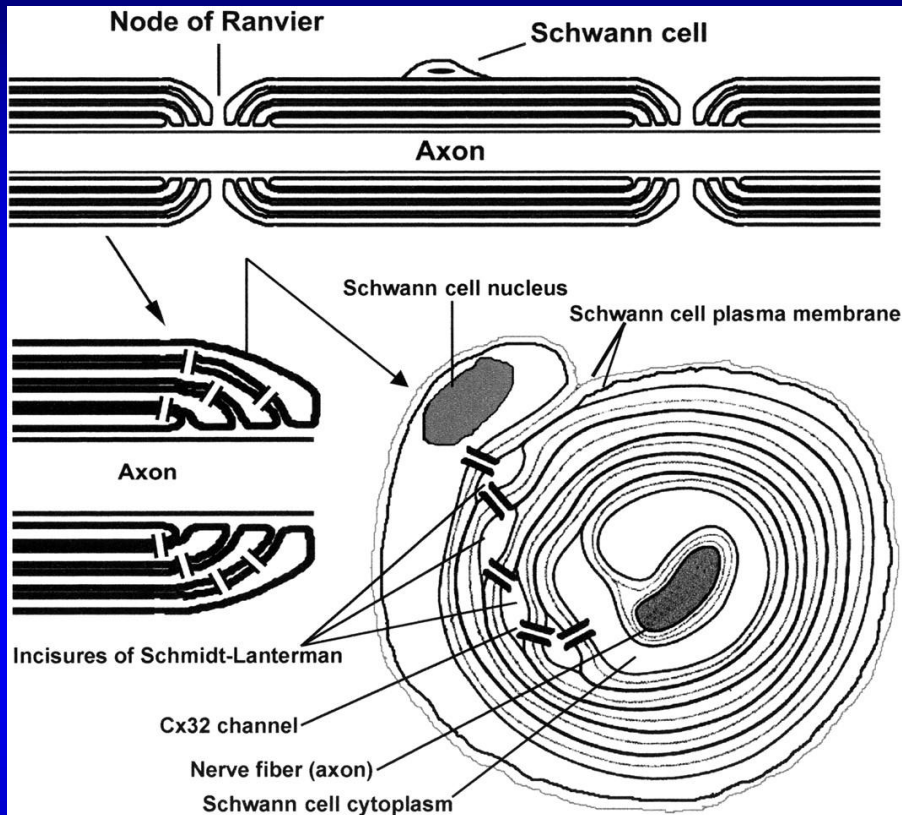


1. Białka sygnałowe
2. Białka strukturalne

Choroby związane z dysfunkcją złącz szczelinowych

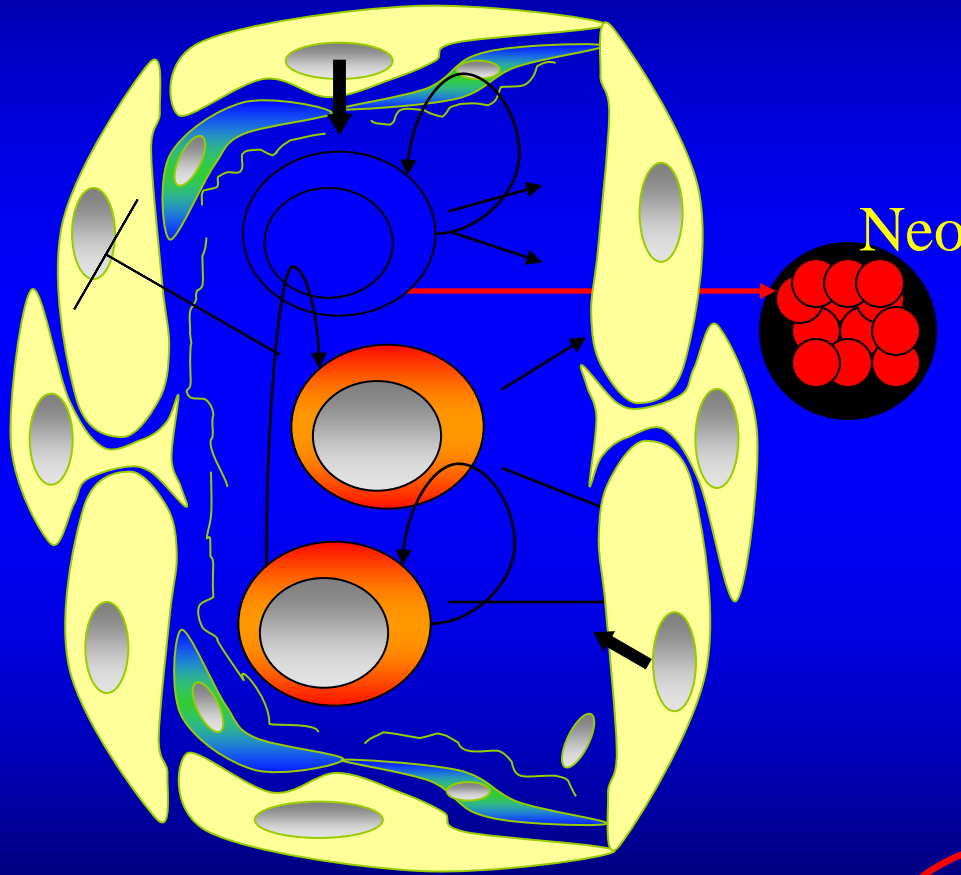
- Mutacje genu kodującego Cx37 wywołują nieplodność samic myszy, co wynika z roli Cx37 w komunikacji międzykomórkowej między oocytami, a komórkami *granulosa*
- Zahamowanie funkcji genu kodującego Cx40 prowadzi do arytmii pracy mięśnia sercowego, poprzez upośledzenie przewodzenia bodźców elektrycznych między przedsionkami a komorami
- Zahamowanie funkcji genu kodującego Cx43 wywołuje wady rozwojowe mięśnia sercowego, najprawdopodobniej wynikające ze zmian aktywności migracyjnej komórek grzebienia neuralnego
- Cx26 wywołują głuchotę, prawdopodobnie poprzez upośledzenie międzykomórkowego transferu jonów potasu w obrębie ucha wewnętrznego
- Spadek ekspresji Cx32 upośledza koordynację sekrecji glukozy przez hepatocyty wywołanej bodźcem elektrycznym, a także znacznie zwiększa ryzyko rozwoju nowotworów wątroby

Funkcja Cx32 w determinowaniu wewnątrzkomórkowego transferu metabolitów w obrębie komórek Schwanna



Mutacje genu kodującego Cx32 (stwierdzono przynajmniej 90 ich typów !), wywołują u człowieka chorobę Charcot-Marie-Tooth (CMTX), polegającą na postępowej degeneracji nerwów peryferycznych, wynikającej z upośledzonej komunikacji między fałdami komórek Schwanna

Funkcja „Niszy” czyli mikrośrodowiska komórek w transformacji nowotworowej



Mediatory wymiany informacji między komórką a „niszą” wspomagające transformację nowotworową:

- zaburzenia funkcji endo- i egzogennych czynników humoralnych– oddziaływania „krynne”
- modyfikacje składu macierzy międzykomórkowej oraz ekspresji receptorów adhezji komórkowej, np. integryn i kadheryn
- zmiany równowagi mechanochemicznej w obrębie „niszy”, prowadzące do zaburzeń wymiany bodźców mechanicznych między komórką a jej mikrośrodowiskiem
- deregulacja bezpośredniej wymiany metabolitów za pośrednictwem złącz szczelinowych

Cechy komórek nowotworowych

Wykazują niekontrolowany wzrost, co objawia się:

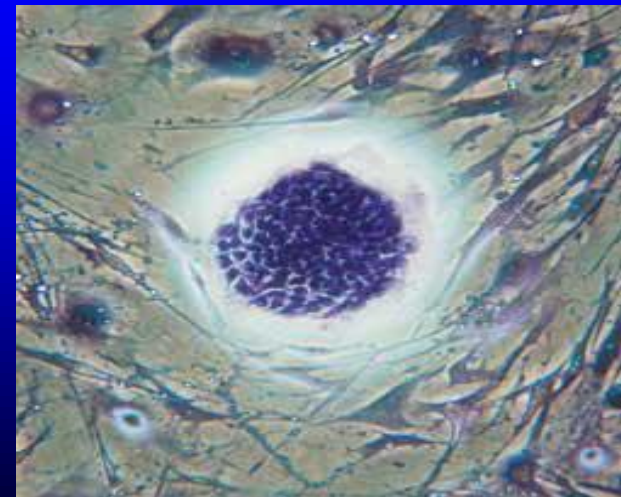
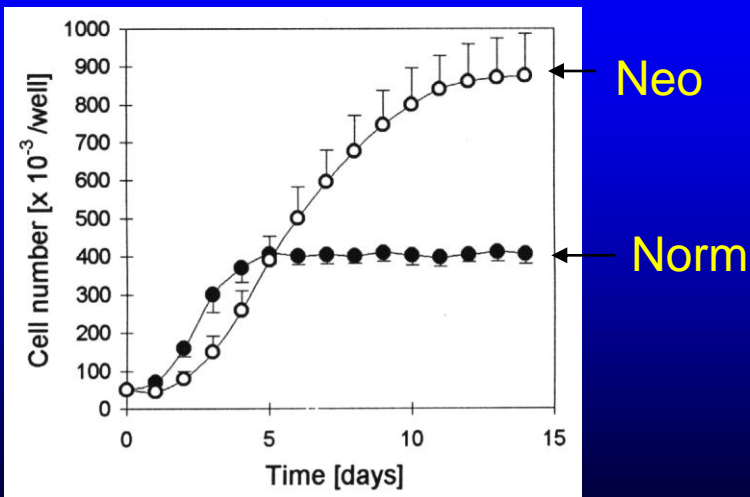
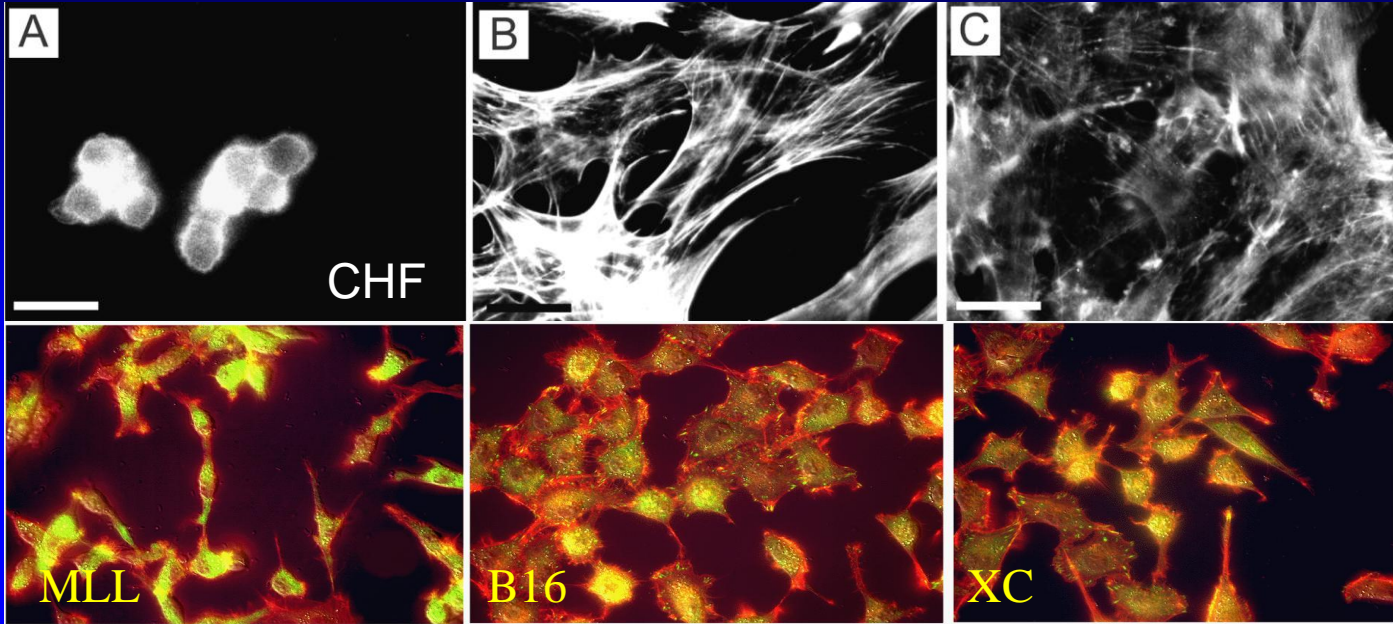
- brakiem zahamowania kontaktowego proliferacji oraz;
- zależności wzrostu od przyczepienia się do podłoża
- nie podlegają one także *anoikis*;

• Wiele z nich wykazuje spadek ekspresji koneksyn w porównaniu z komórkami tkanki, z której pochodzą, co w powiązaniu z faktem, iż...

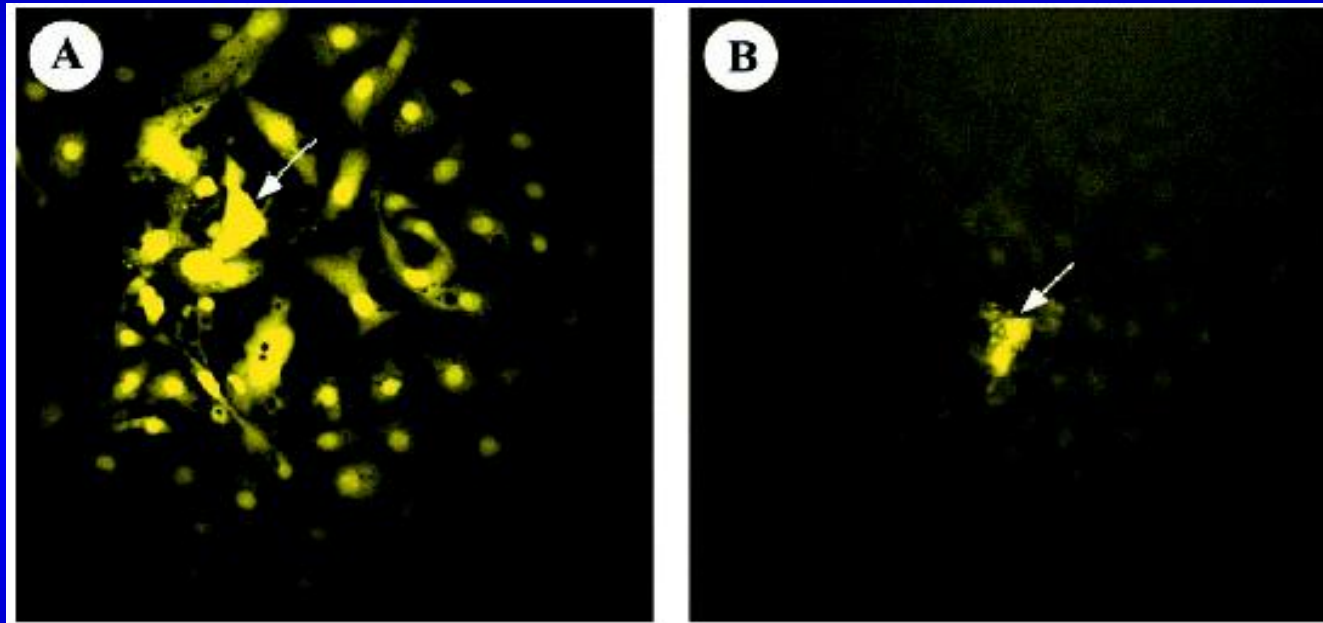
...wyciszenie ekspresji koneksyn np. Cx32 u myszy powoduje wzrost podatności na kancerogenezę chemiczną...

...sugeruje, że „rozmowa” między komórkami decyduje o „socjalizacji” ich zachowań - „by-stander effect”

Proliferacja i cytoszkielelet komórek prawidłowych i nowotworowych



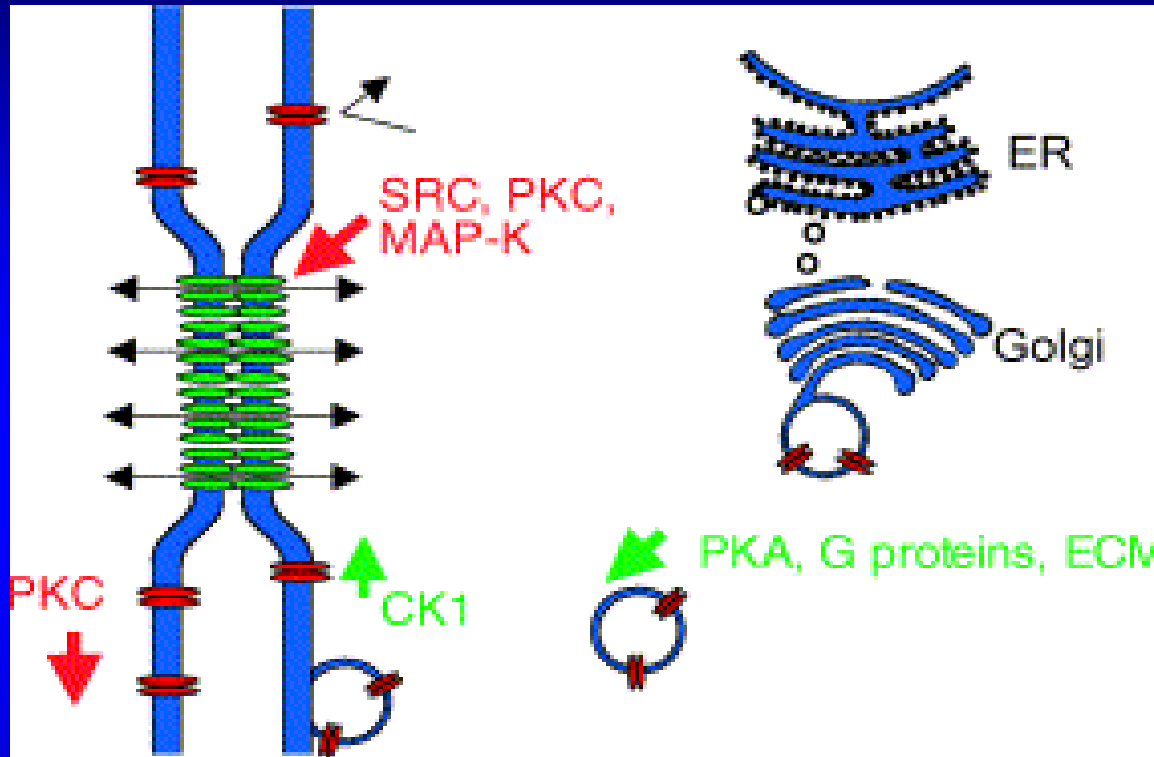
Różnice w intensywności GJIC między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi



Mikroiniekcja...

...wybraną komórkę nastrzykuje się barwnikiem a następnie obserwuje się tempo jego rozchodzenia do komórek sąsiednich...

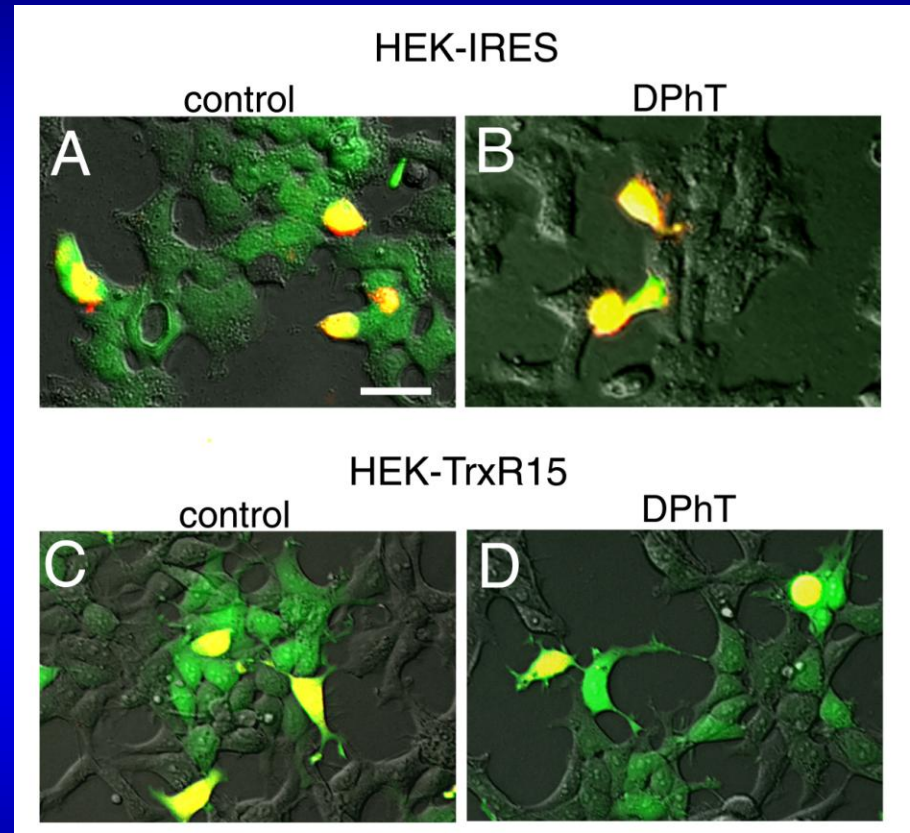
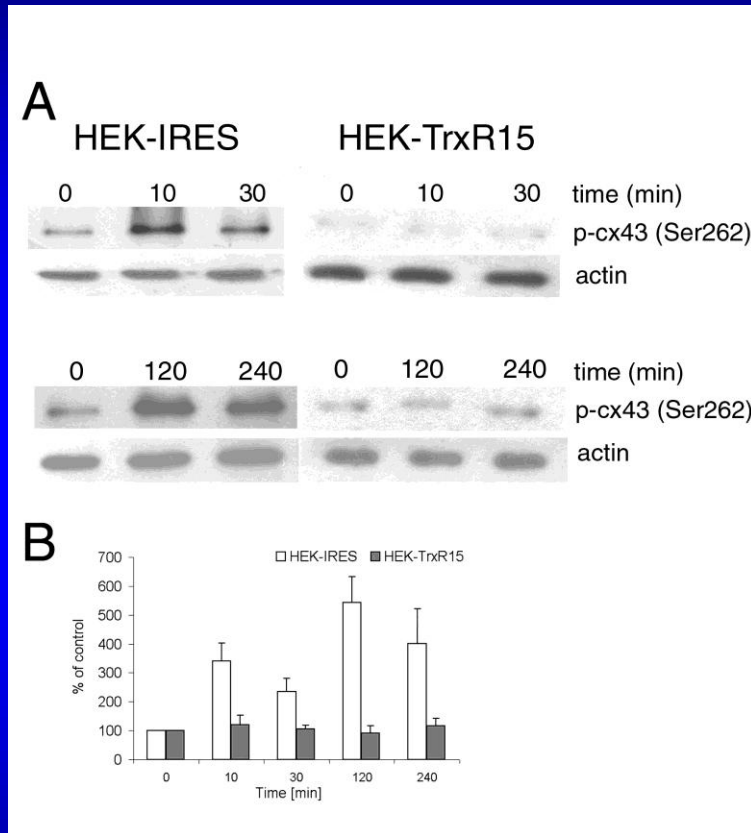
Wpływ aktywności kinaz białkowych na „obrót” koneksyn



Lampe & Lau, 2004, IJBCB 36: 1171

Kinazy białkowe fosforylując Cx43 wpływają na przebieg poszczególnych etapów „cyklu życiowego” tego białka

Fosforylacja Cx43 (Ser262) przez PKC skutkuje zahamowaniem komunikacji międzykomórkowej w sposób zależny od kontekstu komórkowego



Sroka et al., 2008

Konkluzja: zmiany poziomu fosforylacji koneksyn wpływają na przepuszczalność złącz szczelinowych

Korelacja między ekspresją koneksyn a potencjałem proliferacyjnym komórek nowotworowych

- Inicjacja
- Promocja
- Progresa – inwazja/tworzenie przerzutów

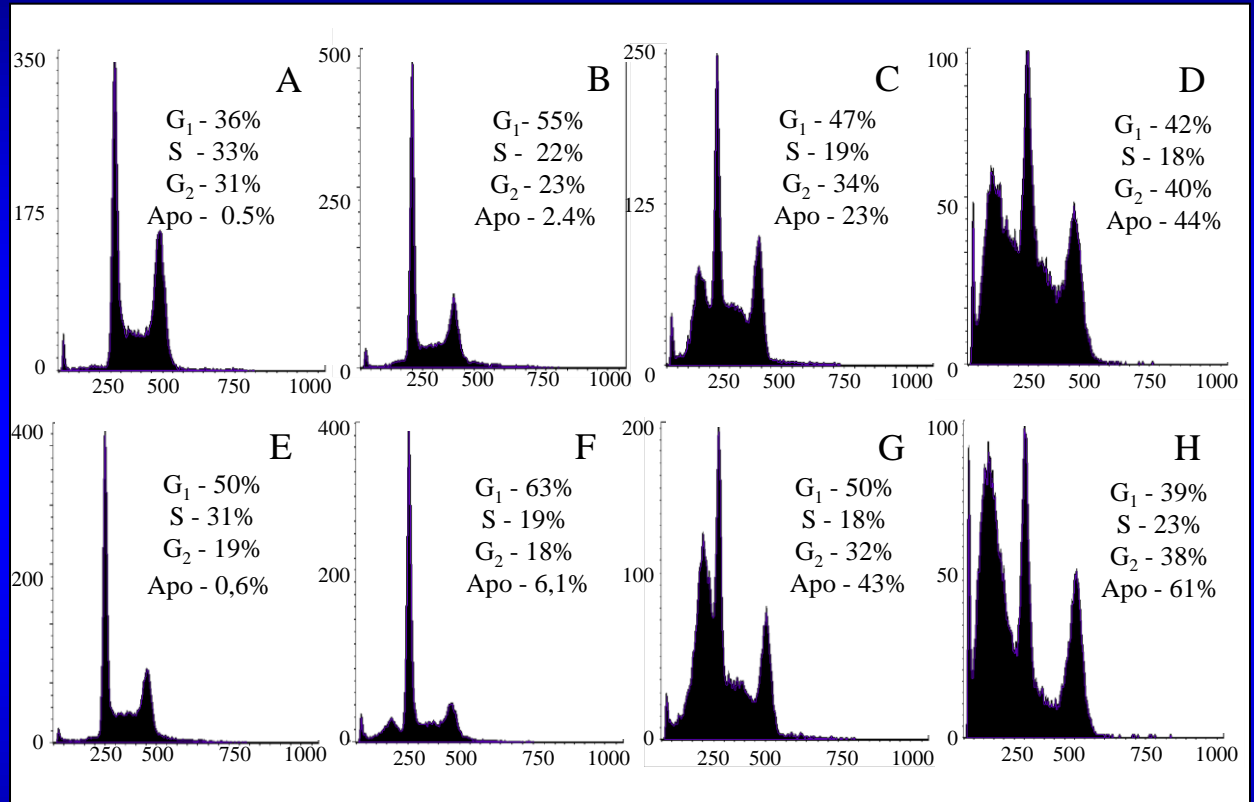


Tranfected connexin

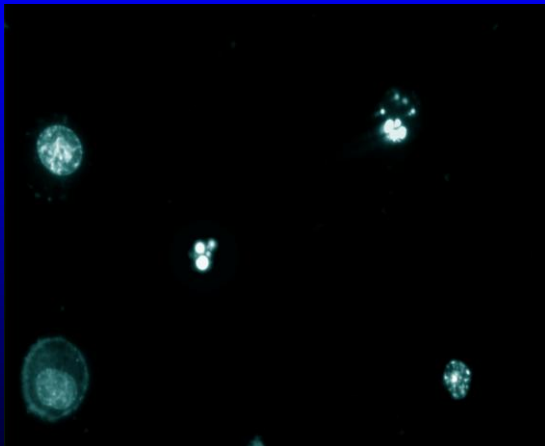
Rak sutka	Cx26/Cx43	Przyhamowany wzrost in vitro/in vivo (Hirschi et al., 1996)
Rak szyjki macicy (HeLa)	Cx43	Zahamowanie wzrostu niezależnego od przyczepienia (King et al., 2000)
Glioblastoma (U251T98G)	Cx43	Zahamowana proliferacja in vitro (Huang et al., 1998)
Hepatoma (SKHep1)	Cx32	Przyhamowana zdolność do tworzenia guzów (Eghbali et al., 1991)
Lung carcinoma (PG)	Cx43	Zahamowana proliferacja in vitro (Zhang et al., 1998)
Melanomas (UACC903)	Cx43	Wzrost zależny od przyczepienia (Su et al., 2000)
Prostate cancer (LNCaP)	Cx32/Cx43	Zahamowanie wzrostu (Mehta et al., 1999)

Efekt sąsiedztwa – "bystander effect"

HeLa wt

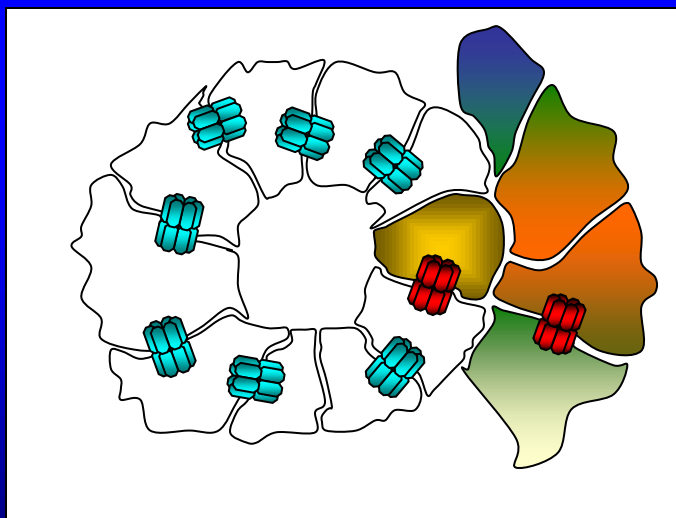


HeLa Cx43



Pierwotna funkcja złącz szczelinowych w rozwoju nowotworów

1. Zahamowanie funkcji złącz szczelinowych promuje rozwój choroby nowotworowej (Yamasaki, 1999, Loevenstein 1991)
2. Re-ekspresja koneksyn(y) prowadzi do choćby częściowej odbudowy fenotypu charakterystycznego dla komórek prawidłowych

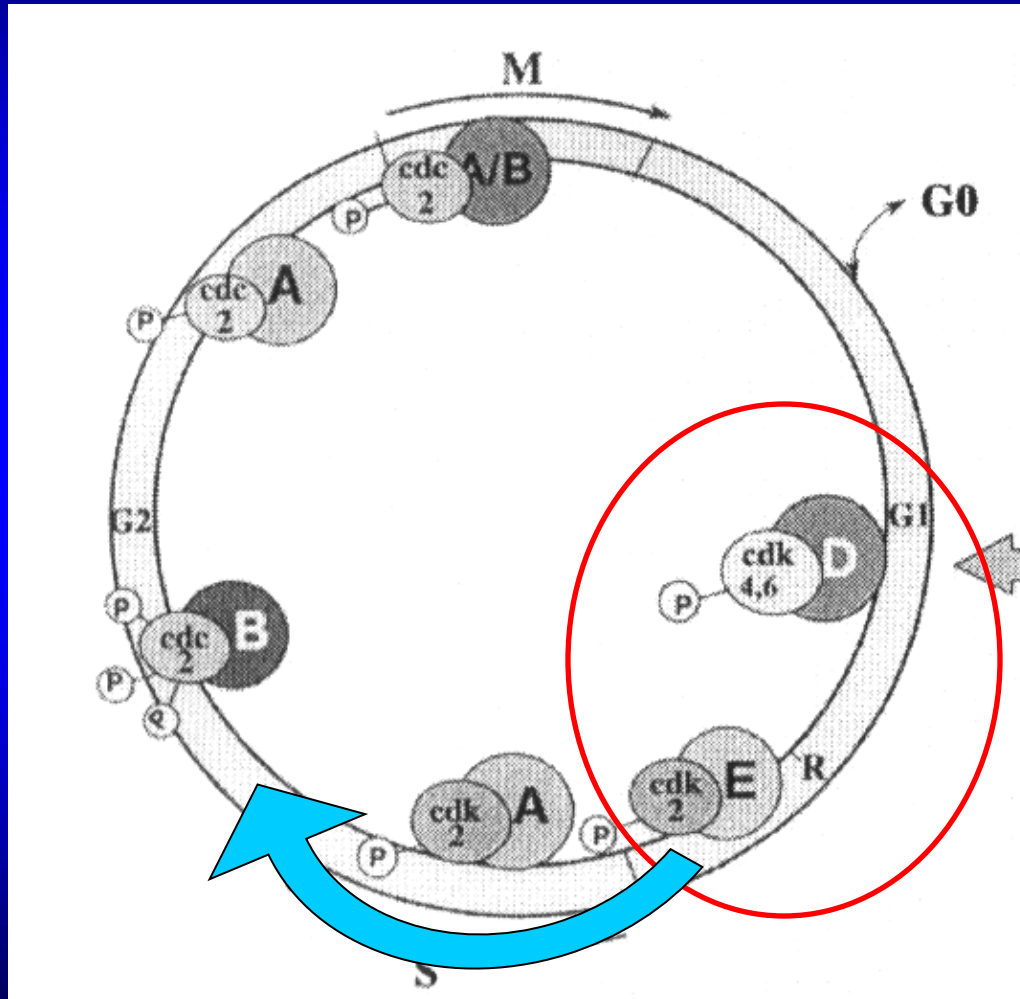


Mechanizmy:

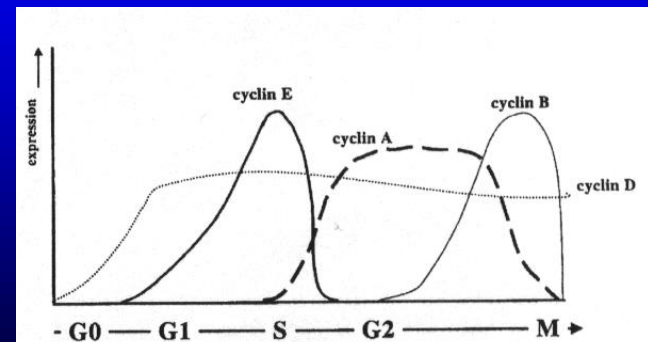
- Efekt sąsiedztwa
- Oddziaływania koneksyn z elementami regulującymi cykl komórkowy

„Point of no return”

Przejęcie G1/S



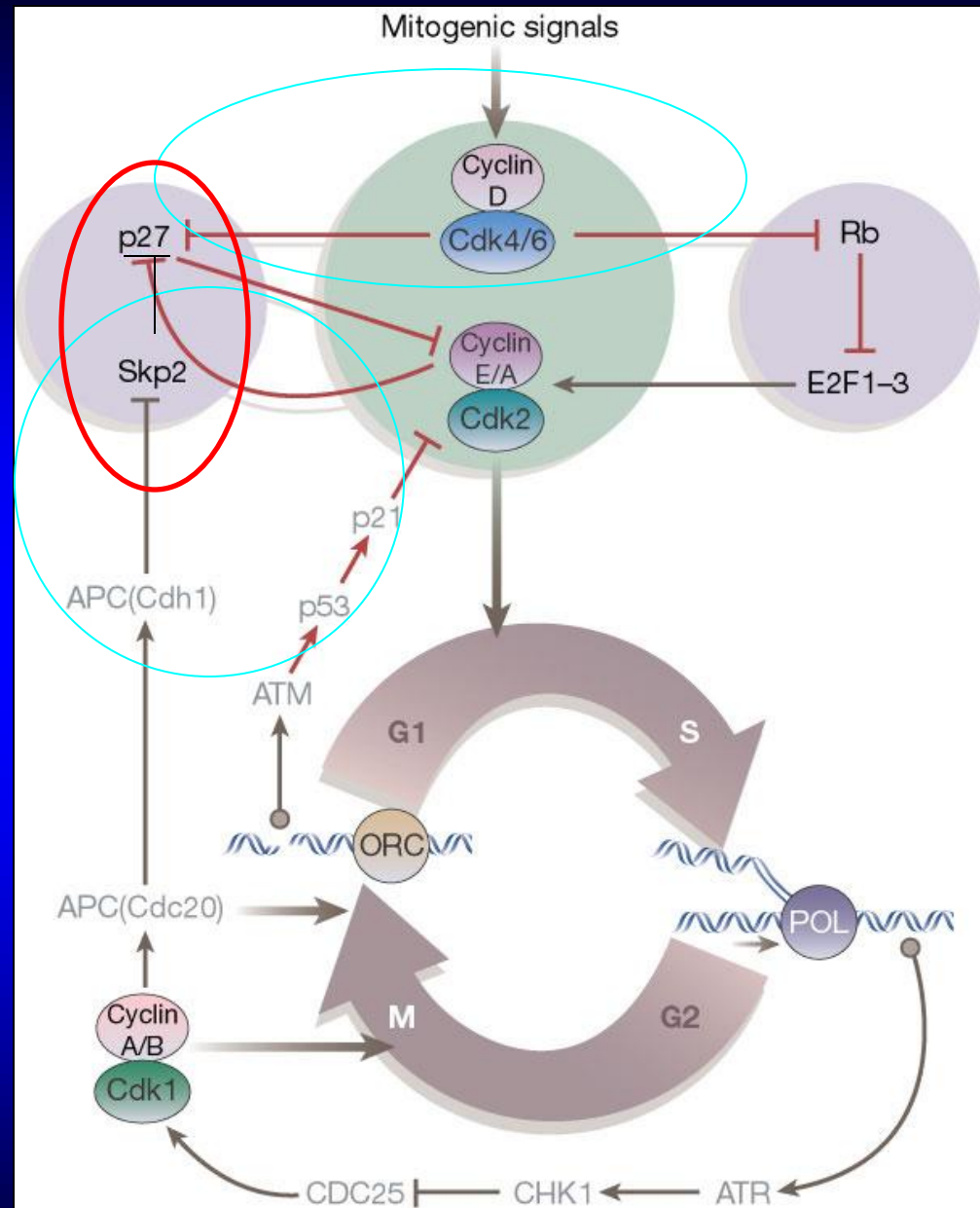
Aktywacja ścieżki MAP przez czynniki wzrostowe umożliwia przejęcie G1/S



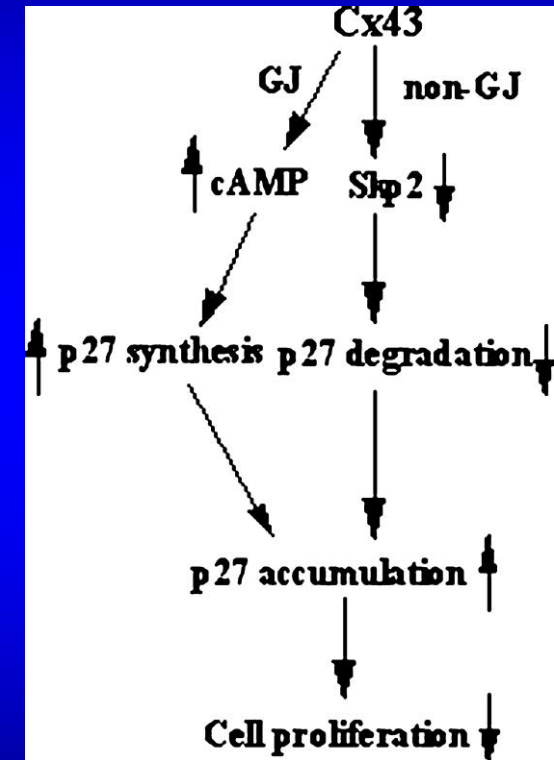
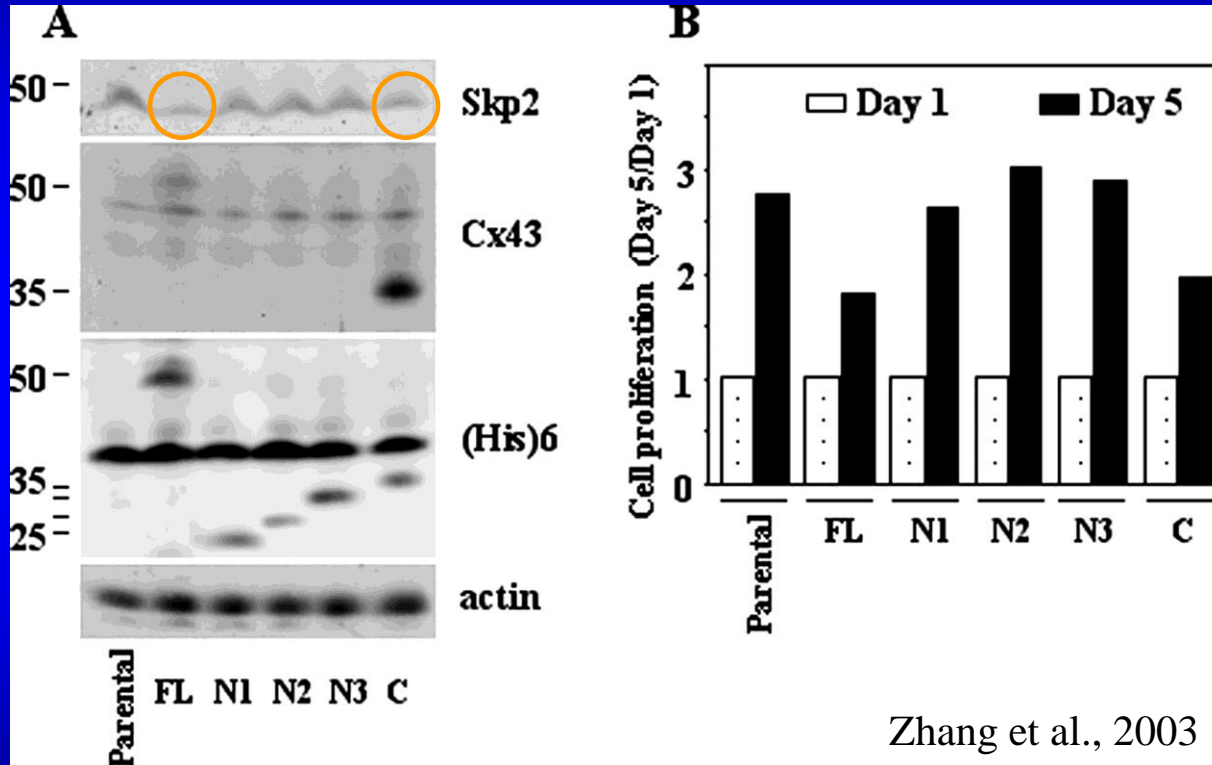
Schemat regulacji cyklu komórkowego

Funkcja białka skp2

skp2 fosforylując białko p27 umożliwia jego degradację, co z kolei zwalnia blokadę dla przejścia G1/S



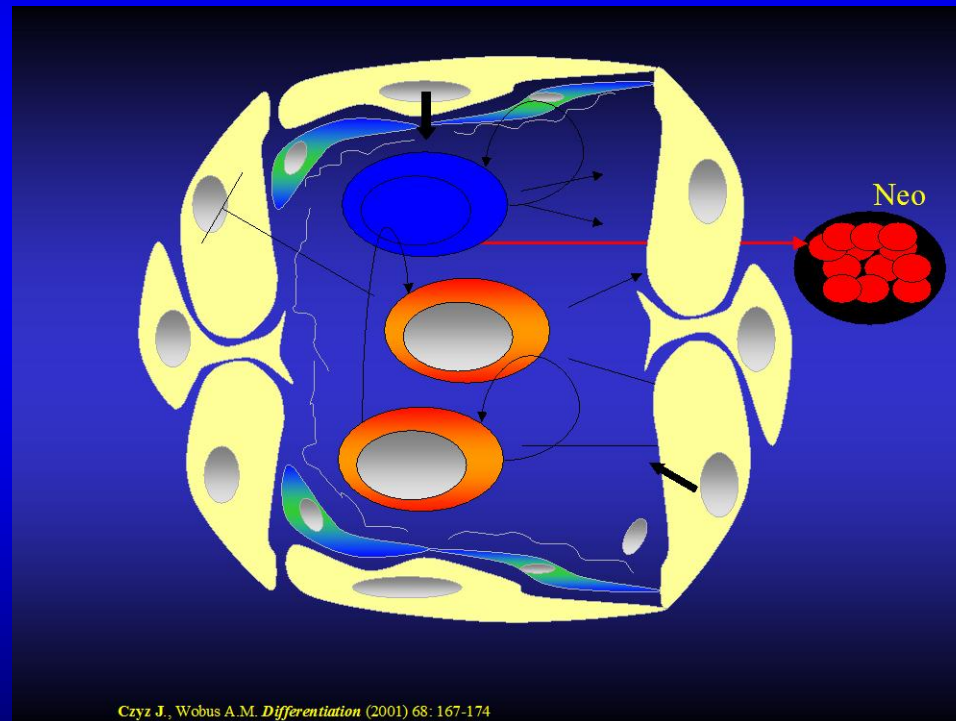
Wpływ wariantów Cx43 na proliferację komórek i poziom ekspresji skp2



Wniosek: Cx43 może synergistycznie wpływać na proliferację komórek w sposób zależny i niezależny od GJIC

Funkcja złącz szczelinowych w rozwoju nowotworów

- W początkowych etapach nowotworzenia (inicjacja, propagacja) zanik połączeń za pomocą złącz szczelinowych uwalnia komórki spod reżimu mikrośrodowiska...

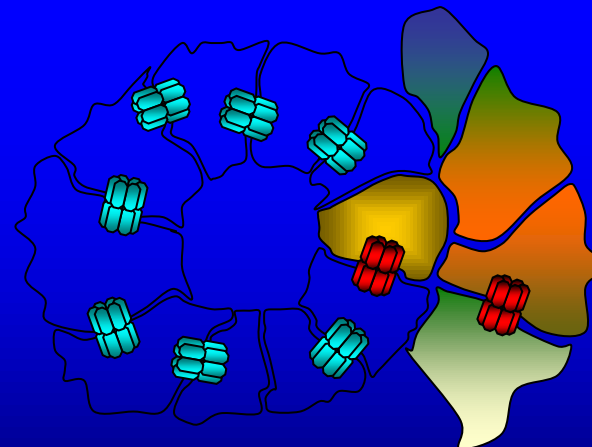


...a to wspomaga transformację nowotworową

Rola złącz szczelinowych w rozwoju nowotworów

Efekt hamujący :

1. Spadek ekspresji koneksyn obserwowany jest na wczesnych etapach rozwoju nowotworów.
2. Re-ekspresja koneksyn w komórkach transformowanych przynajmniej częściowo przywraca fenotyp charakterystyczny dla komórek prawidłowych.
3. Koneksyny wpływają na aktywność szlaków sygnałowych zależnych od cyklin, w sposób niezależny od komunikacji międzykomórkowej

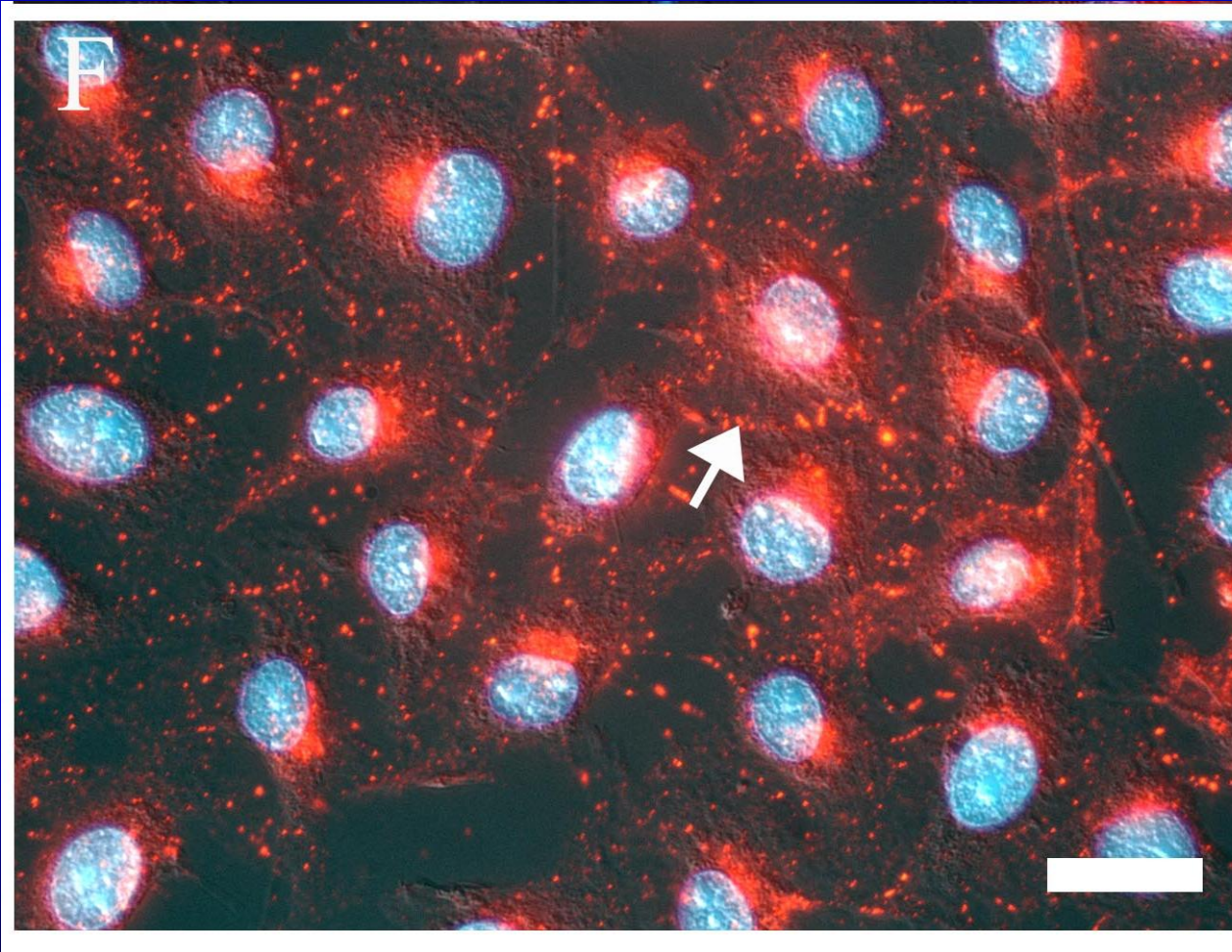


Efekt promujący:

1. Wiele linii komórek nowotworowych cechuje wysoki poziom ekspresji koneksyn i wysoka intensywność komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych

(Trosko, 2002)

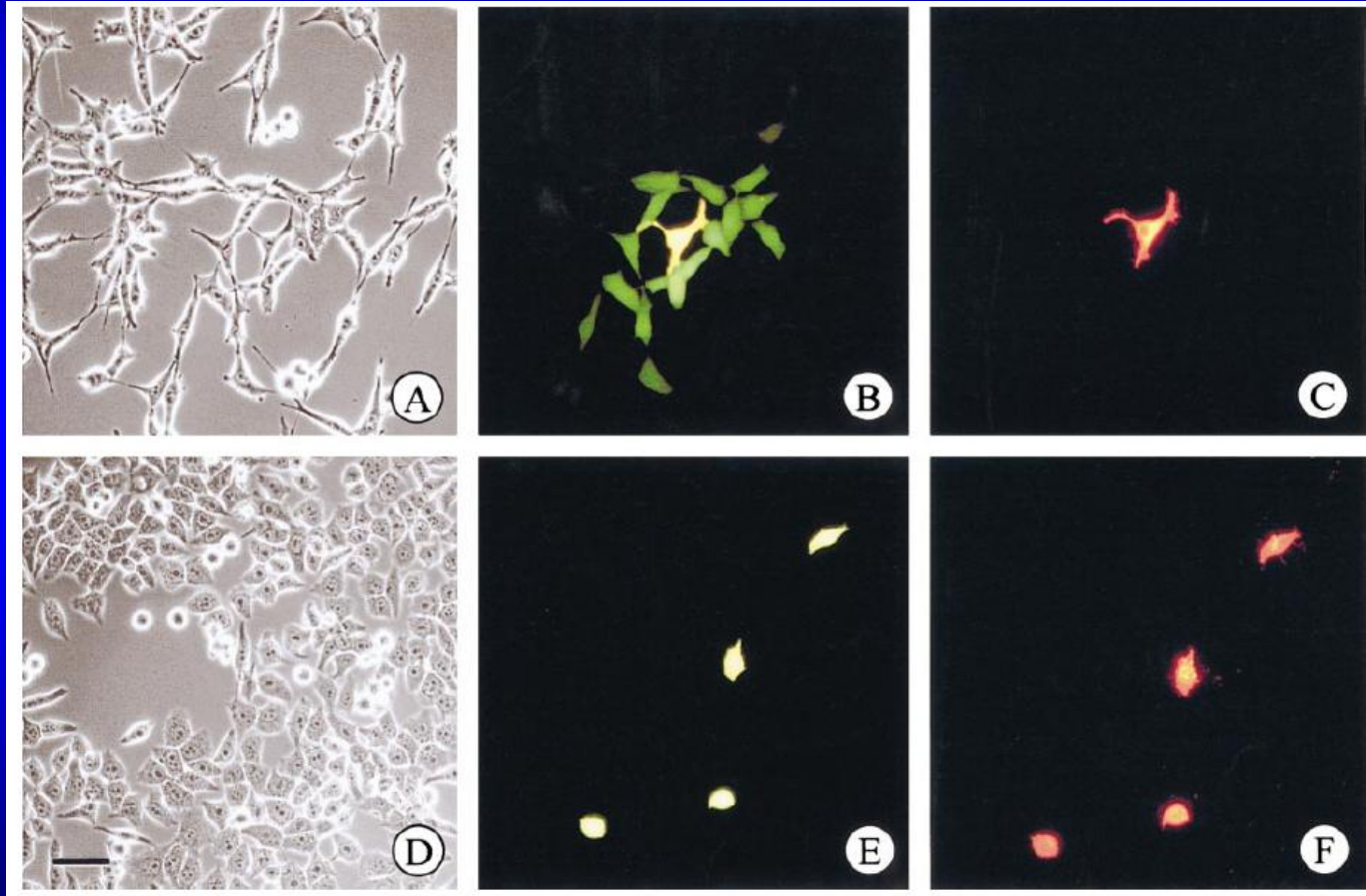
Aby komunikacja za pośrednictwem złącz szczelinowych mogła w ogóle zaistnieć potrzebna jest fizyczna obecność kompatybilnych koneksonów w błonach sąsiednich komórek



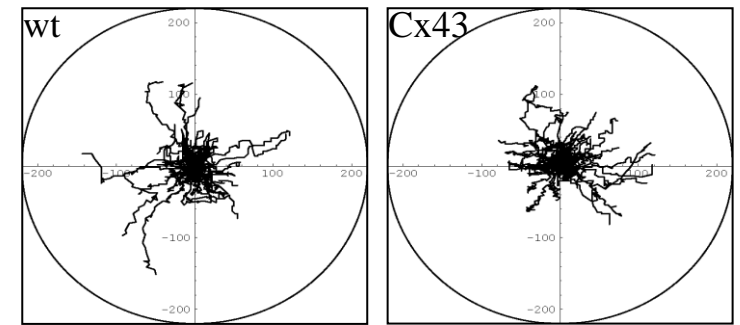
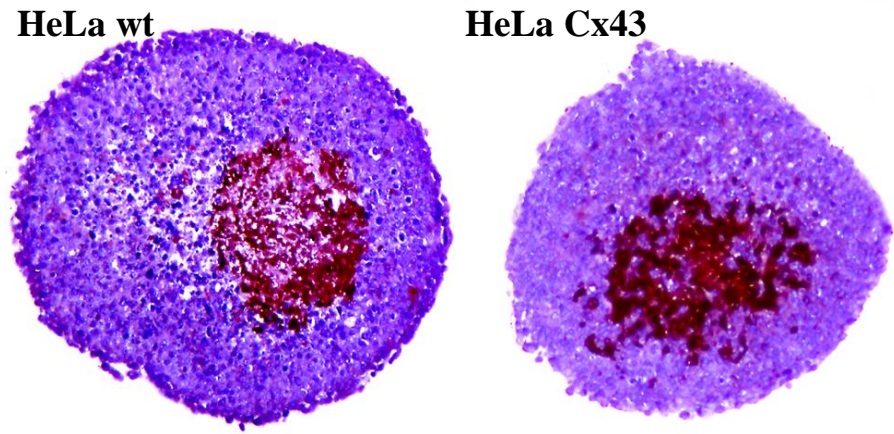
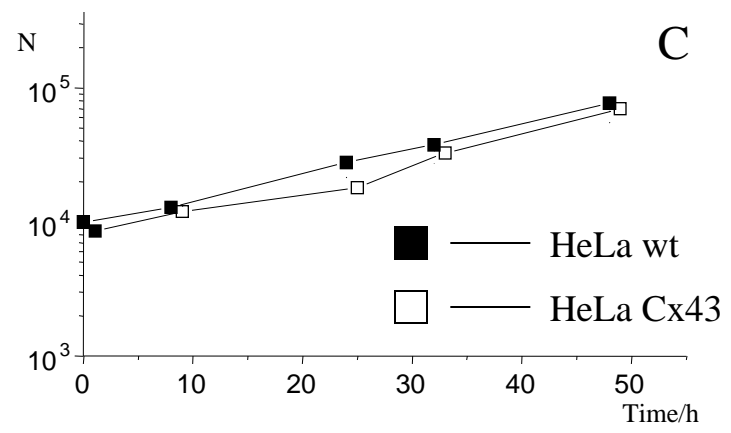
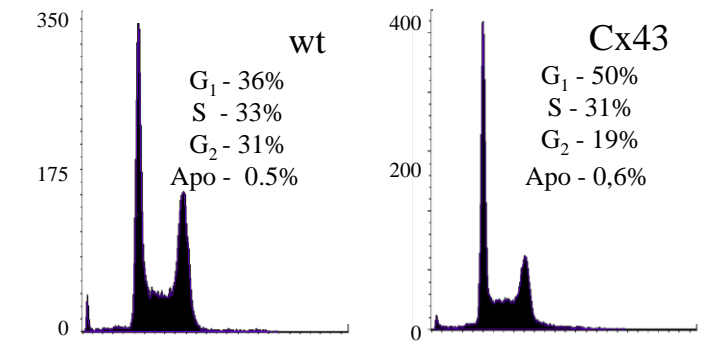
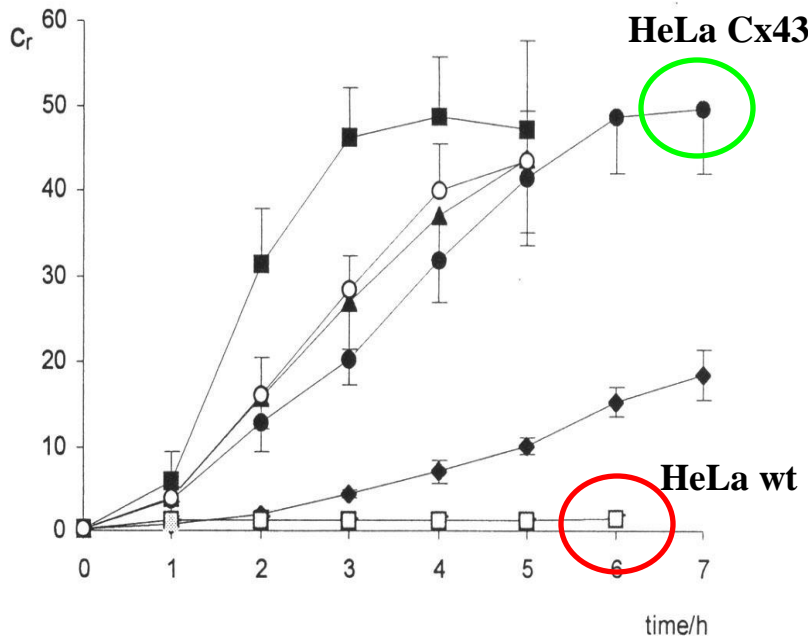
Komórki B16

DNA
Cx43

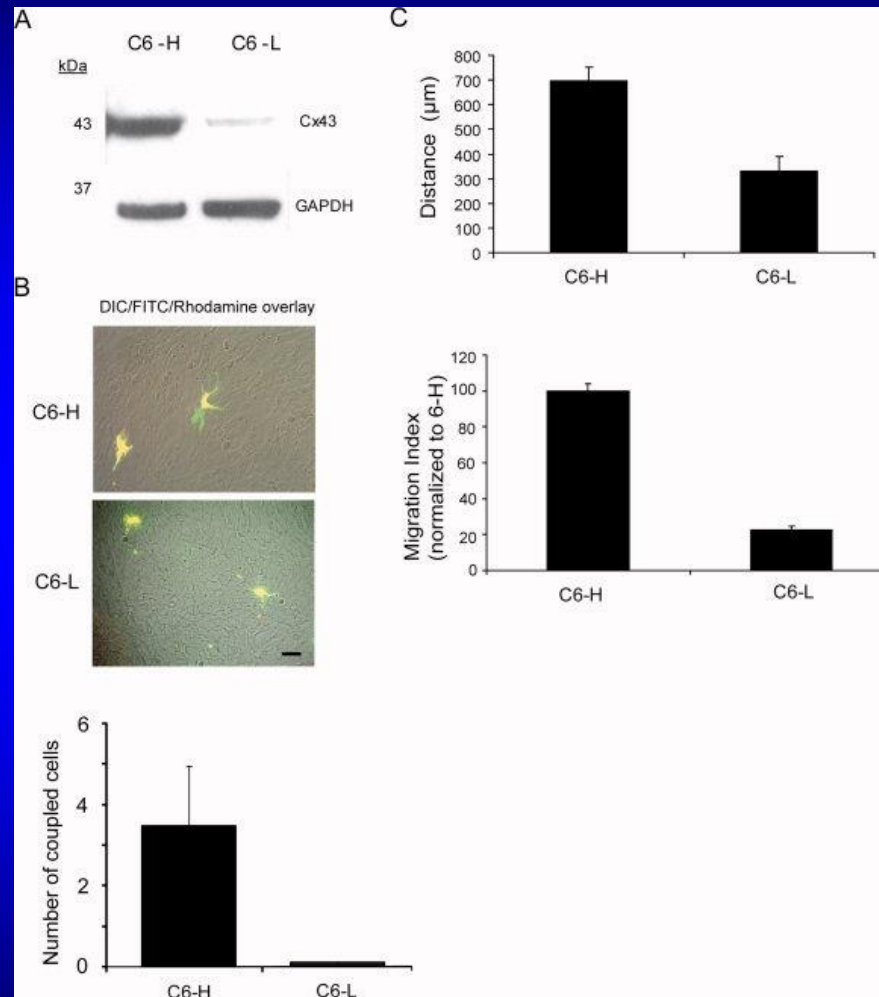
**Jakościowa analiza intensywności komunikacji
międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych
techniką wizualizacji międzykomórkowego transferu kalceiny**



Analiza potencjału metastatycznego i proliferacji szczepów linii HeLa różniących się ekspresją Cx43



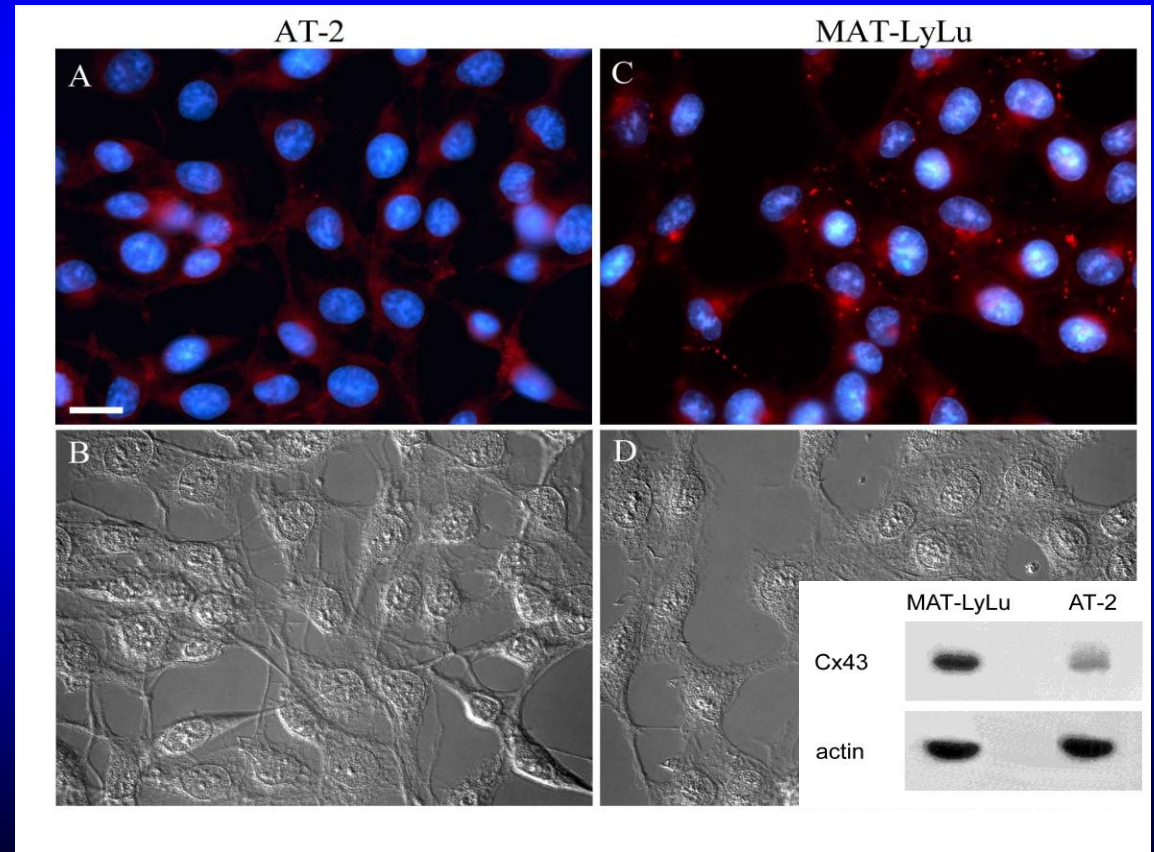
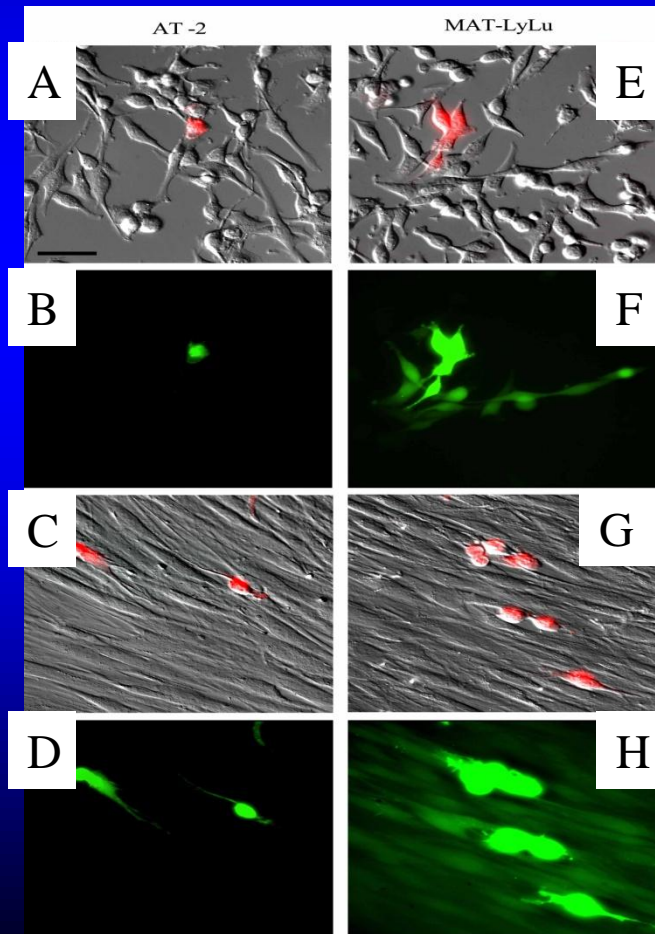
Wpływ Cx43 na migrację komórek glejaka



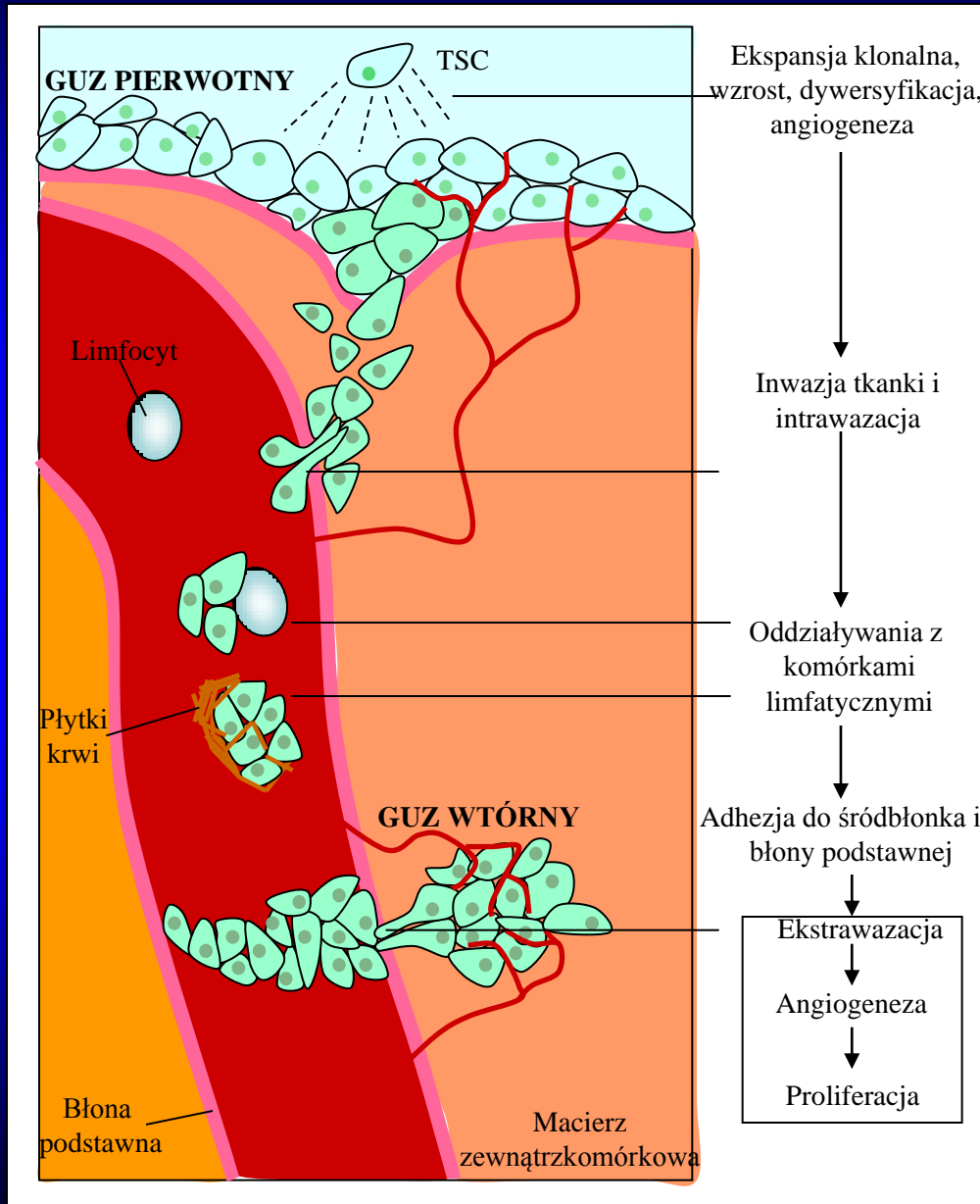
Bates, D. C., Sin, W. C., Aftab, Q., and Naus, C. C. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia* 55 (2007) 1554-1564.

Zaangażowanie komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych w procesach inwazji nowotworowej i determinowaniu potencjału metastatycznego komórek nowotworowych

1. Wykazano, iż szereg linii komórek nowotworowych o wysokim potencjale metastatycznym cechuje wysoki poziom ekspresji koneksyn (np. komórki raka sutki, glejaki, czerniaki...)



Podstawowy model rozwoju nowotworu



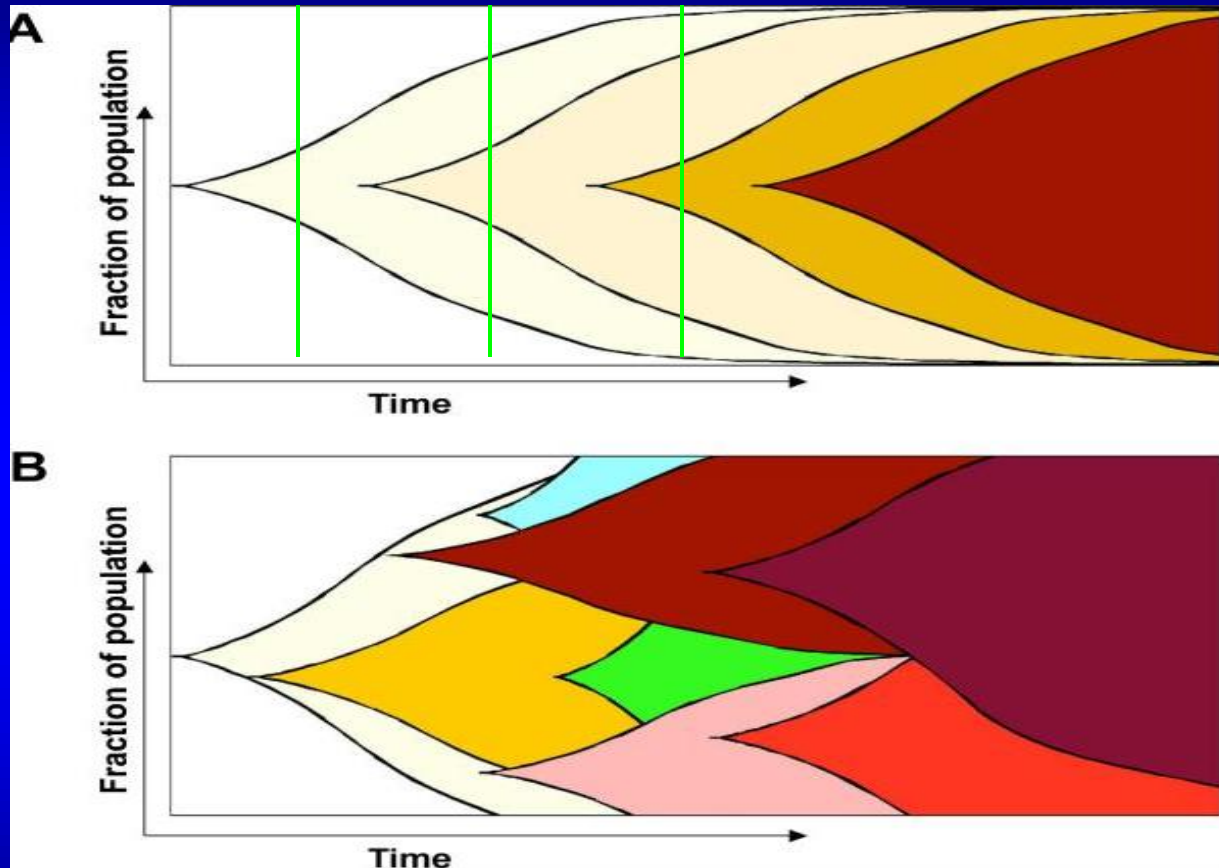
Właściwości komórek nowotworowych

1. Brak zależności wzrostu od lokalnej adhezji i funkcji czynników wzrostowych
2. Zanik wrażliwości na czynniki hamujące proliferację komórek
3. Zanik zdolności do apoptozy

4. Wzmożona ruchliwość

(Hanahan & Weinberg, 2000)

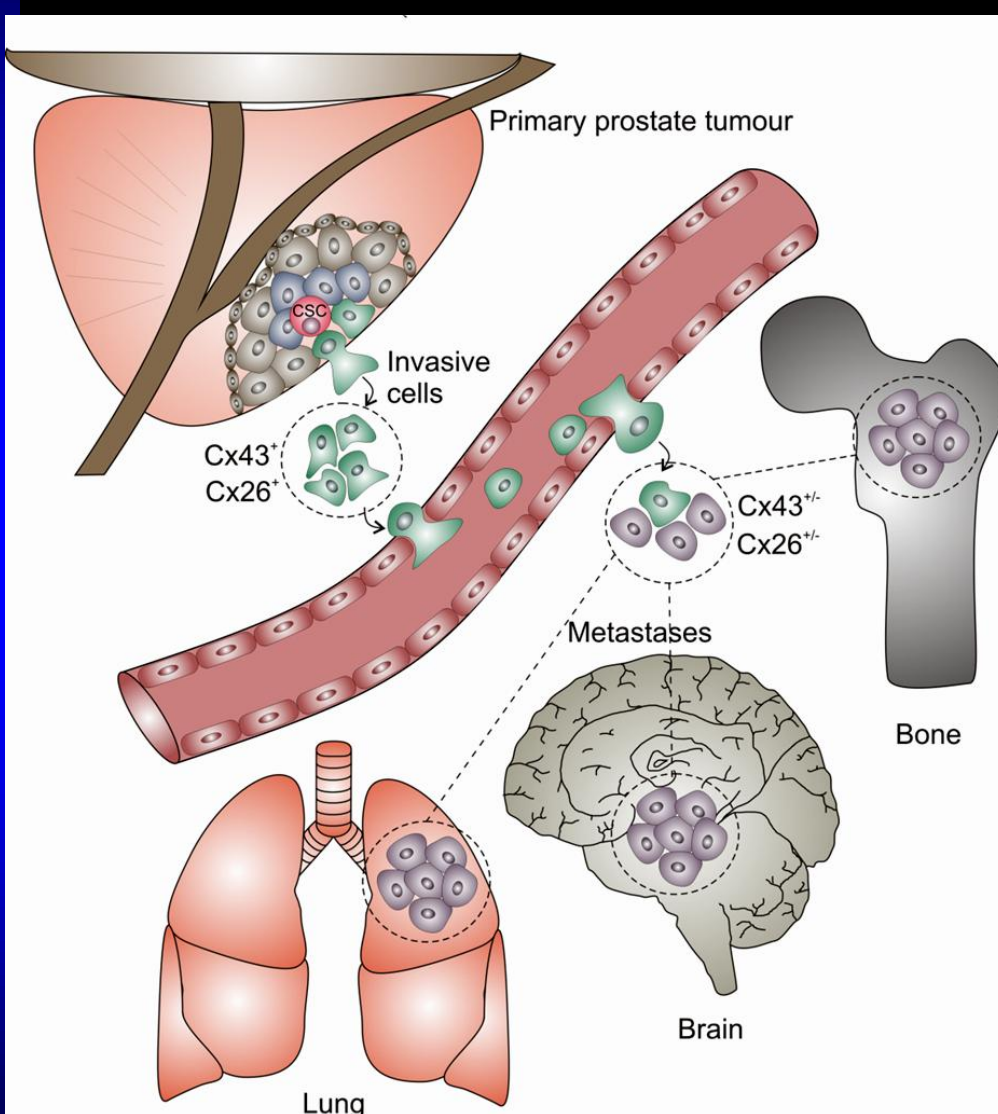
Źródła heterogenności komórek nowotworowych



Biochim Biophys Acta. 2010 January; 1805(1): 105.

Published online 2009 November 18. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.11.002

Kaskada metastatyczna w raku prostaty

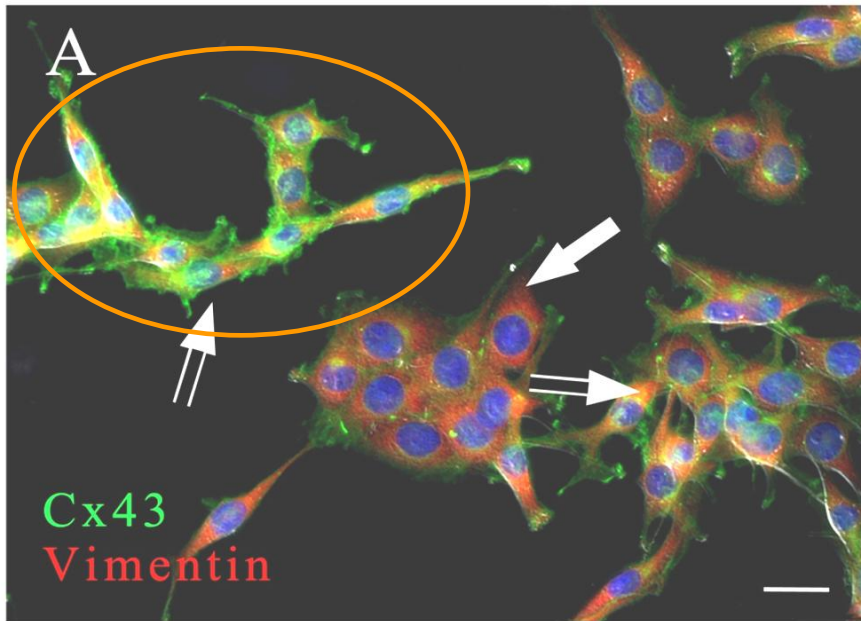


EMT: przejście epitelialno-mezenchymalne

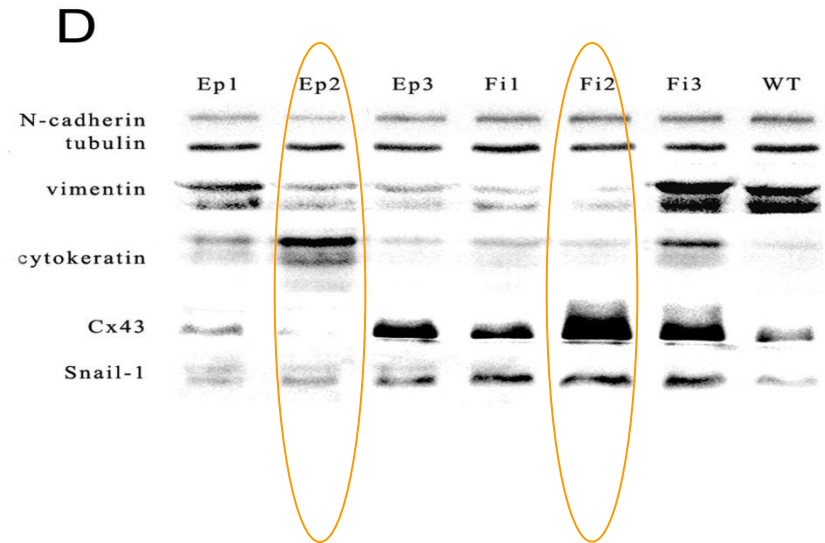
- zmiany morfologii
- aktywacja Snail
- zmiany ekspresji genów (E-kadheryna → N-kadheryna) etc.

Funkcja Cx43 ???

Funkcjonalna heterogenność komórek AT-2

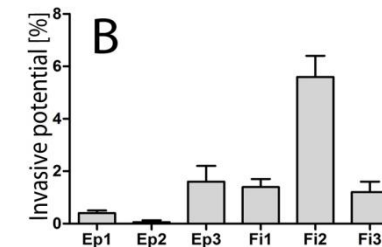
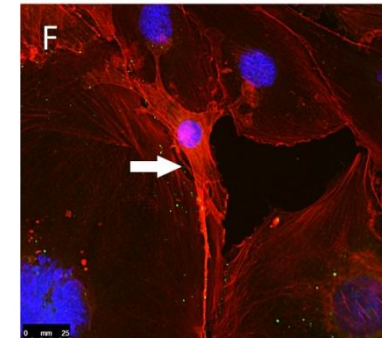
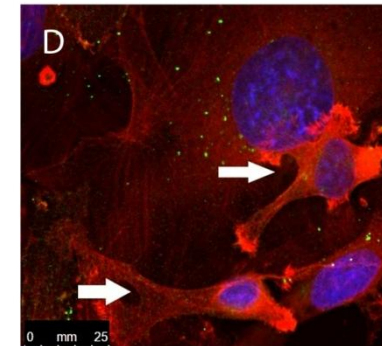
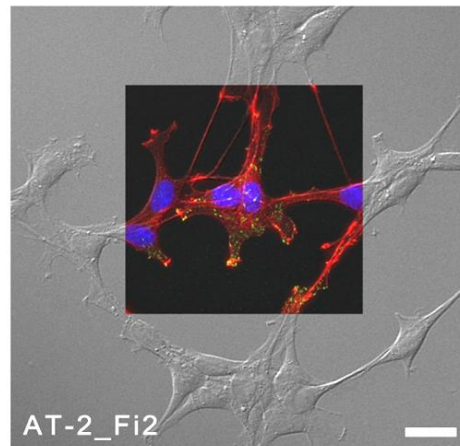
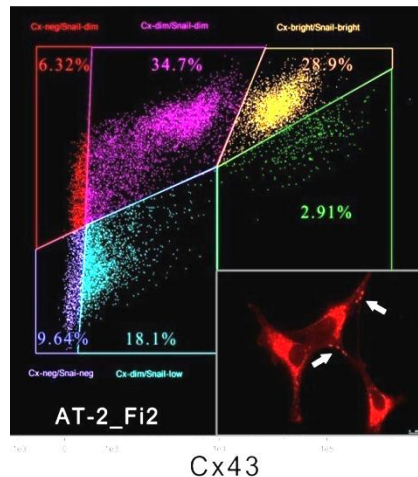
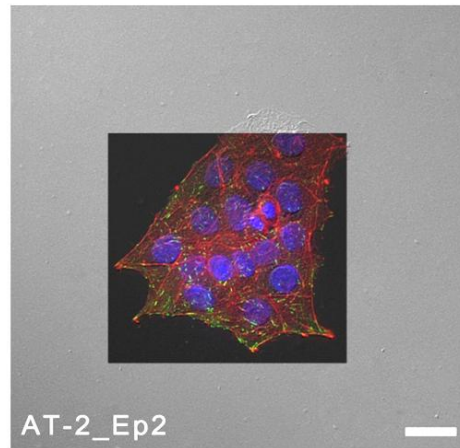
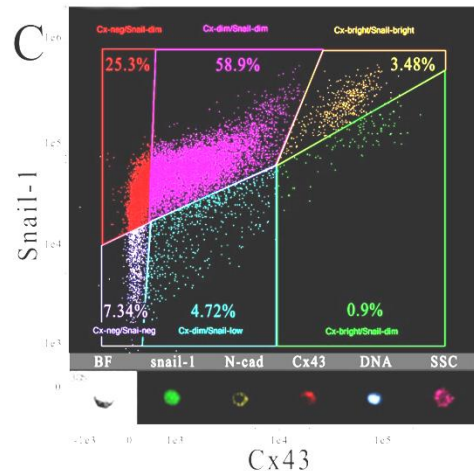


Ryszawy et al. (submitted)



„Niekompletne przejścia między fenotypem epithelioidalnym i mezenchymalnym odpowiadają za heterogenność komórek AT-2

Heterogenność sub-klonów AT-2

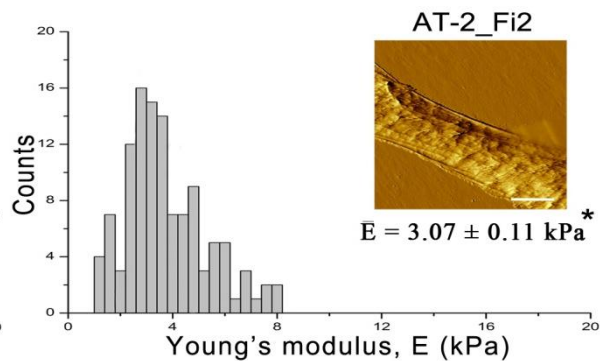


Ryszawy et al. (submitted)

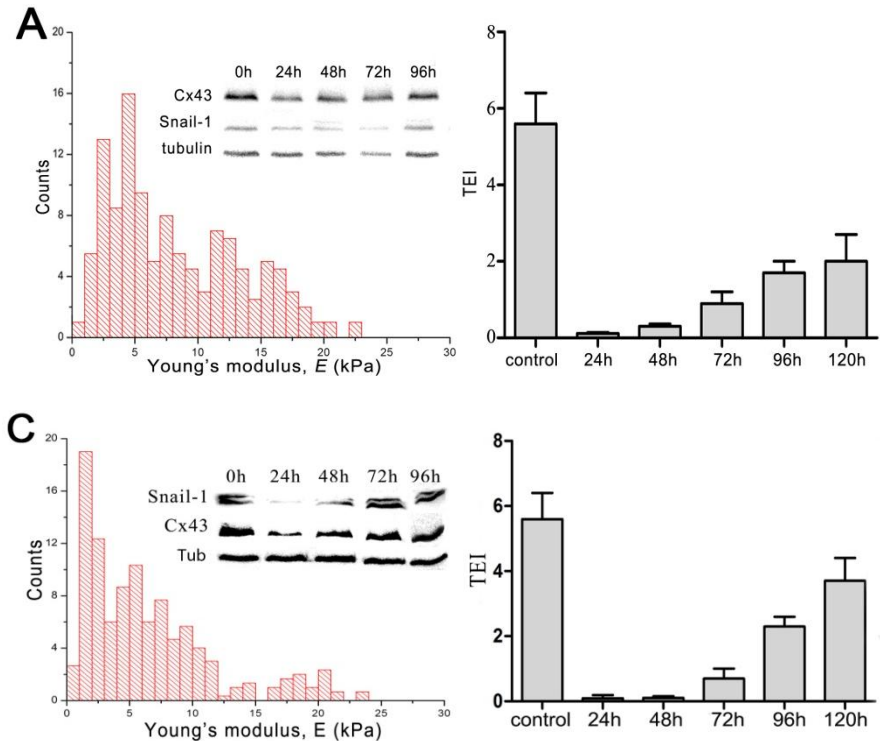
Korelacja między morfologią, ekspresją Snail-1 i Cx43, a potencjałem inwazyjnym subklonów AT-2

Pętle wspomagania między Cx43 a inwazyjnym fenotypem komórek AT-2_Fi2

Wyciszenie Cx43 indukuje MET komórek AT-2_Fi2

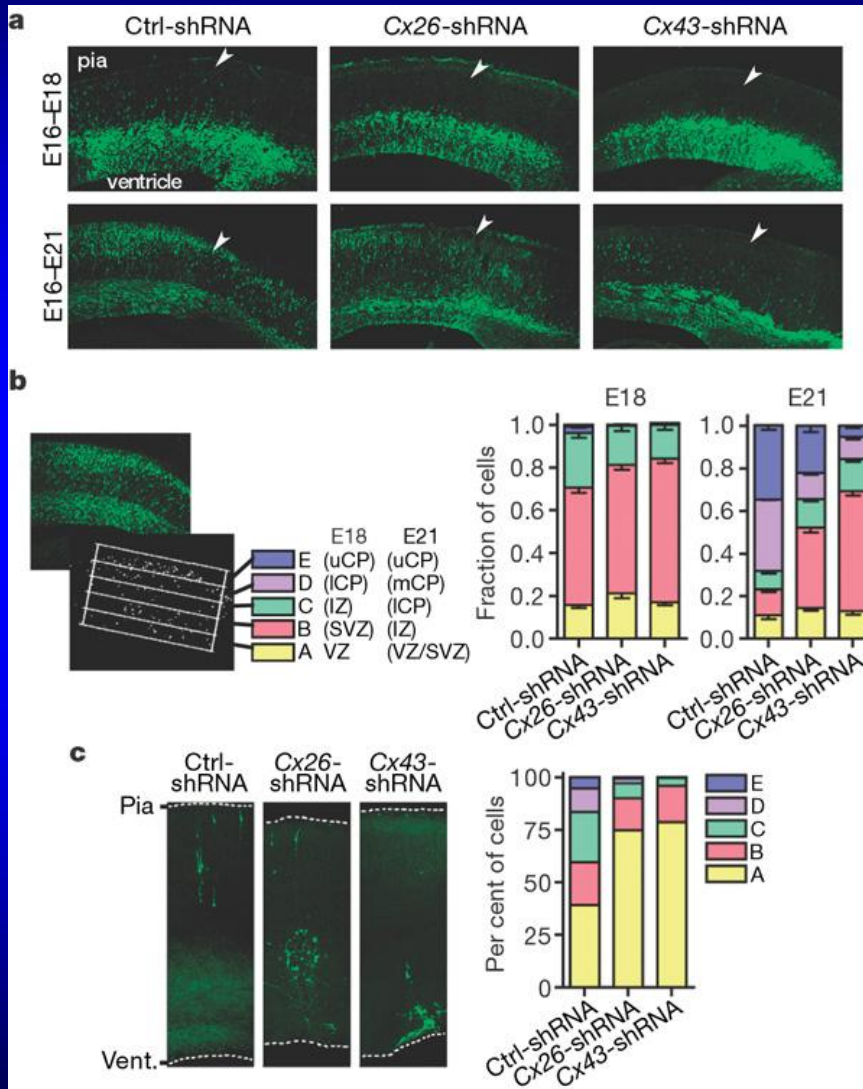


Wyciszenie Snail-1 silencing indukuje MET i obniżenie ekspresji Cx43 w komórkach AT-2_Fi2



Konwergencja wpływu Snail-1 i Cx43 na fenotyp komórek raka prostaty

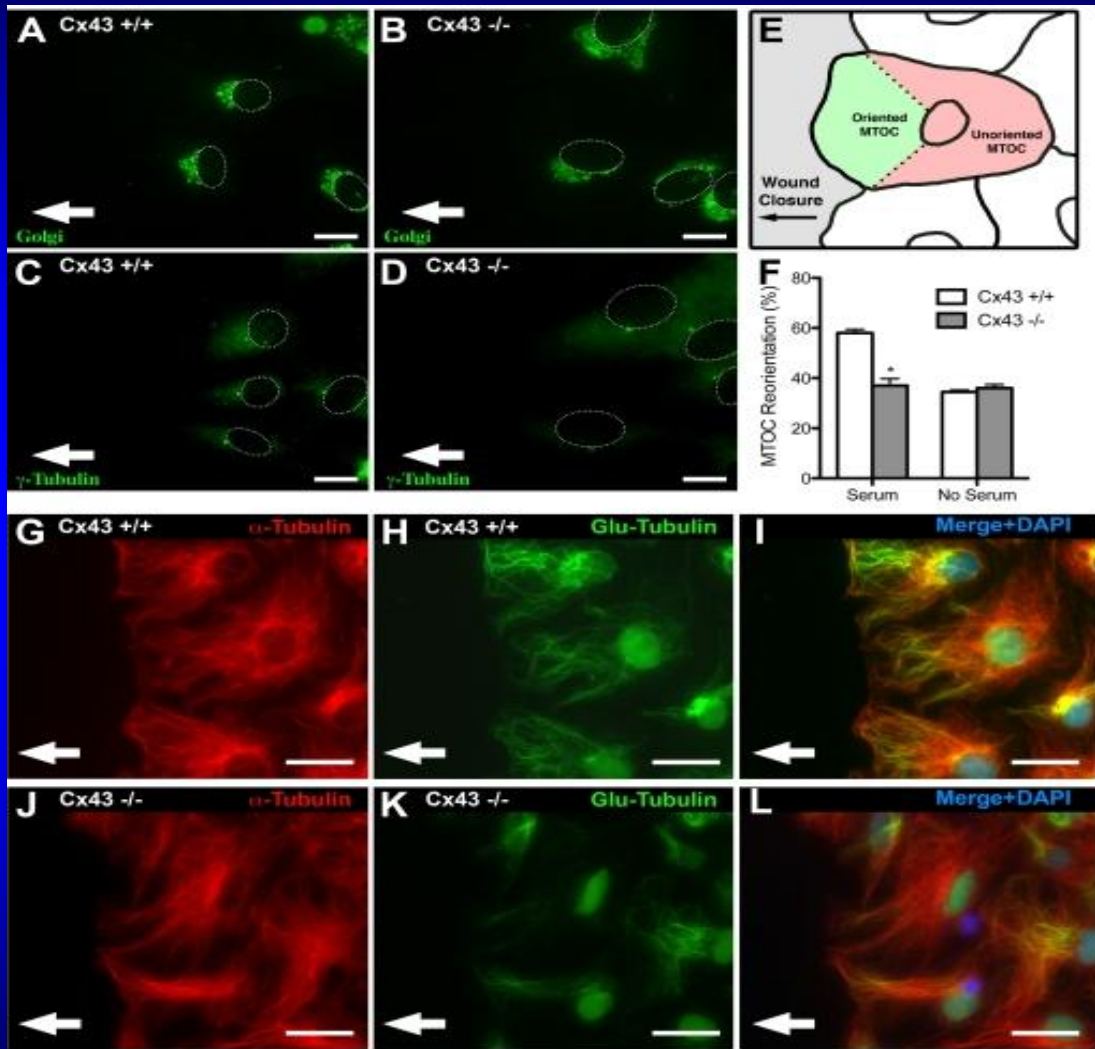
Zdolność koneksyn do ukierunkowania ruchu komórek nerwowych w rozwoju układu nerwowego



Wniosek:

-Cx43 uczestniczy w ukierunkowaniu ruchu komórek w sposób niezależny od GJIC

Zaaangażowanie Cx43 w stabilizację mikrotubul

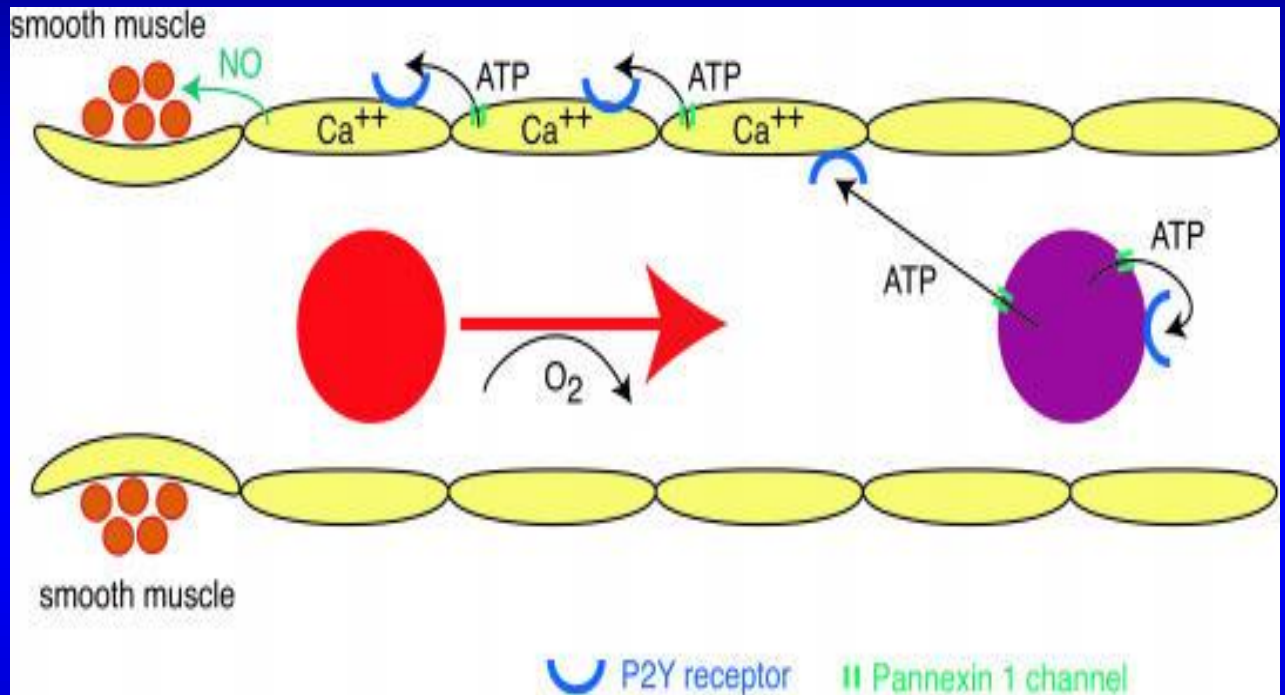
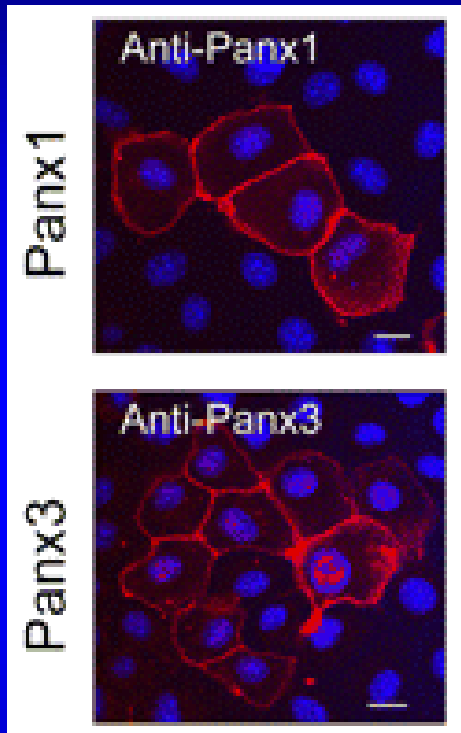


Wpływ na polaryzację ruchu komórek



Funkcja paneksyn w komunikacji między erytrocytami a komórkami śródbłonka

Prostata



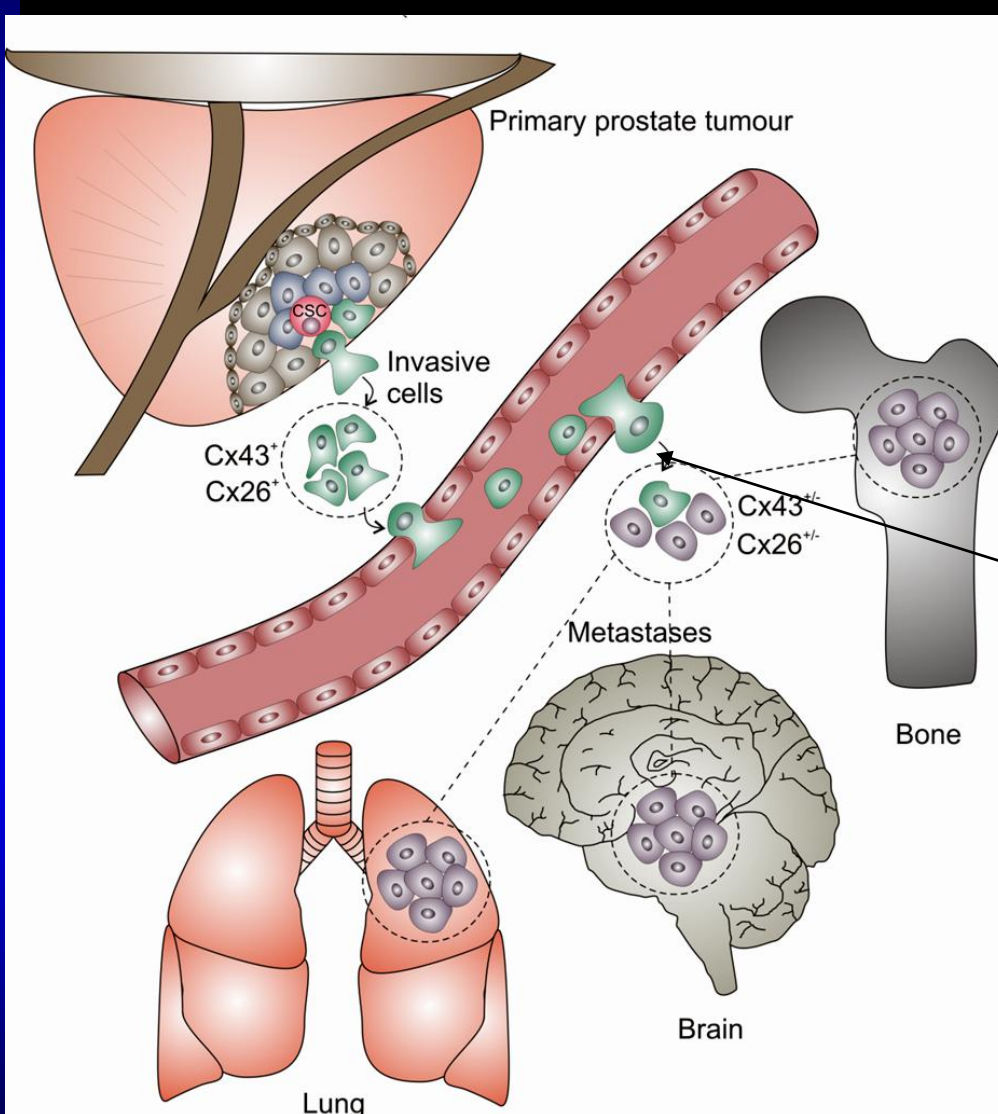
Dahl et al., 2006

Wniosek: Paneksyny tworzą kanały błonowe łączące cytoplazmę z otoczeniem komórki, a nie z jej sąsiadem...

Podobną cechę zasugerowano dla koneksonów zbudowanych z klasycznych koneksyn...

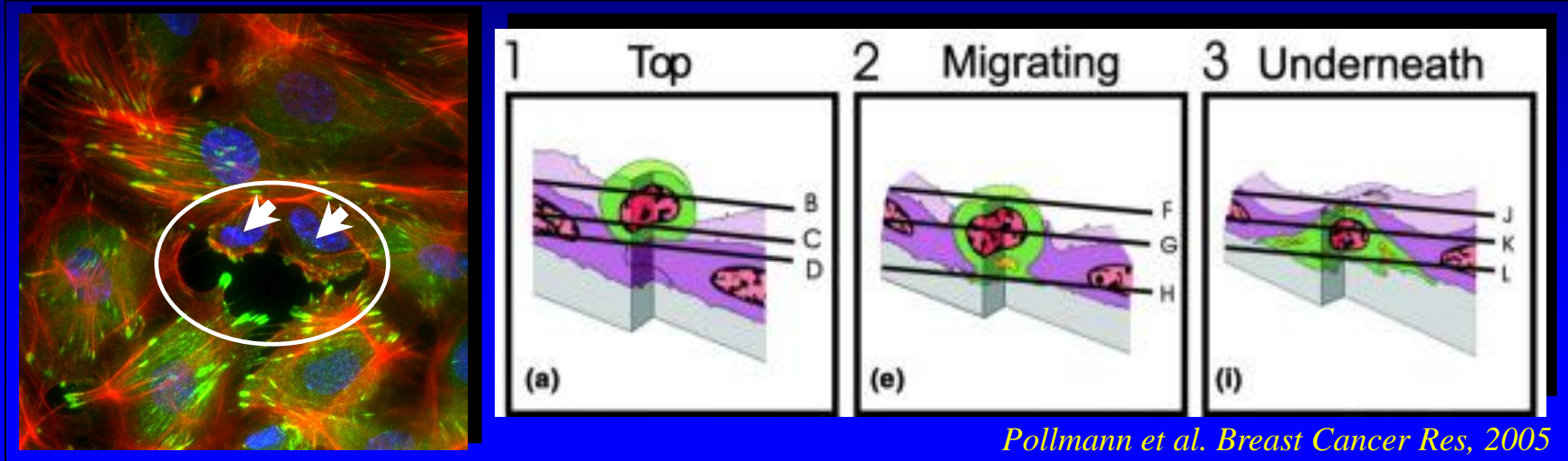
Locovei et al., 2006

Kaskada metastatyczna w raku prostaty



„Nisza metastatyczna”
jako mikrośrodowisko
komórki w miejscu jej
ekstrawazacji

Cx43 w diapedezie cyrkulujących komórek nowotworowych



Pollmann et al. Breast Cancer Res, 2005

Układ odpornościowy:

-Gap junctions in cytokine-induced **leukocyte** adhesion to **endothelium** in vivo. *Véliz et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008

-Connexin43 hemichannel activity with consequences on the innate immune response in endothelial cells *Robertson et al., Biochem. J. (2010) 432 (133–143)*

-Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion. *Machtaler et al. J. Cell Sci (2011); 124: 2611*

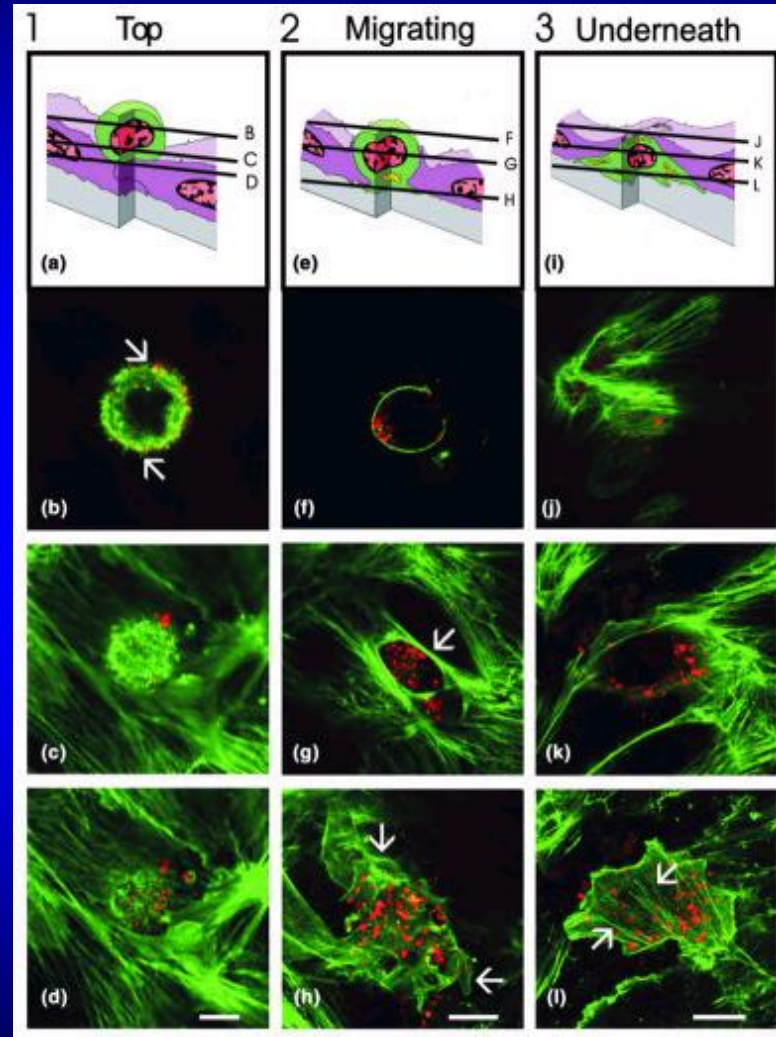
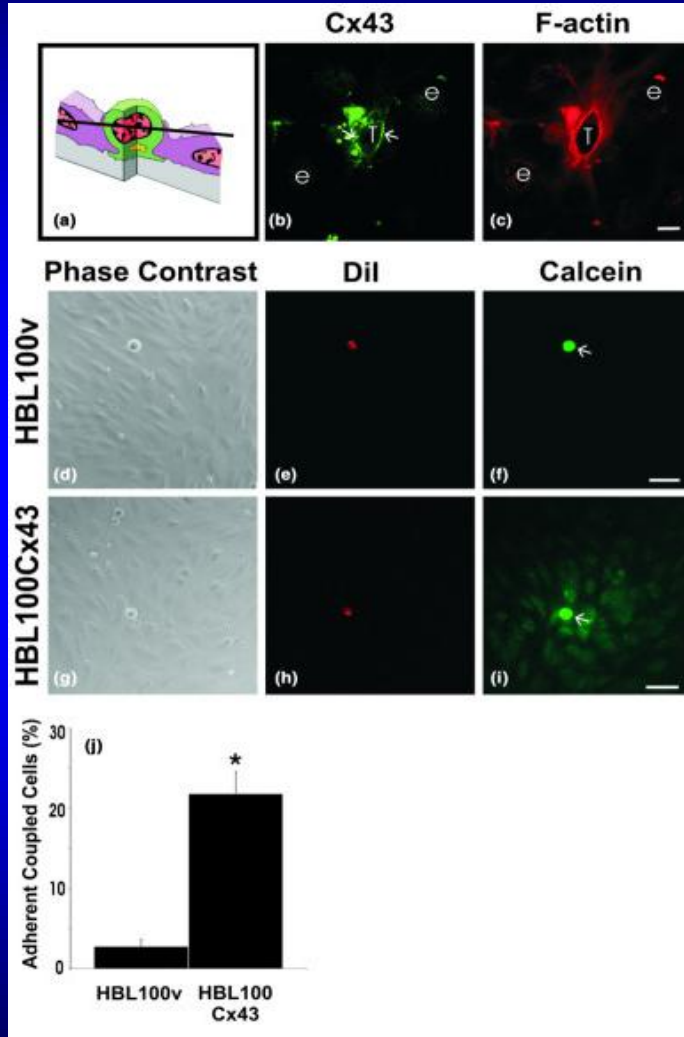
Komorki nowotworowe:

- el-Sabban ME, Pauli BU. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and **endothelium**. *Invasion Metastasis.* 1994-1995;14(1-6):164-76

-Zhang et al. J. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions *Neurosurg.* 2003 Apr;98(4):846-53.

- Pollmann et al. **Connexin 43 mediated gap junctional communication enhances breast tumor cell diapedesis in culture.** *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):R522-34.

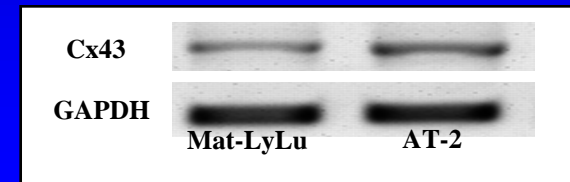
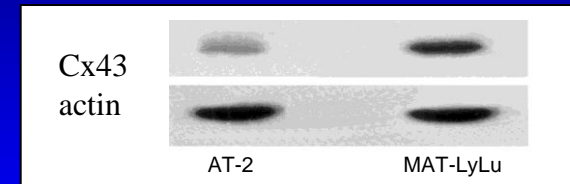
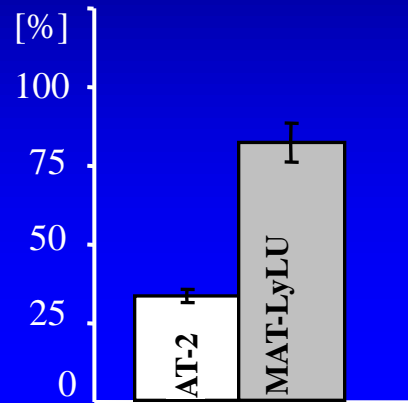
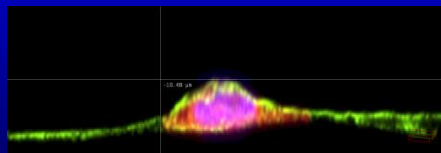
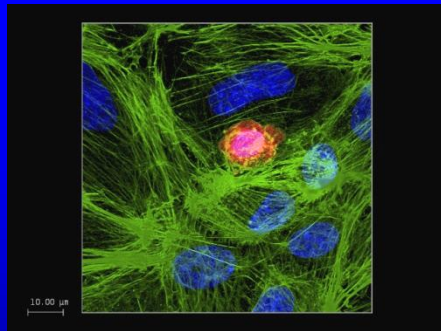
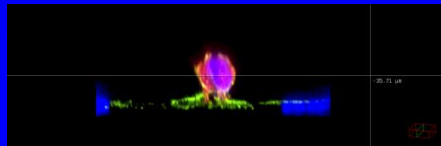
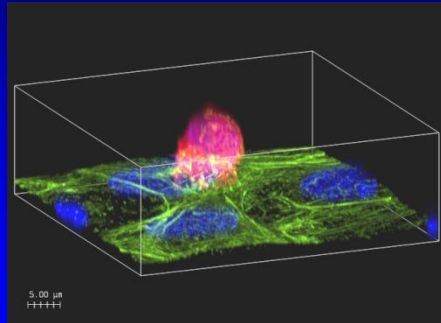
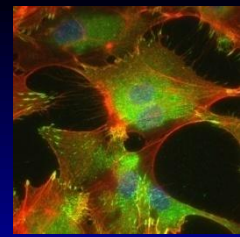
Cx43 i komunikacja między komórkami nowotworowymi a śródbłonkiem ułatwia transmigrację komórek nowotworowych przez warstwę *endothelium*



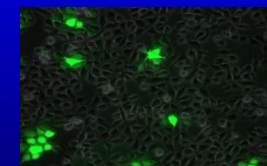
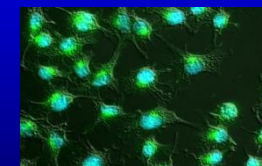
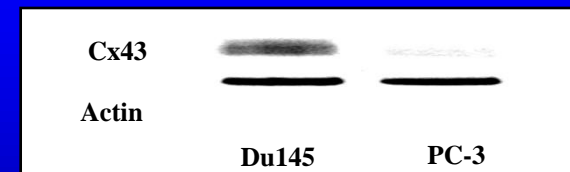
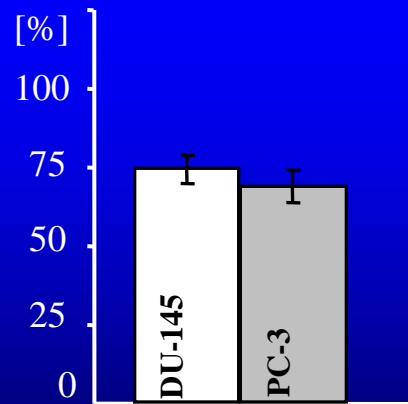
GJIC

Transmigracja

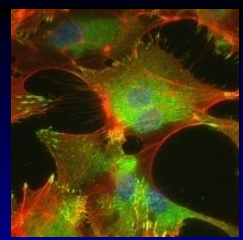
Transśródbłonkowa migracja komórek raka prostaty – rola Cx43 ???



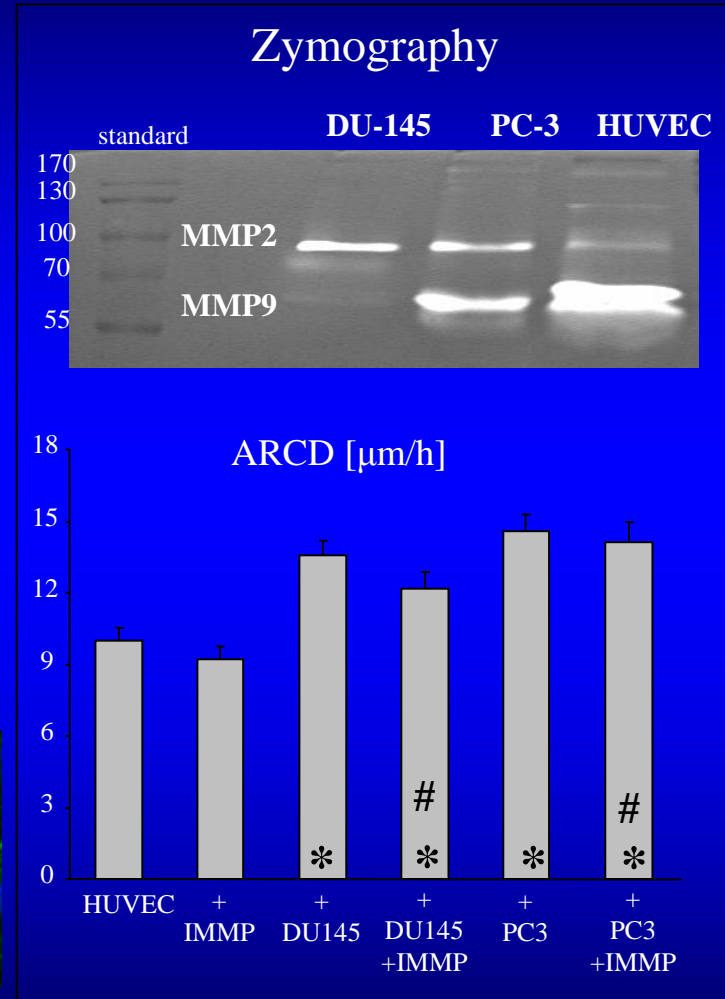
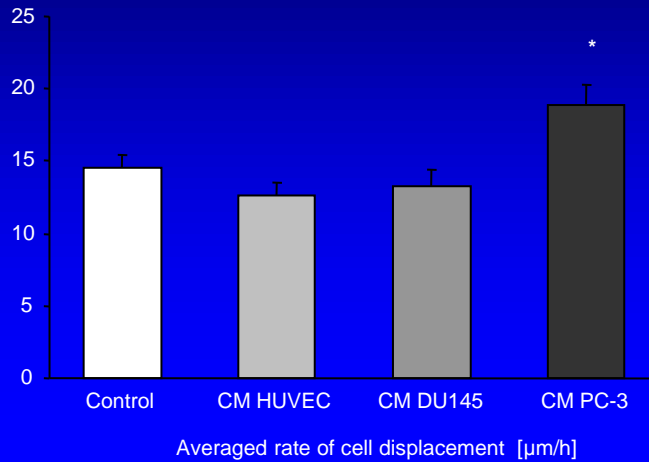
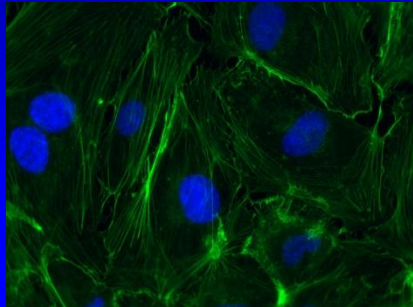
Miekus et al., (2005)



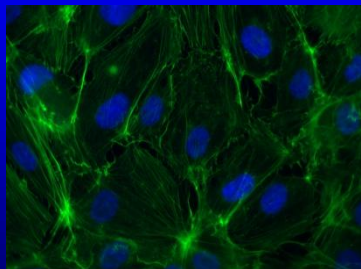
Pętle parakryne w niszy metastatycznej komórek raka prostaty



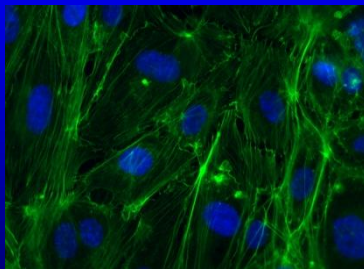
Conditioned media...
HUVEC



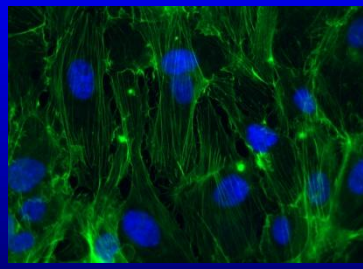
CM HUVEC



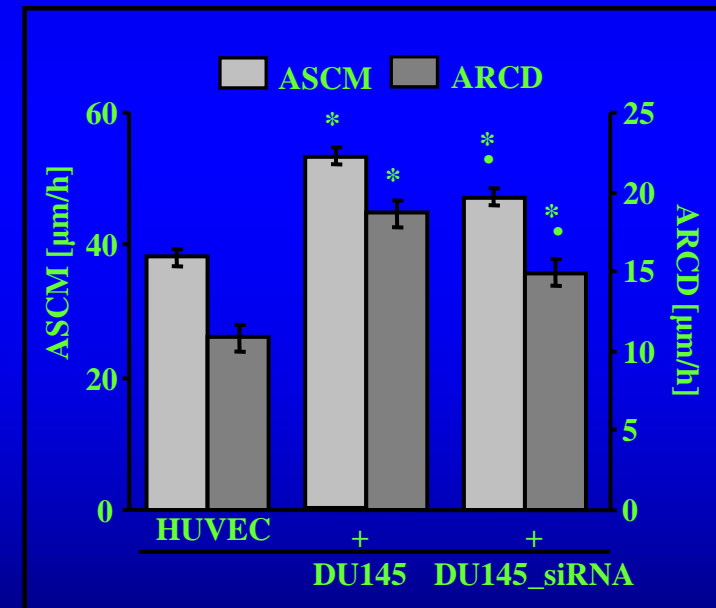
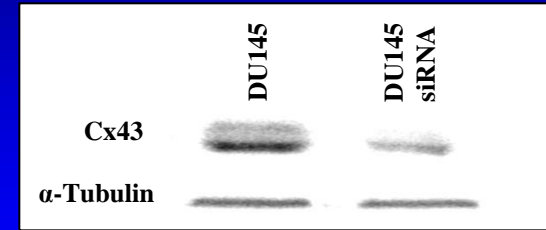
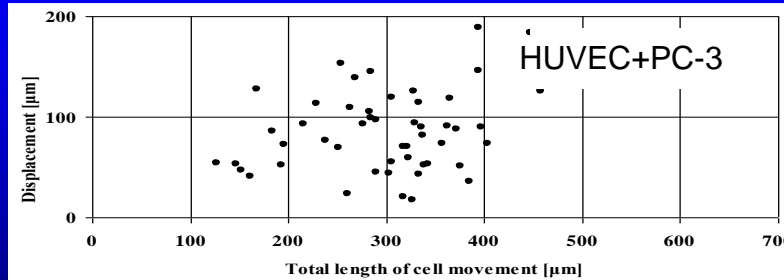
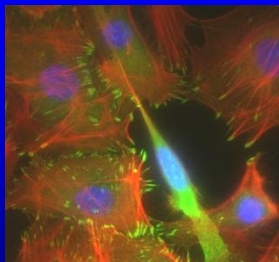
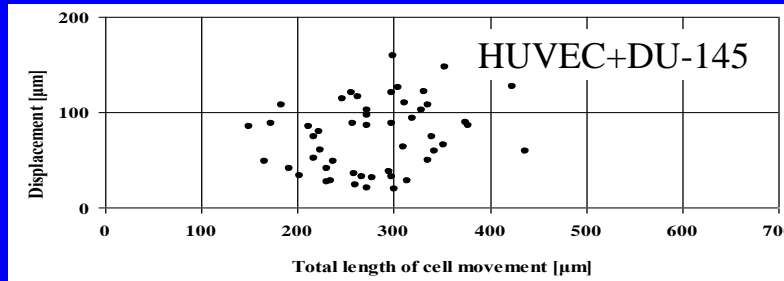
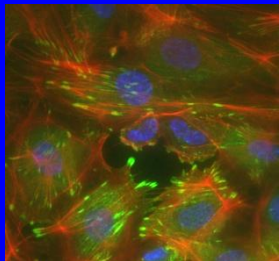
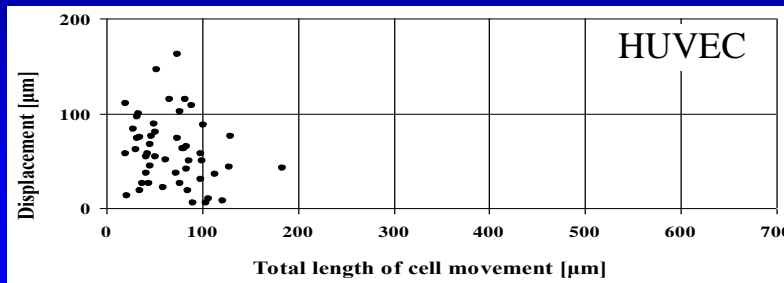
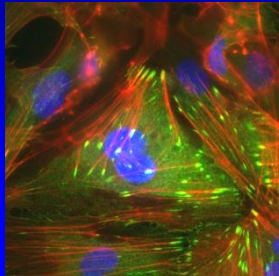
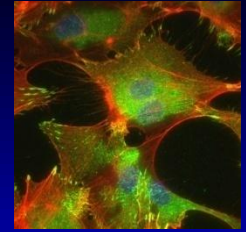
CM DU145



CM PC-3

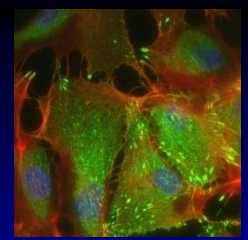


Komórki raka prostaty indukują aktywność migracyjną komórek endothelialnych (HUVEC)

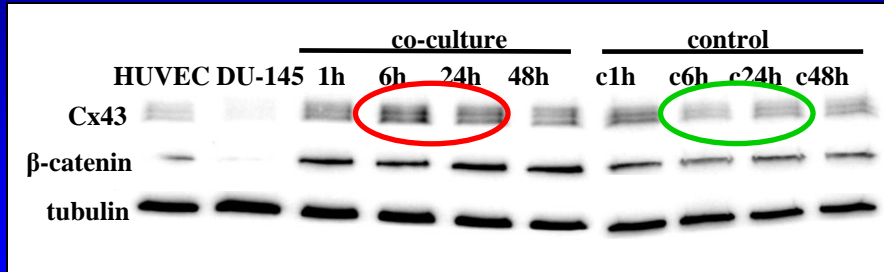


Ekspresja Cx43 wpływa na zdolność komórek raka prostaty do mobilizacji komórek śródbłónka

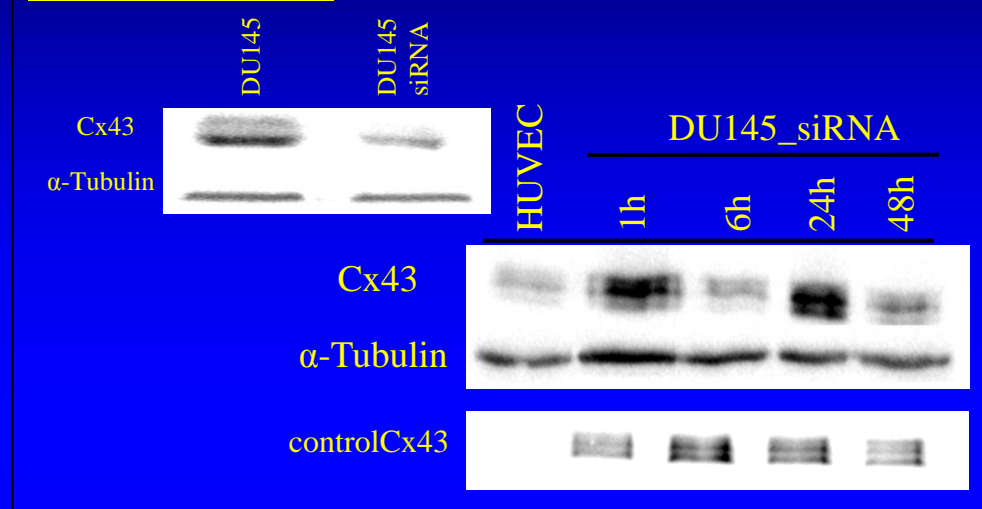
Wzrost ekspresji Cx43 w komórkach HUVEC w obecności komórek raka prostaty



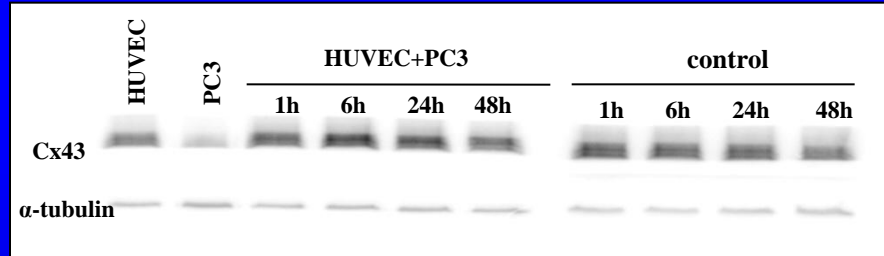
DU-145



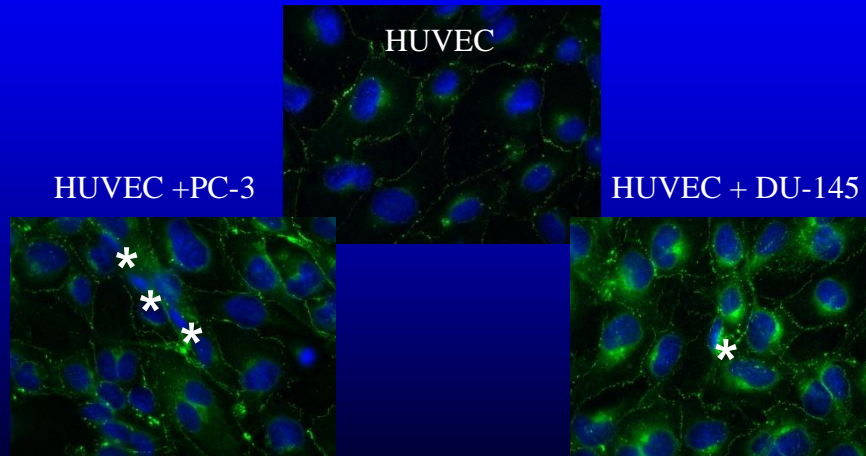
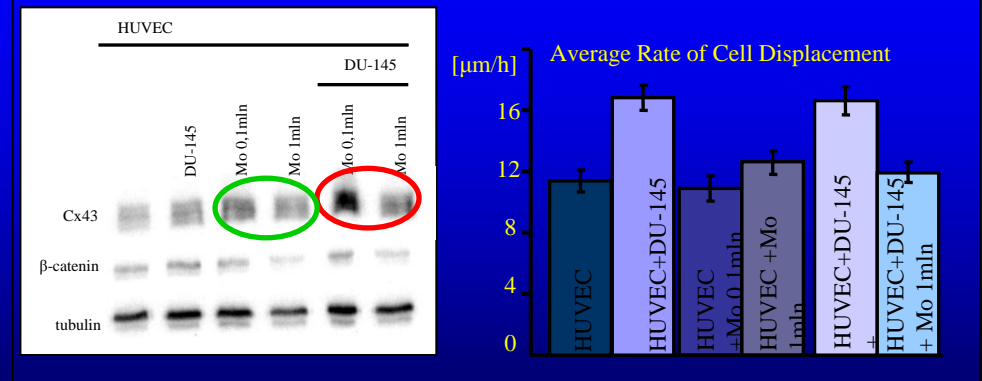
siCx43 DU-145



PC-3

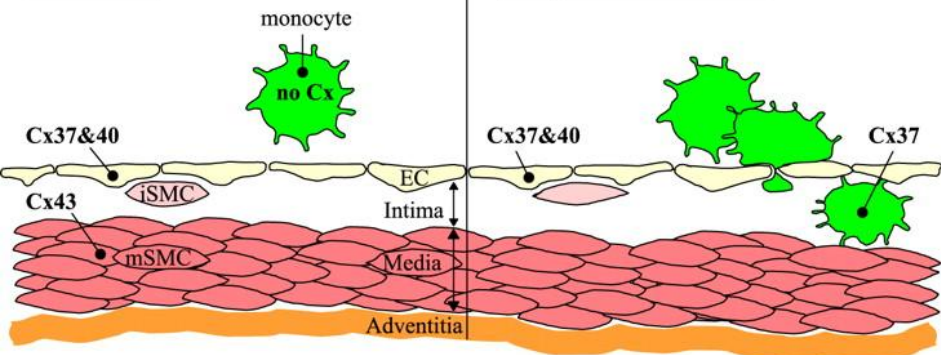


Monocytes

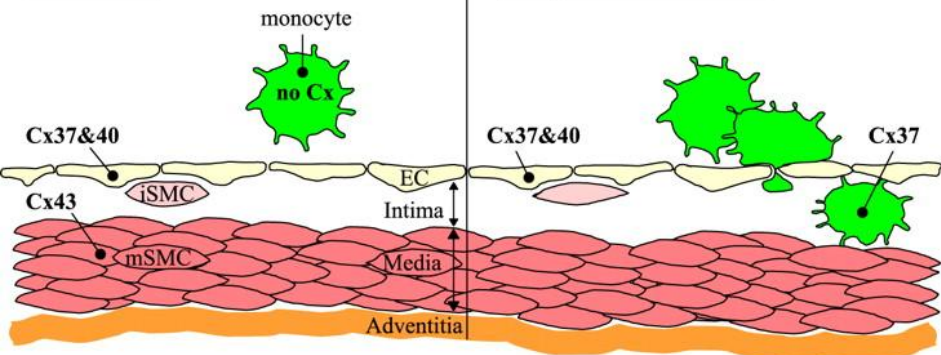


Ekspresja Cx43 w komórkach śródbłónka i podścieliska promuje ekstrawazację komórek krwi

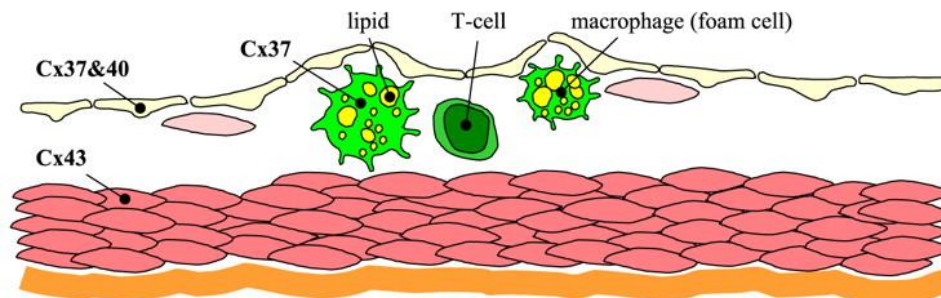
1. Normal



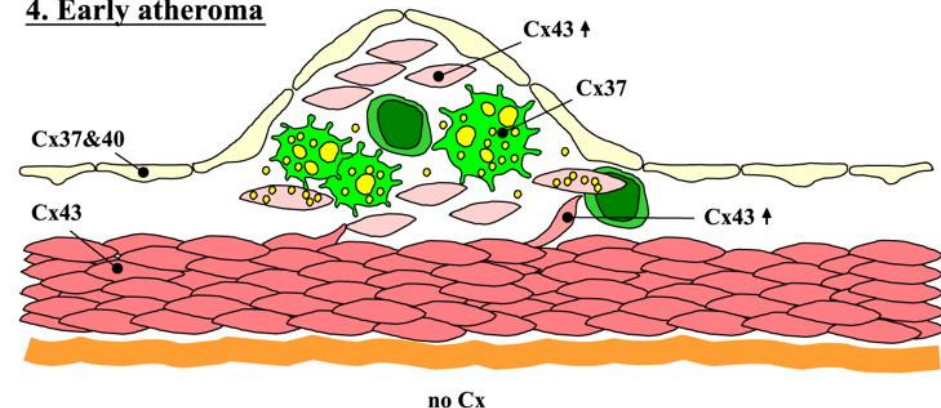
2. Dysfunctional ECs



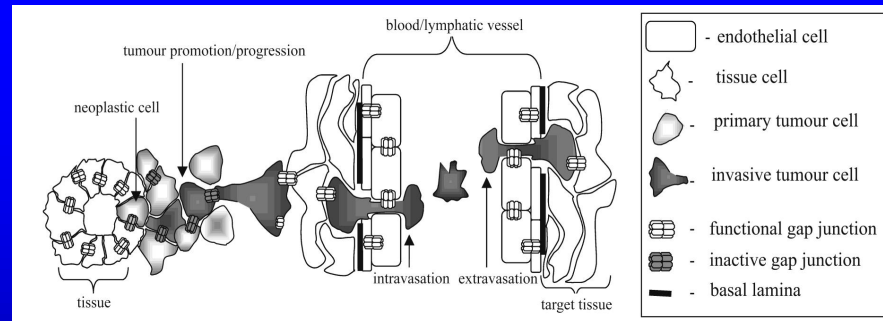
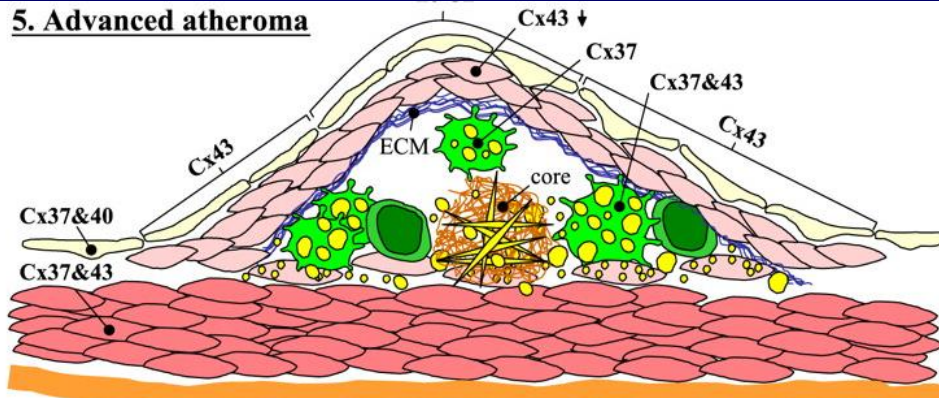
3. Fatty streak



4. Early atheroma



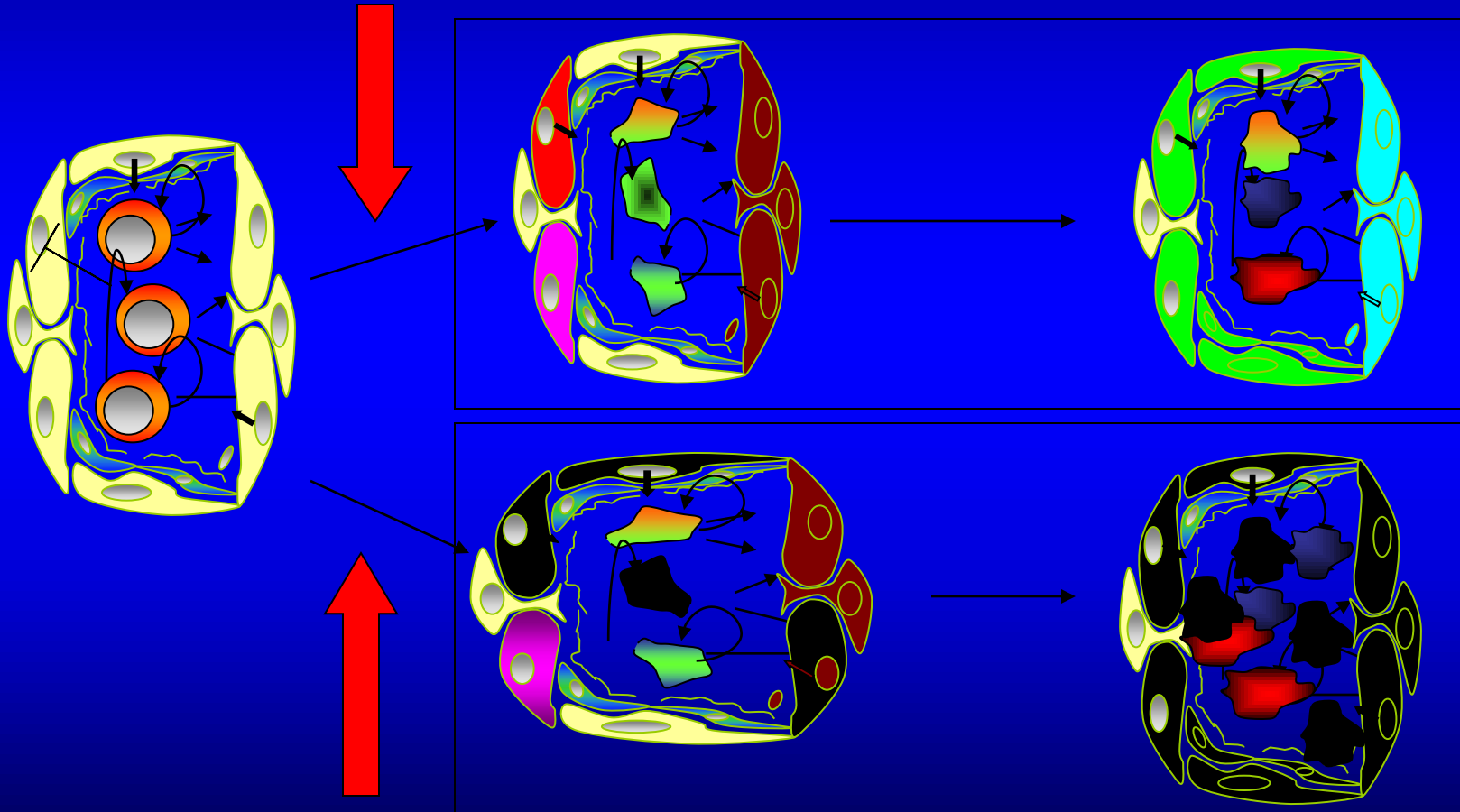
5. Advanced atheroma



Czyż, 2007
 Wzrost ekspresji Cx43 w komórkach śródbłónka w miejscach stanu zapalnego może promować ekstrawazację komórek nowotworowych wykazujących (re)ekspresję tego białka

Model ontogenezy, organogenezy i karcinogenezy organizmów wielokomórkowych – funkcja „niszy”

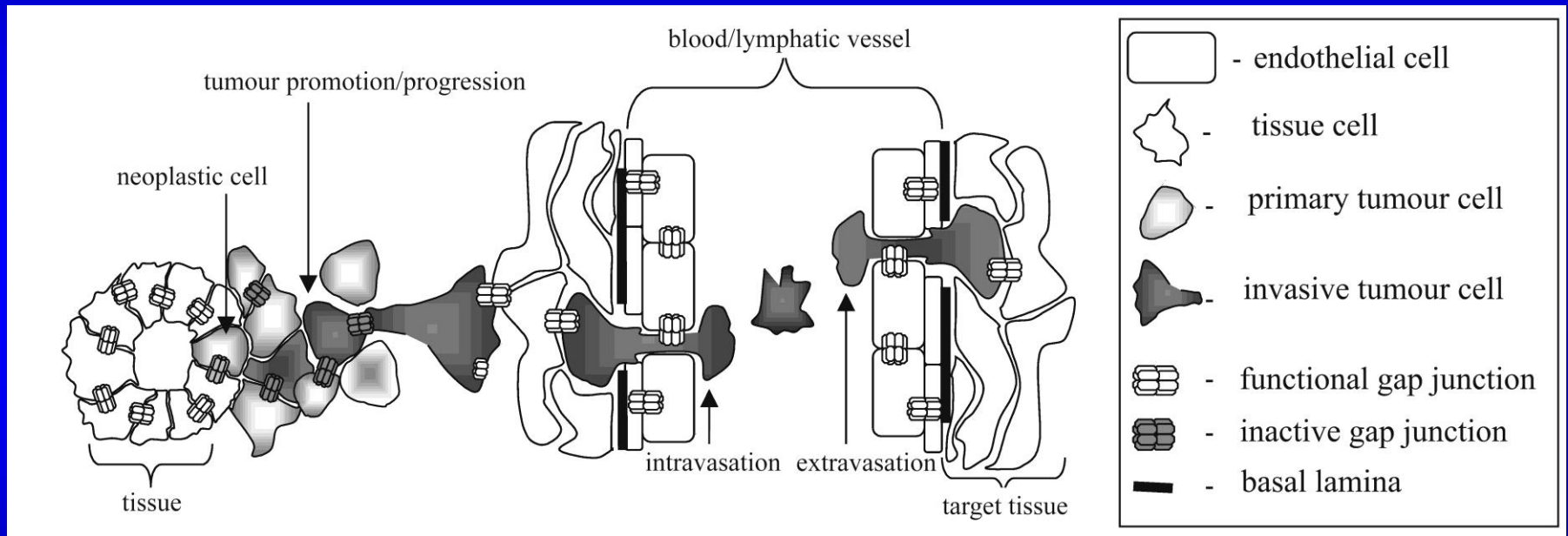
Interakcje między komórkami a ich „niszą” ...czyli mikrośrodowiskiem komórki pozostającym w stanie ciągłej z nią wymiany informacji... decydują o przebiegu ontogenezy i organogenezy organizmów wielokomórkowych



Zaburzenia komunikacji między komórkami a ich „niszą” decydują o toku rozwoju nowotworu

Koneksyny mogą wpływać na promocje i progresję nowotworową w sposób zarówno zależny jak i niezależnie od komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złączy szczelinowych

Rola złącz szczelinowych w rozwoju nowotworu zależy od jego etapu



Czyż, 2008

- Wpływ hamujący
- Wpływ promujący

- Zależny od GJIC
- Niezależny od GJICy

Od komórki do organu...



Od komórki do guza...