

ROLE OF GAP JUNCTIONS AND CONNEXIN 43 IN CANCEROGENESIS AND TUMOR METASTASIS

ULOGA POROZNIH VEZA I KONEKSINA 43 U KANCEROGENEZI I METASTAZIRANJU TUMORA

Ivana Savić¹, Nebojša Ivanović², Dejan Oprić¹

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patologiju, Beograd, Srbija

² KBC Bežanijska kosa, Beograd, Srbija

Correspondence: ivanasavic86@yahoo.com

Abstract

Gap junctions are intercellular connections that enable direct communication between neighboring cells. They are important in tissue homeostasis, cell growth, and differentiation. They are composed of connexin proteins, of which the most common and most studied is connexin 43. The role of connexin 43 in the development and progression of tumors is contradictory. The aim of this paper is to summarize the current state of knowledge on the expression of connexin 43 in various primary and secondary tumors, in order to explain its role in the development and progression of malignant tumors. Previous studies have examined the expression of connexin 43 in various primary and secondary tumors, as well as its association with prognosis. The expression of connexin 43 has been shown to be associated with various aspects of tumor behavior. However, it has been shown that the expression of connexin 43 differs between different types and localizations of tumors, as well as between different stages in tumor progression, which indicates the complex role of connexin 43 in tumor evolution. Since gap junctions play a role in carcinogenesis, invasion, and metastasis of malignant cells, further studies should clarify whether connexin 43 can be used as a diagnostic biomarker.

Keywords:

gap junctions,
connexin 43,
immunohistochemistry,
carcinoma

Sažetak

Porozne veze su međućelijski spojevi koji omogućavaju direktnu komunikaciju susednih ćelija. Važne su u tkivnoj homeostazi, ćelijskom rastu i diferencijaciji. Sačinjene su od proteina koneksina, od kojih je najzastupljeniji i najviše ispitivan koneksin 43. Njegova uloga u nastanku i progresiji tumora je kontradiktorna. Cilj ovog rada je da sumira dosadašnja saznanja o ekspresiji koneksina 43 u različitim primarnim i sekundarnim tumorima da bi se objasnila njegova uloga u nastanku i progresiji malignih tumora. Dosadašnje studije su ispitivale ekspresiju koneksina kod različitih primarnih i sekundarnih tumora, kao i njenu povezanost sa prognozom. Pokazano je da je ekspresija koneksina 43 povezana sa različitim aspektima tumorskog ponašanja. Istraživanja su, međutim, pokazala da se ekspresija koneksina 43 razlikuje između različitih tipova i lokalizacija tumora, kao i između različitih faza u progresiji tumora, što ukazuje na kompleksnu ulogu koneksina 43 u tumorskoj evoluciji. Budući da porozne veze imaju ulogu u kancerogenezi kao i invaziji i metastaziranju malignih ćelija, dalje studije treba da razjasne da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker.

Ključne reči:

porozne veze,
koneksin 43,
imunohistohemija,
karcinom

Uvod

Onkološka oboljenja su jedan od vodećih uzroka smrti u svetu, ali i kod nas. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", karcinom pluća se nalazi na prvom mestu po incidenciji i letalitetu kod oba pola u Srbiji (1), a slično stanje je i u svetu. Kancerogeneza je višestepeni proces maligne transformacije ćelija koji je osnova za nastanak malignih tumora. Kada se tumor otkrije u ranoj fazi, može se lečiti hirurški, a po potrebi i drugim vidovima terapije. Metastaziranje je višestepeni proces koji podrazumeva da se tumorske ćelije odvoje od ostalih ćelija iz svoje okoline, probiju bazalnu membranu i uđu u limfotok i/ili krvotok. Nakon preživljavanja u krvnom ili limfnom sudu, tumorske ćelije adheriraju za endotel i ulaze u tkivo različitih organa u kojima formiraju metastazne depozite. Imajući u vidu da se preživljavanje pacijenata znatno smanjuje sa pojavom metastaza, značajno je razumeti mehanizme njihovog nastanka.

Tkivna homeostaza zavisi od brze komunikacije između ćelija, kao i ćelije i njene okoline. Porozne veze (engl. *gap junctions*) su međućelijski spojevi koji omogućavaju direktnu komunikaciju susednih ćelija. Važne su u tkivnoj homeostazi, ćelijskom rastu i diferencijaciji. Građene su od proteina koneksina (2). Familija humanih koneksina obuvata 21 izoformu, od kojih je najviše ispitivan koneksin 43 (Cx43) (3). Koneksin 43 je široko rasprostranjen molekul u mnogim tkivima, kao što su epitelna tkiva, srčani mišić, koštano tkivo, nervno tkivo i jetra (3-7). Koneksini su integralni transmembranski proteini koji sadrže jedan citoplazmatski N-terminus, dve ekstraćelijske petlje (EL1 i EL2), jednu citoplazmatsku petlju, četiri transmembranska domena, kao i citoplazmatski C-terminus (4). Razlikuju se po citosolnoj petlji i dužini C-terminusa. Koneksini se udružuju i prave heksamere sa centralnom porom koji se nazivaju polukanali ili koneksioni. Dva polukanala na susednim ćelijama se spajaju i formiraju poroznu vezu, što omogućava brzo prenošenje malih molekula (< 1 kDa) kao što su joni, električni signali, metaboliti, pa čak i hemioterapijski lekovi, između ćelija (2). Pored učešća u formiranju poroznih veza, koneksini formiraju

polukanale (engl. *hemichannels*) koji omogućavaju komunikaciju sa ekstraćelijskim matriksom, a omogućavaju i interakcije proteina preko C-terminusa aktivirajući signalne puteve odgovorne za ćelijski rast i proliferaciju (8). C-terminus koneksina utiče i na rearanžman citoskeleta u ćeliji i na njenu pokretljivost. Najznačajniji primeri ovih funkcija izvedeni su na glijalnim i nervnim ćelijama, gde je pokazana veza između ekspresije koneksina i ćelijske pokretljivosti i invazivnosti (9, 10).

Porozne veze nedostaju u ćelijama koje se dele, što je važno da bi se izbegla transmisija metabolita između ćelija koje se dele i njihove okoline. Uloga koneksina u kancerogenezi pretpostavljena je još šezdesetih godina prošlog veka na ćelijama tumora jetre kod pacova, gde je uočeno odsustvo poroznih veza, te je pretpostavljena tumorska supresorna uloga poroznih veza (11). Kasnije studije su, međutim, pokazale kontradiktorne rezultate, te još uvek nije u potpunosti razjašnjeno da li je uloga koneksina tumorski supresorna ili, pak, onkogeno. Imajući u vidu da su međućelijske veze značajan deo kancerogeneze, važno je ispitivanje ekspresije koneksina 43 u primarnim tumorima, kao i u metastazama. Uloga koneksina 43 u kancerogenezi je, međutim, još uvek nedovoljno rasvetljena i kontradiktorna. Cilj ovog rada je da sumira dosadašnja saznanja o ekspresiji koneksina 43 u različitim primarnim i sekundarnim tumorima da bi se objasnila uloga ovog proteina u nastanku i progresiji malignih tumora.

Ekspresija koneksina 43 u tumorima

Ekspresija koneksina 43 se razlikuje između različitih tipova tumora, kao i između različitih stadijuma istog tumora. Normalno je membranska, a aberantnom ekspresijom se smatraju citoplazmatska i nuklearna ekspresija.

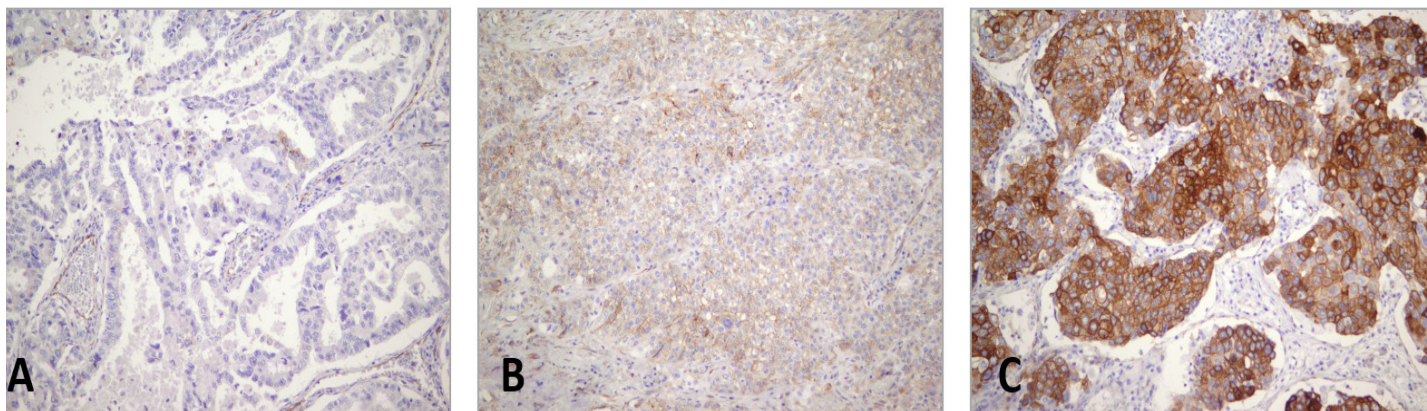
Dosadašnja istraživanja uloge koneksina 43 dala su protivrečne rezultate. Brockmayer (*Brockmeyer*) i saradnici su pokazali da je ekspresija koneksina veća u skvamoznom karcinomu u odnosu na normalnu mukozu usne duplje i da je viši nivo membranske ekspresije koneksina 43 bio povezan sa lošijim preživljavanjem (12). Slično tome, Tanaka i saradnici su pokazali da je ekspresija koneksina 43

povezana sa lošijim preživljavanjem kod pacijenata sa skvamoznim karcinomom jednjaka (13). Kod karcinoma dojke, Elzarad (*Elzarrad*) i saradnici su pokazali da je viši stepen ekspresije koneksina 43 povezan sa većim stepenom adhezije tumorskih ćelija za endotel plućnih kapilara, što dovodi do razvoja metastaza (14). Han i saradnici su pokazali da je u slučaju adenokarcinoma kolona veća ekspresija koneksina 43 u invazivnom frontu, što sugerise da koneksin 43 igra određenu ulogu u kancerogenezi preko poroznih veza ili preko nekih drugih signalnih puteva, kao što je Wnt/ β -catenin (15). Kancuga-Koda (*Kanczuga-Koda*) i saradnici su ispitivali ekspresiju koneksina 43 u primarnom karcinomu dojke i odgovarajućim metastazama u limfnim čvorovima. Autori su pokazali da je ekspresija koneksina 43 bila veća u metastazama u odnosu na primarni tumor, što ukazuje na to da je koneksin potreban za efikasno metastaziranje karcinoma dojke u limfne čvorove. Pored toga, pokazali su i da je, pored membranske lokalizacije koneksina, bila prisutna i citoplazmatska ekspresija (16). Kada su u pitanju karcinomi pluća, naša istraživanja su pokazala da je više od 65% primarnih nesitnoćelijskih karcinoma pluća ekspresiralo koneksin 43 i da je skvamozni karcinom imao značajno veću ekspresiju koneksina 43 nego adenokarcinom (17). Dok su limfne metastaze skvamoznog karcinoma pokazale sličnu ekspresiju koneksina 43 kao primarni tumor, trećina pacijenata sa adenokarcinomom imala je izmenjenu ekspresiju koneksina 43 u odnosu na primarni tumor (17). Pokazali smo i aberantnu ekspresiju koneksina kod karcinoma pluća, uključujući i citoplazmatsku i nuklearnu ekspresiju (**slika 1**).

Tang i saradnici (18) su ispitivali ekspresiju koneksina 43 i E-kadherina na uzorcima primarnih karcinoma želuca i njihovih metastaza i pokazali da je u primarnim karcinomima želuca imunohistohemijska ekspresija koneksina 43 i E-kadherina bila znatno manja u odnosu na okolnu normalnu sluznicu, dok je ekspresija ovih markera u limfnim čvorovima bila viša u odnosu na primarni tumor. Ovi rezultati sugerisu da smanjena ekspresija koneksina 43 može da doprinese inicijaciji karcinoma želuca, dok povećana ekspresija dovodi do nastanka metastaza (18). Poje (*Poyet*) i saradnici (19) su pokazali da je povećana ekspresija koneksina 43 u primarnom karcinomu mokraćne bešike bila povezana sa lošom prognozom. Sun i saradnici (20) su

pokazali da je ekspresija koneksina 43 u karcinomu larinksa niža nego u normalnom epitelu larinksa. Pored toga, pokazali su i da postoji značajna povezanost između niske ekspresije koneksina 43 i limfogenih metastaza, ali ne i preživljavanja (20). S druge strane, Puzo (*Puzzo*) i saradnici (21) su pokazali da je petogodišnje preživljavanje pacijenata sa karcinomom larinksa oko 60% kod koneksin 43 pozitivnih tumora i ispod 40% kod koneksin 43 negativnih tumora. Na uzorcima tumora štitaste žlezde, Jian-Guo i saradnici su ispitivali ekspresiju koneksina 43 i pokazali da je ekspresija koneksina 43 značajno smanjena u karcinomu u odnosu na benigne tumore štitne žlezde (22). Takođe je pokazano da je niska ekspresija koneksina 43 povezana sa rastom tumora i proliferacijom, kao i sa nastankom distalnih metastaza (22). Stoletov i saradnici (23) su ispitivali ekspresiju koneksina 43 kod metastaza karcinoma dojke u moždanom parenhimu. Pokazali su da je prisutna pojačana ekspresija koneksina 43 u metastaznim deponitima u odnosu na normalni moždani parenhim (23).

De Oliveira i saradnici su na animalnom modelu pokazali da nedostatak koneksina 43 značajno povećava podložnost razvoju karcinoma pluća, što ukazuje na povezanost nedostatka koneksina 43 i kancerogeneze (24). Slično tome, Titarelli (*Tittarelli*) i saradnici su primetili niži stepen rasta tumora kod melanoma koji su imali viši stepen ekspresije koneksina 43 (25), a slični rezultati su nađeni i na ćelijskoj kulturi karcinoma pluća (26). Ovi rezultati bi se mogli objasniti time da pojačana ekspresija koneksina 43 dovodi do većeg stvaranja poroznih veza, što ima za posledicu inhibiciju tumorskog rasta preko olakšane transmisije sikličnog adenozin monofosfata (cAMP), što je dovelo i do hipoteze o inhibitorskoj ulozi koneksina u nastanku karcinoma (27). Koneksini mogu dovesti i do inhibicije tumorskog rasta preko C-terminusa interagujući sa signalnim medijatorima. Osim toga, na ćelijskoj kulturi karcinoma pluća, Zhao i saradnici su pokazali i da transfekcija koneksinom 43 smanjuje invazivnost i metastazni potencijal preko inhibicije histonskih deacetilaza, ali ne redukuje ćelijsku migraciju (28). Na kulturi C6 glioma ćelija je pokazano da transfekcija koneksinom 43 smanjuje tumorigenost, a brzina tumorskog rasta je bila obrnuto proporcionalna stepenu ekspresije koneksina 43, što ukazuje na to da je ekspresija koneksina 43 povezana



Slika 1. Ekspresija koneksina 43 u karcinomima pluća. A. Odsustvo ekspresije u adenokarcinomu pluća. B. Umerena ekspresija u adenokarcinomu pluća. C. Izražena ekspresija u skvamoznom karcinomu pluća.

sa smanjenim rastom tumora mozga (29). Soroceanu i saradnici su našli da je ekspresija koneksina 43 smanjena u glioblastomu u odnosu na niskogradusne astrocitome ili uzorke temporalnog režnja kod epilepsije, što korelira sa smanjenim brojem poroznih veza (30).

Zaključak

Veći broj studija je ispitivao ekspresiju koneksina kod različitih primarnih i/ili sekundarnih tumora, kao i njenu povezanost sa prognozom. Dosadašnji rezultati su pokazali da je ekspresija koneksina povezana sa različitim aspektima tumorskog ponašanja. Ova istraživanja su, međutim, pokazala da se ekspresija koneksina razlikuje između različitih tipova i lokalizacija tumora, kao i između različitih faza u progresiji tumora, što ukazuje na njegovu kompleksnu ulogu u različitim fazama razvoja tumora i kod različitih tumora. Neke od studija su pokazale i aberantnu, uglavnom citoplazmatsku ekspresiju koneksina u tumorima, ali još uvek nije jasno da li je citoplazmatska ekspresija koneksina samo depo ili igra aktivnu ulogu u tumorskom ponašanju.

S obzirom na to da gradiranje i određivanje stadijuma kod malignih neoplazmi nije dovoljno za predviđanje progresije bolesti, važno je otkrivanje novih prognostičkih i prediktivnih markera. Budući da porozne veze imaju ulogu u kancerogenezi, kao i u invaziji i metastaziranju malignih ćelija, dalje studije treba da razjasne da li se koneksin 43 može koristiti kao dijagnostički biomarker ili kao marker rizika za nastanak metastaza u različitim karcinomima. Dalja istraživanja su potrebna i da bi se razjasnile uloge koneksina i poroznih veza u fiziološkim i patološkim uslovima, što je preduslov za potencijalno targetovanje koneksina u terapiji.

Literatura

- Batut MJ. Health Statistical Yearbook of the Republic of Serbia. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia; 2012. [Last accessed on 2017 Feb 05]. Available from: <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2012.pdf>
- Aasen T, Leithe E, Graham SV, Kameritsch P, Mayán MD, Mesnil M et al.. Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic. *Oncogene*. 2019; 38(23):4429-51.
- Defamie N, Chepied A, Mesnil M. Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS Lett*. 2014; 588(8):1331-8.
- Wu JI, Wang LH. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application. *J Biomed Sci*. 2019; 26(1):8.
- Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*. 2013; 52(1):157-66.
- Crespo Yanguas S, Willebrords J, Maes M, da Silva TC, Veloso Alves Pereira I, Cogliati B, et al. Connexins and pannexins in liver damage. *EXCLI J*. 2016; 15:177-86.
- Verheule S, Kaese S. Connexin diversity in the heart: insights from transgenic mouse models. *Front Pharmacol*. 2013; 4:81.
- Mulkearns-Hubert EE, Reizes O, Lathia JD. Connexins in Cancer: Jekyll or Hyde? *Biomolecules*. 2020; 10(12):1654.
- Bates DC, Sin WC, Aftab Q, Naus CC. Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia*. 2007; 55(15):1554-64.
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci*. 2009; 29(7):2009-21.
- Loewenstein WR, Kanno Y. Intercellular communication and tissue growth. I. Cancerous growth. *J Cell Biol*. 1967; 33(2):225-34.
- Brockmeyer P, Jung K, Perske C, Schliephake H, Hemmerlein B. Membrane connexin 43 acts as an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014; 45(1):273-81.
- Tanaka T, Kimura M, Ishiguro H, Mizoguchi K, Takeyama H. Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2016; 4(6):989-93.
- Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, Al-Mehdi AB. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med*. 2008; 6:20.
- Han Y, Zhang PJ, Chen T, Yum SW, Pasha T, Furth EE. Connexin43 Expression Increases in the Epithelium and Stroma along the Colonic Neoplastic Progression Pathway: Implications for Its Oncogenic Role. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:561719.
- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, Koda M, Wincewicz A, Baltaziak M, et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006; 59(4):429-33.
- Savić I, Milovanović P, Oprić S, Ivanović N, Oprić D. Expression of connexin-43 in surgical resections of primary tumor and lymph node metastases of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung: a retrospective study. *PeerJ*. 2022; 10:e13055.
- Tang B, Peng ZH, Yu PW, Yu G, Qian F. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol*. 2011; 28(2):502-8
- Poyet C, Buser L, Roudnicky F, Detmar M, Hermanns T, Mannhard D, et al. Connexin 43 expression predicts poor progression-free survival in patients with non-muscle invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol*. 2015; 68(10):819-24.
- Sun WH, Liu HM, Li YJ, Ji XR, Liang DP. [A study of the relationship between the expression of connexin43, E-cadherin and biological behaviors of human laryngeal cancer]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004; 39(5):293-7.
- Puzzo L, Caltabiano R, Parenti R, Trapasso S, Allegra E. Connexin 43 (Cx43) Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas: Preliminary Data on Its Possible Prognostic Role. *Head Neck Pathol*. 2016; 10(3):292-7.
- Jian-Guo S, Bin W, Zong-Ping D, Kun-Kun C, Sai Z, Zheng-Guo. BRMS1 and Cx43 expression in fine needle aspiration thyroid cancer tissue and their correlation with tumor malignancy, *Journal of Hainan Medical University*. 2016; 22:112-5.
- Stoletov K, Strnad J, Zardoujian E, Momiyama M, Park FD, Kelber JA, et al. Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 4):904-13.
- de Oliveira KD, Tedardi MV, Cogliati B, Dagli ML. Higher incidence of lung adenocarcinomas induced by DMBA in connexin 43 heterozygous knockout mice. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:618475.
- Tittarelli A, Guerrero I, Tempio F, Gleisner MA, Avalos I, Sabanegh S, et al. Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity. *Br J Cancer*. 2015; 113(2):259-67.
- Zhang ZQ, Zhang W, Wang NQ, Bani-Yaghoob M, Lin ZX, et al. Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43. *Carcinogenesis*. 1998; 19(11):1889-94.
- Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene*. 2001; 20(31):4138-49.
- Zhao JQ, Sun FJ, Liu SS, Yang J, Wu Y-Q, Li G-S, et al. Expression of connexin 43 and E-cadherin protein and mRNA in non-small cell lung cancers in Chinese patients. *Asian Pac J of Cancer Prev*. 2013; 14:639-43.
- Naus CC, Elisevich K, Zhu D, Belliveau DJ, Del Maestro RF. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Cancer Res*. 1992; 52(15):4208-13.
- Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*. 2001; 33(2):107-17.