Funkcjonalna specjalizacja komórek nowotworowych, prowadząca m.in. do rozwoju sub-populacji komórek o zwiększonym potencjale inwazyjnym, decyduje o homeostazie i rozwoju guzów. Różnorodność morfologiczna i fizjologiczna komórek nowotworowych w obrębie pojedynczego guza stanowi jedno z największych wyzwań w badaniach procesu nowotworzenia i w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych. Powszechnie stosowane modele doświadczalne oparte na liniach komórek nowotworowych zakładają, często w sposób nieuzasadniony, ich jednorodność fenotypową. Dodatkowo, część technik doświadczalnych z zasady „uśrednia" odpowiedzi różniących się fenotypowo komórek na zadany bodziec, co może wpływać na interpretację otrzymanych wyników i przekładać się na użyteczność modeli *in vitro* w analizach mikroewolucji nowotworów. Techniki *in vivo* w większym stopniu umożliwiają śledzenie losów komórek w naturalnym dla nich środowisku, jednak ich wadą pozostaje złożoność układów doświadczalnych oraz brak praktycznej możliwości śledzenia losów pojedynczych komórek w dłuższych okresach czasu. Stąd istnieje potrzeba stworzenia modeli badawczych pozwalających na przeprowadzanie analiz właściwości i reakcji pojedynczych komórek (single-cell approach) w ściśle kontrolowanych warunkach pozwalających na interpretacje zachowania komórek w kontekście mikroewolucji nowotworów.

Zaproponowany w pracy model oparty o heterogenne fenotypowo linie komórek raka szczurzej prostaty (AT-2) i ludzkiego glejaka (T98G) pozwala na śledzenie przejść fenotypowych, którym podlegają komórki nowotworowe *in vivo*, a które decydują m.in. o formowaniu populacji o zwiększonym potencjale inwazyjnym. Stworzono układ badawczy złożony z sześciu homogennych sub-linii komórek AT-2, różniących się morfologią, podatnością na odkształcenia, ruchliwością, potencjałem inwazyjnym *in vitro* i ekspresją markerów przejść między fenotypem epitelioidalnym a mezenchymalnym (fibroblastoidalnym; epithelial-mesenchymal transition-EMT). Zaobserwowano istnienie korelacji między fibroblastoidalnym fenotypem komórek, charakterystycznym dla komórek o zwiększonym potencjale inwazyjnym a poziomem ekspresji białka Snail-1, który jest czynnikiem transkrypcyjnym regulującym EMT. Ekspresja białka Snail-1 powoduje zahamowanie ekspresji genów związanych z fenotypem epitelialnym, zmiany morfologii komórek, obniżenie siły adhezji i podwyższenie aktywności migracyjnej komórek. W konsekwencji EMT prowadzi do powstania populacji komórek o wyższym potencjale metastatycznym. Podobne współzależności między morfologią sub-linii i ekspresją Snail-1 zaobserwowano w przypadku komórek glejaka T98G. Sugeruje to, że różnicowanie fenotypowe komórek AT-2 związane jest z przejściami fenotypowymi, o których wiadomo, że decydują o rozwoju sub-populacji komórek odpowiedzialnych za progresję nowotworów i tworzenie metastaz. Dodatkowo, wyciszenie Snail-1 w komórkach o fenotypie fibroblastoidalnym powodowało zmianę ich morfologii na epitelioidalną, podczas gdy traktowanie epitelioidalnych sub-linii komórek AT-2 TGF-β wywoływało efekt odwrotny.

Ponadto, wyraźnej ekspresji czynnika Snail-1 i jego jądrowej lokalizacji w fibroblastoidalnych sub-liniach komórek AT-2 i T98G towarzyszyła podwyższona ekspresja koneksyny(Cx)43 oraz wysoka intensywność komunikacja międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych (GJIC). Złącza szczelinowe zbudowane z Cx43 i innych koneksyn są jednym z głównych mediatorów utrzymywania homeostazy w tkankach prawidłowych. Koneksyny tworzą heksameryczne kanały umożliwiające międzykomórkowy transfer jonów i małych cząstek o masach nieprzekraczających 1kD. Powszechnie przyjmuje się, że obniżenie poziomu ekspresji koneksyn lub upośledzenie funkcji złącz szczelinowych promuje proces nowotworzenia na wczesnych jego etapach poprzez izolację metaboliczną komórek. Jednak liczne doniesienia literaturowe opisujące podwyższoną ekspresję koneksyn w guzach wtórnych zdają się częściowo przeczyć tej hipotezie. Wyniki uzyskane w pracy sugerują, że ekspresja i funkcja Cx43 może być powiązana z przejściami fenotypowymi zwiększającymi potencjał inwazyjny komórek raka prostaty i glejaka. Wyciszenie ekspresji czynnika Snail-1 w komórkach fibroblastoidalnych AT-2 prowadziło do przejścia do fenotypu epitelioidalnego przy równoczesnym obniżeniu ekspresji Cx43. Z kolei nadekspresja czynnika Snail-1 w komórkach epitelioidalnych powodowała przejścia fenotypowe w kierunku fibroblastoidalnym oraz podwyższenie poziomu ekspresji Cx43. Jednocześnie wyciszenie ekspresji Cx43 w komórkach fibroblastoidalnych wpływało na poziom ekspresji Snail-1: prowadziło do jego obniżenia. Obserwacje te wskazują na istnienie mechanizmów regulujących wzajemnie ekspresję Snail-1 i Cx43. W komórkach prawidłowego nabłonka prostaty (PNT2A) nie stwierdzono występowania opisanych zależności.

Koimmunoprecypitacja białek Cx43 i Snail-1, w powiązaniu z technikami Western Blot oraz spektrometrii masowej (Shot-gun), nie wykazała bezpośredniego oddziaływania białek Snail-1 i Cx43, potwierdziła jednak oddziaływanie Cx43 z β-tubuliną. Jednocześnie wykonane analizy immunofluorescencyjne wykazały translokację do jądra białka Smad2, co wskazuje, że Cx43 reguluje ekspresję Snail-1 poprzez wypieranie białek Smad2 z mikrotubul zwiększając w ten sposób cytoplazmatyczną pulę białek Smad2. W konsekwencji prowadzi to do zwiększonej translokacji Smad2 do jądra komórkowego i indukcji ekspresji Snail-1.

Reasumując w ramach pracy zidentyfikowano markery heterogenności linii komórek AT-2 i T98G i podjęto próbę zastosowania obu modeli do analiz mechanizmów odpowiedzialnych za progresję nowotworową w korelacji z ekspresją Snail-1 i Cx43. Ponadto przeprowadzono analizę powiązań między ekspresją białka Snail-1 a ekspresją **koneksyny43 (Cx43)** oraz ich roli w kształtowaniu frontu inwazyjnego nowotworu prostaty i glejaka wielopostaciowego. Określono również możliwą rolę Cx43 w mikroewolucji populacji komórek inwazyjnych. Stosując opracowany model badawczy po raz pierwszy wykazano istnienie bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją białek Snail-1 oraz Cx43 w nowotworach pochodzenia nabłonkowego (rakach) i glejakach oraz dokonano analizy ścieżek regulujących wzajemnie ich ekspresję. Wykazano również ekspresję czynnika transkrypcyjnego Snail-1 i powiązano jej poziom z inwazyjnością komórek glejaków. Umożliwia to stosowanie go jako markera złośliwości glejaków. Wyniki pozwoliły na powiązanie podwyższonego poziomu ekspresji Cx43 z fenotypem inwazyjnym komórek raka prostaty i glejaków oraz opisanie roli Cx43 w regulacji potencjału metastatycznego komórek. Nowe fakty na temat roli Snail-1, Cx43 w regulacji potencjału inwazyjnego komórek raka prostaty i glejaków pozwoliły na uzyskanie pełniejszego obrazu rozwoju obu typów nowotworów. Glejaki nie wywodzą się z komórek nabłonkowych, więc w ich przypadku nie można mówić o procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Jednak ekspresja białka Snail-1 oraz związane z nią zmiany fenotypowe świadczą o zaangażowaniu w progresję glejaków procesu podobnego do EMT. Proces ten nie był do tej pory przedmiotem pogłębionych analiz.